

ИЗМЕНЕНИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ МОЛЕКУЛЫ АЛЬБУМИНА ПРИ МЕЛАНХОЛИЧЕСКОЙ ДЕПРЕССИИ В ДИНАМИКЕ ФАРМАКОТЕРАПИИ: РЕГИСТРАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ СУБНАНОСЕКУНДНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2016 г. Т.И. Сырейщикова*, Н.В. Смолина** ***, В.В. Бриллиантова** ***, М.Г. Узбеков***, Г.Е. Добрецов**

*Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 53;

**ФНКЦ Физико-химической медицины, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а;

***Московский НИИ психиатрии – филиал ФМИЦПН им. В.П. Сербского Министерства здравоохранения РФ, 107076, Москва, ул. Потешная, 3

E-mail: esmoline@mail.ru

Поступила в редакцию 31.05.16 г.

Конформация связывающих центров молекулы альбумина сыворотки крови человека чувствительна к патологическим процессам. В работе исследованы изменения физико-химических параметров связывающих центров альбумина при меланхолической депрессии. Детектором этих изменений служил флуоресцентный репортер К-35 (N-карбоксихенилиимид диметиламинонафталевой кислоты, CAPIDAN). Показано, что затухание флуоресценции К-35 зависит от состояния лекарственных связывающих центров альбумина. Кинетику затухания измеряли с разрешающей способностью по времени около 30–50 пс. Параметры, характеризующие затухание флуоресценции К-35 в сыворотках, достоверно реагировали на меланхолическую депрессию и на динамику ее лечения. При меланхолической депрессии было обнаружено снижение концентрации неэстерифицированных длинноцепочечных жирных кислот, которые в сыворотке могут оказывать влияние на связывающие центры альбумина. Однако изменения связывающих центров альбумина не могут быть объяснены вариациями концентрации этих кислот. Вероятно, при депрессии появляются другие факторы, под действием которых изменяются структура и физико-химические свойства альбумина.

Ключевые слова: депрессия, альбумин, флуоресцентный зонд К-35, разрешенная во времени спектроскопия.

Депрессии являются одним из наиболее частых и тяжелых психических расстройств. На сегодняшний день в медицинской практике отсутствуют объективные лабораторные показатели, с помощью которых можно было бы оценить тяжесть состояния больного и эффективность проводимой терапии на начальных стадиях депрессии. Поэтому актуальным является поиск показателей – биомаркеров – которые бы «чувствовали» течение депрессивных состояний и эффективность их терапии [1]. В работе [2] авторами был сделан вывод, что диагностически важные признаки психических заболеваний, возможно, удалось бы найти на периферии, прежде всего – в крови. Высказыва-

ется предположение о возможной эндогенной интоксикации организма и о вероятном повреждении у пациентов с шизофренией главной функции альбумина (транспортной и детоксикационной) и обострении эндотоксикоза [3–5]. Результаты клинических исследований, проводимых авторами в течение нескольких десятилетий на большом клиническом материале [6–16], показали, что при стрессе, шизофрении и некоторых видах депрессии изменяются физико-химические свойства связывающих центров транспортного белка – альбумина. Основным методом исследования при этом являлась флуоресцентная спектроскопия в субнаносекундном диапазоне. Использование флуоресцентных зондов [17,18] выявило нарушения в центрах связывания больных с первым эпизодом шизофрении [3] и больных тревожной [19] и меланхолической депрессией [14].

Сокращения: К-35 – N-карбоксихенилиимид диметиламинонафталевой кислоты, ЧСА – сывороточный альбумин человека, НЭЖК – длинноцепочечные неэстерифицированные жирные кислоты.

Цель настоящей работы – с помощью субнаносекундной флуоресцентной спектроскопии попытаться обнаружить показатели, характеризующие изменения альбумина при меланхолической депрессии в процессе лечения пациентов. Регистрация подобных изменений в дальнейшем в сочетании с клинико-биохимическими данными могла бы сделать более точной раннюю индивидуальную оценку эффективности психотерапии и прогноз развития заболевания при депрессиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуоресцентный зонд К-35 (N-карбоксифенилид диметиламинонафталевой кислоты, другое название – CAPIDAN) был синтезирован и любезно предоставлен Б.М. Красовицким и сотрудниками (Институт монокристаллов НАН Украины, Харьков, Украина). В экспериментах использован свободный от жирных кислот лиофилизированный препарат альбумина человека (ЧСА) фирмы Sigma-Aldrich (США; Lot No. A1887). ЧСА растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе (Sigma-Aldrich, США), содержащем 0,137 М NaCl и 0,01 М фосфата натрия, рН 7,4; пальмитиновую кислоту (Sigma-Aldrich, США; Lot No. 61H24601). Водный раствор 1,4 мМ К-35 в воде добавляли к раствору ЧСА в буфере до необходимой концентрации.

