Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 1, с. 89-92.

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.151
©Коллектив авторов

АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ПОГРАНИЧНЫМИ ПСИХИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Е.С. Герасимович[1], А.А. Яковлев[2,3]*, Т.А. Дружкова[3], М.Н. Гришкина[3], А.Б. Гехт[3], Н.В. Гуляева[2,3]

[1]Биологический факультет МГУ,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
[2]Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А; эл. почта: al_yakovlev@rambler.ru
[3]Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева,
115419, Москва, ул. Донская, д.43

В лимфоцитах пациентов с различными пограничными психическими расстройствами исследовали активность протеаз, связанных с клеточной гибелью. В группе пациентов с органическими психическими расстройствами обнаружено снижение активности каспаз при депрессивном синдроме и повышение при тревожном синдроме, что свидетельствует об активации апоптоза в лимфоцитах пациентов при состоянии тревоги. Обнаружены различия в активности каспаз в лимфоцитах пациентов с депрессией на фоне органических поражений и с рекуррентным депрессивным расстройством. У пациентов с пограничными психическими расстройствами на фоне органических повреждений выявлено увеличение активности каспаз в лимфоцитах, свидетельствующее об активации апоптоза в этих клетках. Результаты работы могут быть использованы для уточнения механизмов патогенеза психических расстройств и для поиска новых маркеров этих заболеваний.

Ключевые слова: депрессия, лимфоциты, апоптоз, каспазы, пептиды крови, пограничные психические расстройства

DOI: 10.18097/PBMC20166201089

ВВЕДЕНИЕ

Под пограничными психическими расстройствами понимают широкий спектр заболеваний, являющихся промежуточными между состоянием психического здоровья и психозами. К ним относятся депрессия, ипохондрия, неврозы, панические расстройства и расстройства на фоне органических повреждений. Депрессия является одним из самых распространённых пограничных психических расстройств. Общепризнано, что в развитие депрессии могут вносить вклад различные факторы, среди которых можно выделить биологические, социальные и психологические. Известно, что с этим заболеванием связан ряд регуляторных и метаболических факторов, однако диагностические критерии на их основе не разработаны [1]. Проблема поиска маркеров депрессии и других психических заболеваний является актуальной в связи с широкой распространённостью этих заболеваний и трудностями, связанными с их диагностикой.

Одним из объектов для поиска маркеров психических заболеваний являются клетки крови, в частности, лимфоциты. Изменение функций лимфоцитов при психических заболеваниях, влияние процессов, протекающих в лимфоцитах, на нервную систему и сходство гормональных эффектов на процессы, происходящие в нервной системе и в лимфоцитах, указывают на перспективность проведения биохимических исследований этих клеток крови для оценки изменений в нервной системе при психических расстройствах [2]. С практической точки зрения лимфоциты в качестве объекта исследования являются удобным и доступным материалом.

Данные литературы свидетельствуют о том, что при депрессивных расстройствах наблюдается усиление гибели лимфоцитов [3]; проведены исследования для уточнения типов клеток, наиболее подверженных гибели, и выяснения возможных путей активации этого процесса [4]. Результаты позволили предположить участие как митохондриального, так и рецепторного путей индукции апоптоза в гибели лимфоцитов при депрессии, однако механизм активации программы клеточной гибели в лимфоцитах при депрессии до сих пор не известен. Гибель лимфоцитов при других пограничных психических расстройствах изучена не была. В связи с этим первым объектом нашего исследования стали ферменты семейства каспаз, ключевых участников процессов апоптотической гибели клеток, в лимфоцитах пациентов с пограничными психическими расстройствами.

МЕТОДИКА

Сбор материала для исследования

В работе использовали образцы крови пациентов НПЦ психоневрологии в возрасте от 19 до 83 лет (0,25-0,75 квартили 42-61 год) женского пола. В качестве контроля использовали психически здоровых добровольцев (n=35), сходных по возрасту. Все обследованные дали информированное согласие

* - адресат для переписки

на использование их биологического материала в данной работе. Пациенты прошли клиническое обследование врачом-психиатром. Согласно результатам клинического обследования, всех пациентов разделили на следующие диагностические группы: расстройство личности органической этиологии (РЛОЭ, n=41), смешанное тревожное и депрессивное расстройство (СТДР, n=25), депрессивный эпизод (ДЭ, n=5), паническое расстройство и рекуррентное депрессивное расстройство (РДР, n=11). Все диагнозы устанавливали в соответствии с критериями МКБ 10. При клиническом осмотре пациентов также выделяли ведущий синдром: как правило, он определялся в виде депрессивного (n=25) или тревожного (n=41).

Обработка образцов крови

Кровь собирали в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранили не более 2 ч до обработки. На 3 мл раствора Histopaque-1077 комнатной температуры наслаивали 2 мл крови и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин. Отбирали верхний слой, содержащий плазму, и непрозрачный слой на границе раздела фаз, содержащий фракцию мононуклеаров крови. Плазму центрифугировали при 400 g 10 мин и отбирали супернатант. Фракцию, содержащую клетки крови, отмывали в 10 мл фосфатно-солевого буфера, центрифугировали при 250 g 10 мин. Отмывку повторяли в 0,5 мл фосфатно-солевого буфера, центрифугировали пробы при 250 g 10 мин, супернатант отбрасывали. Все полученные пробы замораживали и хранили при -80°C.

Определение активности протеаз

Клетки лизировали в буфере для лизиса (20 мМ HEPES, pH 7,5, 10 мМ KCl, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ ФСМФ, 0,05% NP-40) при 4°C в течение 15 мин. После центрифугирования (13000 g, 15 мин, 4°C) отбирали супернатант и измеряли ферментативную активность полученных лизатов в присутствии специфичных флуорогенных субстратов: Ac-VDVAD-AMC для каспазы-2, Ac-DEVD-AMC для каспазы-3, Ac-IETD-AMC для каспазы-8, Ac-VEHD-AMC для каспазы-9. Калибровочную кривую строили по AMC (7-амино-4-метилкумарину). Пробы инкубировали с субстратом (100 мкМ) в реакционном буфере (20 мМ HEPES, 10 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4) в течение 60 мин при 37°C, регистрируя значения флуоресценции через каждые 10 мин при длинах волн возбуждения и флуоресценции 370 нм и 440 нм, соответственно. Активность выражали в пкмоль субстрата, расщеплённого в минуту одним мг белка. Содержание белка определяли по связыванию с *орто*-фталевым альдегидом.

Статистическая обработка результатов

Различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, данные представлены в виде M±SD. Корреляции определяли с помощью непараметрического критерия Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе пациентов с РЛОЭ активность каспазы-2 и каспазы-3 была достоверно выше у пациентов с ведущим тревожным синдромом по сравнению с контролем и с пациентами с ведущим депрессивным синдромом (рис. 1). Активность каспазы-8 и каспазы-9 была повышена в лимфоцитах пациентов с ведущим тревожным синдромом по сравнению с контрольной группой и группой пациентов с ведущим депрессивным синдромом (рис. 2). В целом наблюдаются одинаковые тенденции в изменении активности всех измеренных каспаз внутри данной группы пациентов: при депрессивном синдроме они понижены по сравнению с контролем, а при тревожном повышены как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой пациентов с ведущим депрессивным синдромом.

Активность каспазы-2 была наиболее высокой в лимфоцитах пациентов с РДР: она была повышена как по сравнению с контролем, так и по сравнению