Концентрация неэстерифицированных жирных кислот в сыворотках определялась энзиматическим (калориметрическим) методом (набор реактивов FA 115 фирмы Randox, Великобритания). Измерение концентрации альбумина в сыворотке проводили флуоресцентным [8] и бромкрезоловым методами.

Были обследованы 22 пациента с диагнозом меланхолической (тоскливой) депрессии, находившихся на лечении в клинике Московского НИИ психиатрии Министерства здравоохранения РФ. Клиническая картина и критерии включения и исключения из исследования описаны в работе [14]. В контрольную группу вошли 54 здоровых волонтера без соматической и психической патологии, сопоставимые по полу и возрасту с группой пациентов. От всех обследованных было получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей и заключением локального этического комитета Московского научно-исследовательского института психиатрии.

У каждого пациента брали образцы крови три раза: до лечения (22 сыворотки), после 15 дней лечения (20 сывороток) и после 30 дней лечения (17 сывороток) препаратом велафаксин.

Сыворотки крови пациентов разбавляли в 20 раз фосфатно-солевым буферным раствором. В каждый образец сыворотки добавляли флуоресцентный зонд К-35 до конечной концентрации 30 мкМ. При этом около 95% полной интенсивности флуоресценции излучается молекулами К-35, связанными с альбумином [15]. Амплитуды затухания зонда нормированы на концентрацию ЧСА в данной сыворотке так, что молярное соотношение К-35/ЧСА составляло около единицы.

Измерение затухания флуоресценции зонда К-35, связанного с сывороточным альбумином, проводили в нано- и пикосекундном диапазоне на лазерной установке, созданной в Физическом институте им. П.Н. Лебедева РАН [14,19]. Флуоресценцию возбуждали быстрой вспышкой лазера ($7 \cdot 10^{-10}$ с). С помощью персонального компьютера на базе процессора AMD Sempron были автоматизированы как процесс измерения, так и обработка экспериментальных данных (программы TimeHarp и FluoFit фирмы PicoQuant).

Перед измерением каждой сыворотки проводилось измерение кинетики затухания флуоресценции калибратора (раствор 3-метоксибензантрона в этаноле). Это позволяло сопоставлять интенсивности флуоресценции, измеренные в разные дни, и использовать калибратор как стандарт амплитуды, чтобы рассчитать число флуоресцирующих молекул зонда К-35 в сыворотках [20].

Данные для больных депрессией представляли как среднее \pm ошибка среднего или как индивидуальные показатели для каждого больного. Достоверность различий оценивали с использованием критерия Вилкоксона (для связанных выборок). Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Статистика 6.0 и Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие зонда К-35 с молекулой альбумина. Затухание флуоресценции К-35, связанного с альбумином, при субнаносекундном разрешении описывается суммой экспонент ([21], формула (1)):

$$F(t) = \sum_{i=1}^{i=3} A_i \exp(-t/\tau_i); \quad B = b \sum_{i=1}^{i=3} A_i \tau_i; \quad s_i = A_i \tau_i / B,$$

где t – время после поглощения света, $F(t)$ – интенсивность флуоресценции в момент t , A_i – амплитуды трех экспонент, τ_i – время затухания их флуоресценции, произведение $A_i \tau_i$ пропорционально полному потоку света флуоресцен-

Средние значения амплитуд ($A_{\text{деп}}$) и полной интенсивности ($B_{\text{деп}}$) флуоресценции зонда К-35 для пациентов до лечения, после 15-ти и 30-ти дней лечения

	Количество человек	$A_{1\text{деп}}/A_{1\text{дон}}$, усл.ед.	$A_{2\text{деп}}/A_{2\text{дон}}$, усл.ед.	$A_{3\text{деп}}/A_{3\text{дон}}$, усл.ед.	$B_{\text{деп}}/B_{\text{дон}}$, усл.ед.
Доноры	54	$1,00 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,03$
Пациенты (до терапии)	22	$1,23 \pm 0,05$	$1,21 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,04$
Пациенты (15 дней терапии)	20	$1,09 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,03$
Пациенты (30 дней терапии)	17	$0,97 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,07$	$1,03 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,02$

Примечание. Все значения нормированы на среднее значение соответствующего показателя для доноров ($A_{\text{дон}}$ и $B_{\text{дон}}$), данные представлены как $M \pm m$.