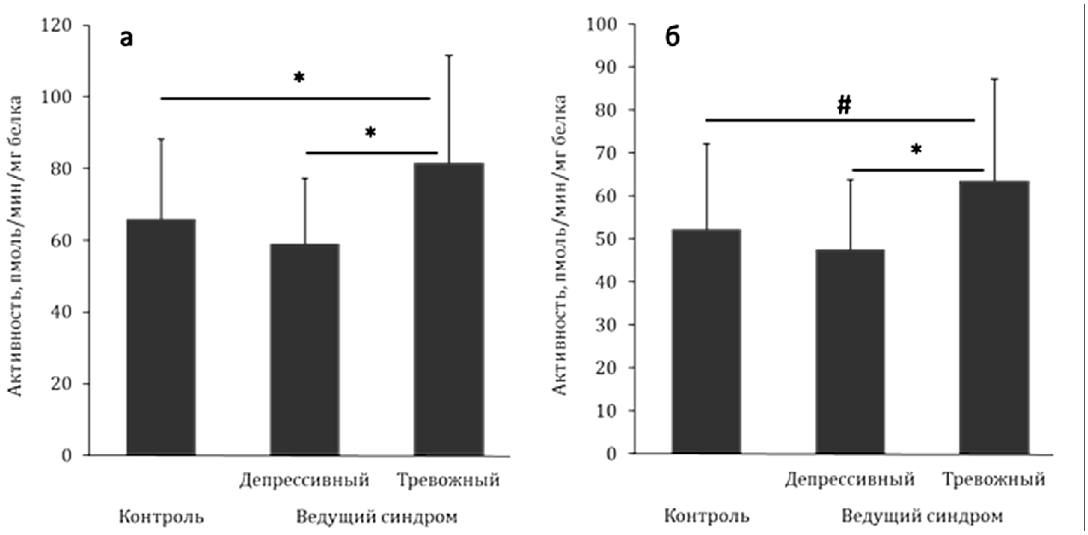

Рисунок 1. Активность протеаз, пкмоль/мин·мг белка, в лимфоцитах пациентов с диагнозом расстройство личности в связи с сосудистым заболеванием головного мозга, а - каспазы-2, б - каспазы-3. * - $p<0,05$, # - $p<0,10$.

с пациентами с РЛОЭ и СТДР (рис. 3а). Сходные изменения активности наблюдали и для каспазы-8, но с меньшим уровнем достоверности (рис. 4а). Активность каспазы-3 в лимфоцитах также была повышена у пациентов с РДР по сравнению с пациентами с РЛОЭ и СТДР (рис. 3б). Активность каспазы-9 была повышена у пациентов с РДР по сравнению с пациентами с РЛОЭ (рис. 4б).

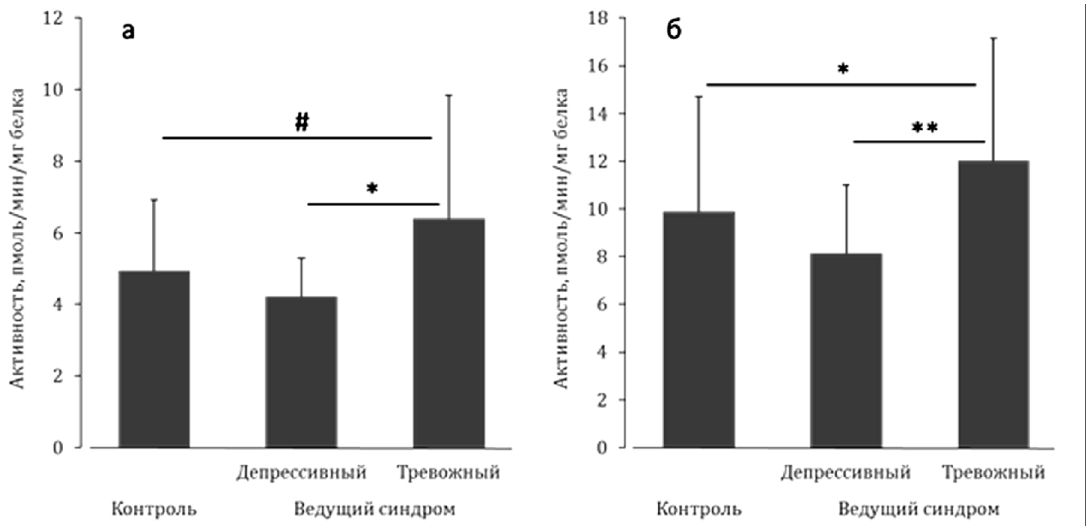

Рисунок 2. Активность протеаз, пкмоль/мин·мг белка, в лимфоцитах пациентов с диагнозом расстройство личности в связи с сосудистым заболеванием головного мозга, а - каспазы-8, б - каспазы-9. ** - p<0,01, * - p<0,05, # - p<0,10.

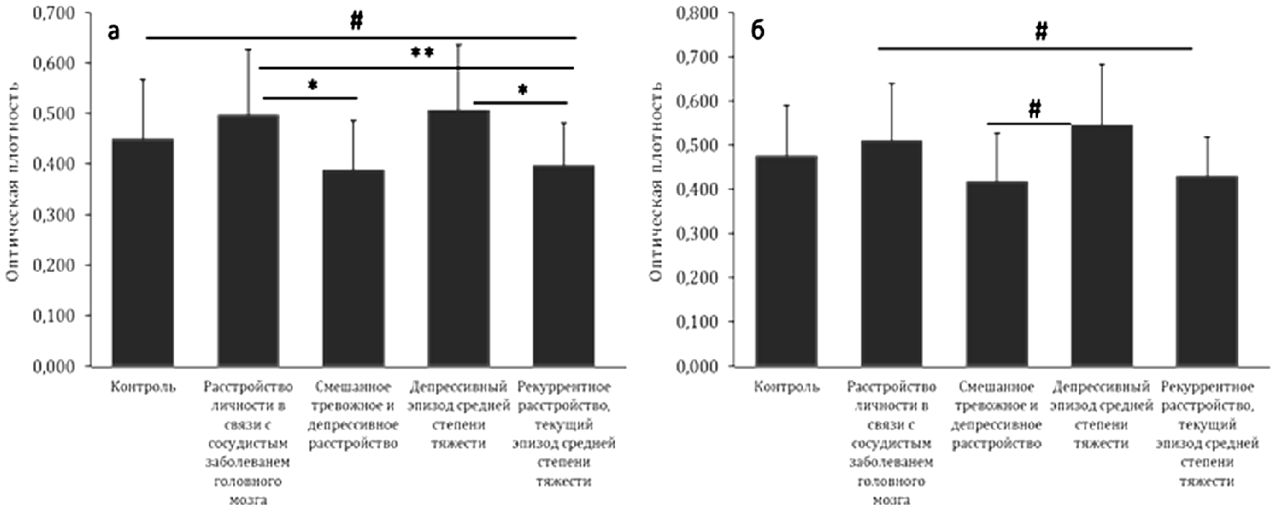

Рисунок 3. Активность протеаз, пкмоль/мин·мг белка, в лимфоцитах пациентов с ведущим депрессивным синдромом, а - каспазы-2, б - каспазы-3. ** - p<0,01, * - p<0,05.

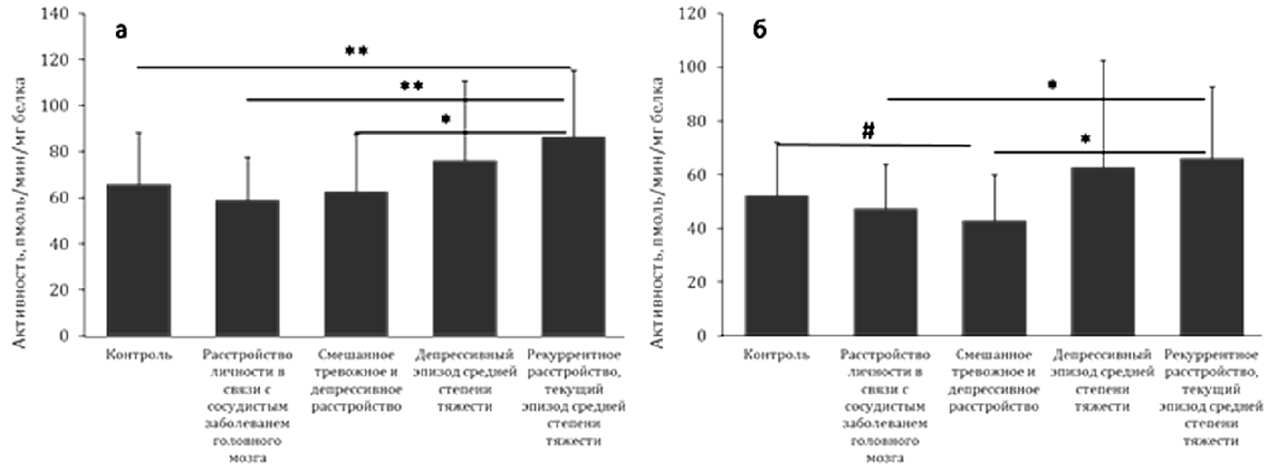

Рисунок 4. Активность протеаз, пкмоль/мин·мг белка, в лимфоцитах пациентов с ведущим депрессивным синдромом, а - каспазы-8, б - каспазы-9. * - p<0,05, # - p<0,10.

Ранее было показано усиление клеточной гибели лимфоцитов у пациентов с депрессивным расстройством [3], найдены типы клеток, наиболее подверженных апоптотической клеточной гибели, а также сделаны попытки объяснения механизмов индукции апоптоза в лимфоцитах у пациентов с депрессией [4]. В нашей работе оценивали апоптоз в лимфоцитах, выделенных из крови пациентов, с помощью измерения активности инициаторных каспаз, задействованных в разных путях активации апоптоза (каспазы-2, -8 и -9), а также основной эффекторной каспазы (каспазы-3). У группы пациентов с РЛОЭ с ведущим тревожным синдромом наблюдается тенденция к увеличению активности всех измеренных каспаз, что может говорить об активации апоптоза в лимфоцитах, выделенных из крови этих пациентов.