ции, излучаемому i -й компонентой, B – полная интенсивность флуоресценции, b – приборная константа, s_i – доли полного потока флуоресценции в каждой экспоненте.

В изолированном из сыворотки, обезжиренном ЧСА при физиологических условиях (рН 7,4; ионная сила 0,159 М) значения времен затухания флуоресценции и среднеквадратичные ошибки их измерения (включая ошибки фитирования) близки к следующим: 7,7–9,5 нс для τ_1 , 2,8–3,5 нс для τ_2 , 0,7–1,1 нс для τ_3 [21].

Затухание флуоресценции при депрессии.

Анализ всех параметров затухания флуоресценции зонда К-35 в сыворотках доноров и больных пациентов до и после лечения препаратом велафаксином показал следующее: до лечения пациентов средние значения амплитуд A_1 , A_2 и A_3 в сыворотках этих пациентов достоверно выше, чем в группе доноров. Применение критерия Вилкоксона к независимым выборкам доноров и пациентов показало достоверное различие между этими группами ($p < 0,025$). В процессе лечения происходит спад интенсивности флуоресценции зонда К-35 (параметр B) и ее приближение к флуоресценции доноров.

В таблице приведена динамика изменений средних значений амплитуд и полной интен-

сивности флуоресценции К-35 для пациентов до лечения, после 15-ти и 30-ти дней лечения.

Относительные (в сравнении с соответствующим параметром для доноров) изменения всех трех амплитуд в процессе лечения меланхолической депрессии почти одинаковые (различия – в пределах нескольких процентов). Полная интенсивность флуоресценции также уменьшается в процессе лечения. Проведенные ранее измерения в группе тревожной депрессии выявили изменения только параметра A_1 [19].

Введем параметры, характеризующие относительные изменения амплитуд в процессе лечения:

$$\Delta_1 \equiv \frac{A_{1\text{after}} - A_{1\text{before}}}{A_{1\text{before}}}; \quad \Delta_2 \equiv \frac{\left(\frac{A_3}{A_1}\right)_{\text{after}} - \left(\frac{A_3}{A_1}\right)_{\text{before}}}{\left(\frac{A_3}{A_1}\right)_{\text{before}}},$$

где Δ_1 – относительное изменение амплитуды затухания К-35; A_1 , $A_{1\text{before}}$ – амплитуда затухания К-35 для пациентов с меланхолической депрессией до лечения, $A_{1\text{after}}$ – амплитуда затухания К-35 для пациентов после 30-ти дней

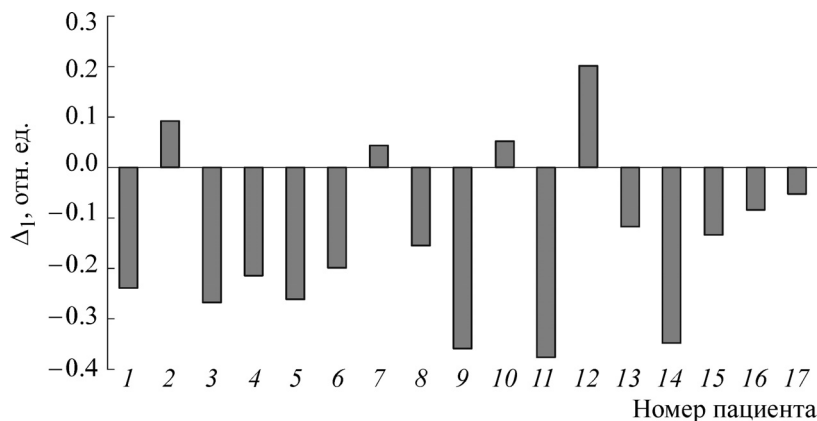


Рис. 1. Показатель Δ_1 (относительное изменение амплитуды затухания A_1) для пациентов с меланхолической депрессией за 30 дней лечения велафаксином.