При сравнении групп пациентов с ведущим депрессивным синдромом между собой наиболее значимые отличия наблюдались у пациентов с РДР: в лимфоцитах, выделенных из их крови, активность каспазы-2 и -8 была повышена по сравнению с контролем. Это может быть признаком того, что при данном заболевании в лимфоцитах пациентов происходит активация апоптоза, причем по такому пути, который связан с повреждениями ДНК, внутриклеточным стрессом или внеклеточными сигналами, но не с повреждением митохондрий. Статистически значимые отличия активности всех измеренных каспаз у данной группы пациентов были обнаружены при сравнении с группой пациентов с депрессией, обусловленной РЛОЭ (каспаза-2, -3, -8 и -9), а также СТДР (каспаза-2, -3, -8). У пациентов с ведущим тревожным синдромом повышена активность всех измеренных каспаз при диагнозе РЛОЭ, а именно расстройство личности в связи с сосудистым заболеванием головного мозга. По этим данным можно сделать предварительный вывод об активации апоптоза в лимфоцитах таких пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

У пациентов с пограничными психическими расстройствами на фоне органических повреждений обнаружено увеличение активности каспаз в лимфоцитах, свидетельствующее об активации апоптоза в этих клетках. Мы предполагаем, что апоптотическая гибель лимфоцитов может являться одним из звеньев развития патологии у людей с органическими поражениями головного мозга, в первую очередь у пациентов с преобладанием тревожного, но не депрессивного синдрома.

При сравнении активности каспаз в лимфоцитах пациентов с разными диагнозами, но одним и тем же ведущим депрессивным синдромом установлено, что у пациентов с РДР активность этих ферментов была повышена по сравнению с пациентами с РЛОЭ и со СТДР, что может свидетельствовать об отличиях в процессах, происходящих в лимфоцитах крови и связанных с поддержанием клеточного гомеостаза, у пациентов с различными видами пограничных психических расстройств.

Активности протеаз лимфоцитов представляются перспективными показателями для разработки обладающих диагностической, прогностической, и патогенетической валидностью маркеров разных видов пограничных психических расстройств.

Выполнено при финансовой поддержке РНФ, грант № 14-25-00136.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schmidt H.D., Shelton R.C., Duman R.S.* (2011) Neuropsychopharmacology, **36**, 2375-2394.
2. *Gladkevich A., Kauffman H.F., Korf J.* (2004) Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr., **28**, 559-576.
3. *Eilat E., Mendlovic S., Doron A., Zakuth V., Spirer Z.* (1999) J. Immunol, **163**, 533-534.
4. *Szuster-Ciesielska A., Siotwińska M., Stachura A., Marmurowska-Michałowska H., Dubas-Ślemp H., Bojarska-Junak A., Kandefer-Szerszeń M.* (2008) Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatr., **32**, 686-694.

Поступила: 18. 07. 2015.
Принята к печати: 23. 10. 2015.

ACTIVATION OF CASPASES IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH DEPRESSION AND ANXIETY

E.S. Gerasimovich[1], A.A. Yakovlev[2,3], T.A. Druzhkova[3], M.N. Grishkina[3], A.B. Guekht[3], N.V. Gulyaeva[2,3]

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[2]Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 5a Butlerova str., Moscow, 117485 Russia; e-mail: al_yakovlev@rambler.ru
[3]Scientific Clinical Center of Psychoneurology, Moscow, Russia

The processes in the nervous and immune systems are closely interrelated. In particular, increased apoptosis was reported in lymphocytes of patients with depression. The aim of this study was to assess activities of proteases associated with cell death in lymphocytes of patient with personality disorders accompanied by depression and anxiety. In patients with personality disorders associated with organic brain dysfunction caspase activities were reduced in patients with depression and increased in patients with anxiety. The results may be useful for elucidation of pathogenetic mechanisms of personality disorders and in search of new biomarkers of these diseases.

Key words: depression, anxiety, lymphocytes, apoptosis, caspases, plasma peptides