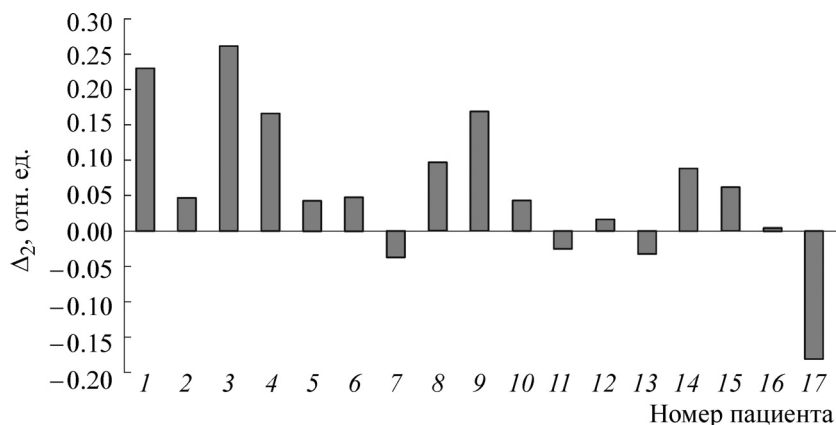


Рис. 2. Показатель Δ_2 (изменение отношения амплитуд затухания К-35 A_3 и A_1) для пациентов с меланхолической депрессией после 30-ти дней лечения велафаксином.

лечения велафаксином, Δ_2 – изменение отношения амплитуд затухания К-35 A_3 к A_1 , $(A_3/A_1)_{\text{before}}$ – отношение амплитуд для пациентов до начала лечения, $(A_3/A_1)_{\text{after}}$ – отношение амплитуд после 30-ти дней лечения велафаксином.

На рис. 1 и 2 представлены показатели Δ_1 и Δ_2 для 17 пациентов, больных меланхолической депрессией. Как видно, снижение A_1 и рост A_3/A_1 являются типичными результатами лечения. Двухсторонний T -критерий Стьюдента показал, что в среднем для группы из 17-ти пациентов амплитуда A_1 достоверно снижается с $p < 0,01$.

Показатели τ_i и s_i достоверно не изменялись.

Таким образом, удалось зарегистрировать односторонние изменения в структуре молекулы альбумина у пациентов с диагнозом меланхолическая депрессия после проведенной терапии. Различия между амплитудами функций затухания флуоресценции до и после лечения составили 15–20% и значимы на уровне 1%. Величина изменений надежно регистрируется. Это позволило сделать вывод, что примененный метод может рассматриваться как потенциально полезный для объективной оценки эффективности фармакотерапии, а исследованные параметры могут служить потенциальными биомаркерами.

Изменение содержания жирных кислот в сыворотках больных меланхолической депрессией. ЧСА является переносчиком длинноцепочечных неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в крови, причем эти кислоты влияют на лекарственные связывающие центры. К-35 весьма чувствителен к количеству НЭЖК, связанных с ЧСА: при увеличении молярного соотношения НЭЖК/ЧСА до трех интенсивность флуоресценции увеличивается в полтора раза, а соотношение A_3/A_1 возрастает более чем в три раза [22].

Чтобы выяснить, не являются ли НЭЖК причиной изменений флуоресценции при депрессии, величины НЭЖК/ЧСА были определены в сыворотках 26 доноров и 18 больных депрессией. Оказалось, что у больных депрессией количество жирных кислот, приходящихся на молекулу альбумина, достоверно ниже, почти в два раза, чем у здоровых.

Такое уменьшение концентрации НЭЖК в сыворотке могло бы привести к снижению всех трех амплитуд A_i [22]. Действительно, в модельных смесях НЭЖК + ЧСА было показано, что флуоресцентные показатели тесно коррелируют с отношением НЭЖК/альбумин (рис. 3 и 4). Отношение амплитуд A_3/A_1 в области молярных

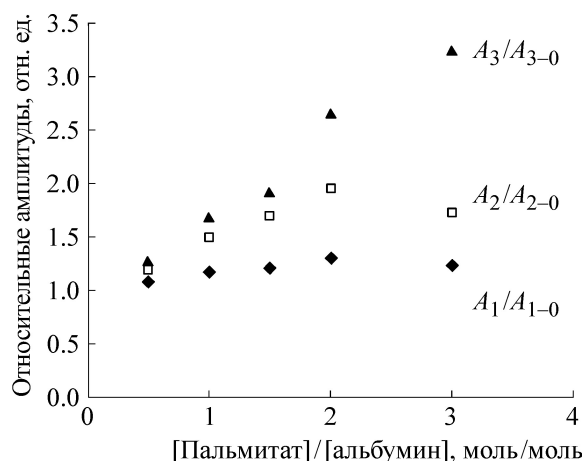


Рис. 3. Влияние пальмитата на амплитуды флуоресценции зонда К-35 в обезжиренном ЧСА. Концентрации ЧСА и К-35 равны 16 мкМ. A_{1-0} , A_{2-0} , A_{3-0} – амплитуды трех компонент затухания флуоресценции К-35 в отсутствие пальмитата; A_1 , A_2 , A_3 – в присутствии пальмитата. По горизонтальной оси – молярное отношение пальмитат/ЧСА, по оси ординат – амплитуды затухания К-35, нормированные на соответствующую амплитуду в отсутствие пальмитата.

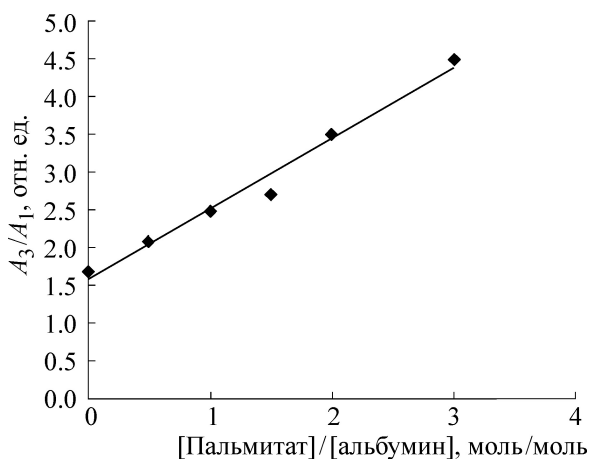


Рис. 4. Изменение отношения амплитуд A_3/A_1 флуоресценции зонда К-35 в обезжиренном сывороточном альбумине при добавлении пальмитата. Концентрации ЧСА и К-35 равны 25 мкМ. По оси молярное отношение пальмитат/ЧСА, по оси ординат – отношение амплитуд A_3/A_1 .

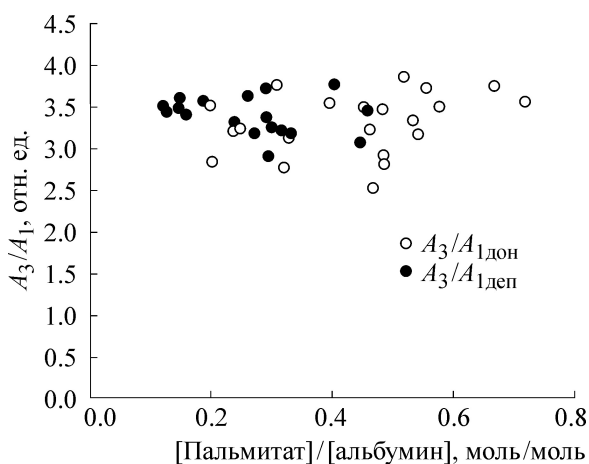


Рис. 5. Зависимость отношения A_3/A_1 для доноров ($A_3/A_{1\text{дон}}$) и пациентов ($A_3/A_{1\text{деп}}$) с меланхолической депрессией от относительной концентрации НЭЖК.

концентраций НЭЖК/альбумин от 0 до 3 аппроксимировалось линейной зависимостью с величиной достоверности линейной связи $R_2 = 0,99$.

Однако при исследовании затухания К-35 в сыворотках доноров и больных депрессией корреляции между параметрами флуоресценции зонда и содержанием жирных кислот не обнаружены (рис. 5).

Вероятно, изменения молекулы альбумина не сводятся к вариациям концентрации НЭЖК в сыворотке, т.е. существуют какие-то факторы помимо НЭЖК, которые влияют на молекулу альбумина. Эти факторы нарушены при мелан-

холической депрессии и изменяются в процессе ее лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Mossner, O. Mikova, E. Koutsilieri, et al. **8** (3), 141 (2007).
2. G. Stober, D. Ben-Shachar, M. Cardon, et al., *World J. Biol. Psychiatry* **10** (2), 127 (2009).
3. Y. A. Gryzunov, T. I. Syreishchikova, M. N. Komarova, et al., *Nucl. Instrum. Methods Physics Res.* **448** (Section A), 478 (2000).
4. Т. Н. Соколова, Н. В. Смолина, Э. Ю. Мисионжник и др., *Клин. лаб. диагн.* **9**, 71 (2005).
5. М. Г. Узбеков, Н. В. Смолина Э. Ю. Мисионжник и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова* **108** (5), 67 (2008).
6. Ю. А. Грызунов, Э. Ю. Мисионжник, М. Г. Узбеков и др. *Клин. лаб. диагн.* **5**, 31 (1994).
7. Ю. А. Грызунов и Г. Е. Добрецов, *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине* (Ириус, М., 1994).
8. Ю. А. Грызунов и Г. Е. Добрецов, *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине* (Геотар, М., 1998).
9. Ю. М. Лопухин, Г. Е. Добрецов и Ю. А. Грызунов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **130** (7), 4 (2000).
10. Y. Gryzunov, E. Koplik, N. Smolina, et al., *Stress* **9** (1), 59 (2006).
11. Т. И. Сырейщикова, Ю. А. Грызунов, Н. В. Смолина и др. *Альм. клин. мед.* **17** (1), 94 (2008).
12. N. Smolina, Y. Gryzunov., T. Syreishchikova, et al., *Eur Arch. Psy. Clin. N* **259** (Suppl. 1), 98 (2009).
13. M. G. Uzbekov, E. Y. Misionzhnik, I. Y. Gurovich, et al., *Acta Neuropsychiatr.* **25** (5) 268 (2013).
14. Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина, М. Г. Узбеков и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова* **1** (2) 56 (2015).
15. Y. A. Gryzunov and G. E. Dobretsov, in *Protein Conformation: New Research*, Ed. by L. B. Roswell (Nova Publishes, New York, 2008), pp. 125–159.
16. G. E. Dobretsov, T. I. Syreishchikova, N. V. Smolina, et al., in *Human Serum Albumin: Functional Structure, Synthesis and Therapeutic Uses*, Ed. by T. Stokes (Nova Publishes, New York, 2015), pp. 129–173.
17. Ю. А. Владимиров и Г. Е. Добрецов, *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран* (Наука, М., 1980).
18. Г. Е. Добрецов, *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов* (Наука, М., 1989).
19. Т. И. Syreishchikova, Y. A. Gryzunov, N. V. Smolina, et al., *Laser Physics* **20** (5), 1074 (2010).
20. G. E. Dobretsov, Y. A. Gryzunov, T. I. Syreishchikova, et al., *J. Fluorescence* **8** (1), 27 (1998).
21. G. Dobretsov, V. Polyak, N. Smolina, et al., *J. Photochem. Photobiol. A* **251**, 134 (2013).
22. Г. Е. Добрецов, Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **153** (3), 300 (2012).

Albumin Binding Site Alteration in Melancholic Depression under Pharmacotherapy: Registration with the Use of Subnanosecond Fluorescence Spectroscopy

T.I. Syrejshchikova*, **N.V. Smolina** *****, **V.V. Brilliantova** *****,
M.G. Uzbekov***, and **G.E. Dobretsov****

**Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 53, Moscow, 119991 Russia*

***Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, ul. Malaia Pirogovskaia 1a, Moscow, 119435 Russia*

****Moscow Research Institute of Psychiatry, Branch of Serbsky Federal Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, ul. Poteshnaia 3, Moscow, 107076 Russia*

It is known that conformation of human serum albumin binding sites is sensitive to pathological process. In this work changes in physical-chemical properties of albumin binding sites in melancholic depression were studied. A fluorescent probe, K-35 (N-carboxyphenylimide of dimethylaminonaphthalic acid, CAPIDAN) was used as a reporter of these changes. It was shown that the decay of K-35 fluorescence depends on the state of the albumin drug-binding sites. Decay kinetics was measured with a time-resolution of about 30–50 ps. The parameters, characterizing K-35 fluorescence decay in serum, reflected melancholic depression and dynamics of medications. In melancholic depression a decrease in the concentration of nonesterified, long-chain fatty acids, capable of influencing binding sites of serum albumin, was observed. However, variation in the concentration of these acids cannot be considered as a cause of albumin binding site alterations. Probably, when depression is present, there are another factors upon which changes in the structure and physico-chemical properties of albumin occur.

Key words: depression, albumin, fluorescent probe K-35, time-resolved spectroscopy