

УДК 577.158.7:616.89

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПРИ НЕВРОТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

© 2012 г. Л. П. Смирнова, С. А. Иванова, Н. М. Кротенко, Л. А. Левчук,
Е. В. Гуткевич, В. Я. Семке

НИИ психического здоровья СО РАМН, г. Томск

Поступила в редакцию 05.02.2010 г.

Изучались изменения в балансе про и антиоксидантных систем у лиц в состоянии психической дезадаптации, развившейся под воздействием эмоционального стресса. Выявлена активация перекисного окисления липидов, связанная с увеличением количества малонового диальдегида в эритроцитах и сыворотке крови у обследованных лиц. Активность каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах у лиц в состоянии психического стресса была увеличена, а глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы достоверно снижена в сравнении с группой здоровых людей. Сравнительный хемилюминесцентный анализ общих антиоксидантных свойств сыворотки крови изучаемых групп также выявил снижение антиоксидантных свойств крови под действием психического стресса.

Ключевые слова: психический стресс, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты.

В современном мире человек постоянно подвергается воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Его психическое состояние в любой момент может быть оценено с позиции адаптации–дезадаптации. Ганс Селье констатировал, что независимо от природы действующего стресса, в организме запускается неспецифическая, генетически детерминированная реакция защиты: происходит изменение в процессах саморегуляции гормональных и иммунных функций стрессированного организма [1].

Расстройства психической адаптации при действии эмоционального стресса часто выражаются в виде невротических расстройств. Невротические расстройства, представляя собой срыв адаптации организма, вне зависимости от причины, ее вызвавшей, часто запускают изменения общебиологических механизмов адаптации системы при нарушении условий среды обитания. Возникающие изменения зависят от силы, продолжительности действия и природы стрессора, а также от способности нейроэндокринных механизмов организма элиминировать влияние стресса [2, 3, 4]. Невротические расстройства в подавляющем большинстве случаев классифицируются как пограничные состояния и характеризуются симптомами, выявляющими нарушение адаптации организма, изменением комплекса гомеостатических и адаптационных реакций [5].

В частности, при невротических расстройствах выявлена активация свободнорадикальных процессов на уровне всего организма. Антиоксидантный статус организма определяется балансом про-

и антиоксидантных механизмов, и является одним из факторов, корректирующих степень функциональных и органических нарушений при психических расстройствах [6]. Как известно, уровень активности антиоксидантной системы отражает гомеостаз и состояние адаптивных функций организма. Действие внешних прооксидантов, недостаток поступления облигатных антиоксидантов и активация эндогенной генерации активных форм кислорода приводят к напряжению механизмов антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса, который может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В изученной нами литературе не представлены данные по изучению активности антиоксидантных ферментов в клетках крови у лиц с нарушением психической адаптации под действием эмоционального стресса.

Целью настоящей работы явилось оценка уровня перекисного окисления липидов, активности антиоксидантных ферментов и общих антиоксидантных свойств сыворотки крови у лиц, подвергнутых действию психического стресса, в сравнении со здоровыми людьми.

МЕТОДИКА

Было проведено комплексное клинко-биологическое исследование лиц, подвергшихся действию психического стресса, в связи со смертью близкого человека, разводом, потерей работы или возникновением острой конфликтной ситуации в семье или на работе, или другими значимыми при-

чинами. Все обследованные лица проходили курс лечения в отделении пограничных состояний клиники НИИ психического здоровья СО РАМН г. Томска. Диагностическая оценка и клиническая квалификация невротических расстройств проводились врачами-психиатрами отделения в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), шифр F4 “Невротические, связанные со стрессом и соматоформные расстройства”. Диагностика невротозов осуществлялась с учетом принятых критериев, к которым относятся причинная связь с психотравмирующей ситуацией, невротические особенности личности и симптоматика. Группа лиц с невротическими расстройствами включала 50 человек. Группу контроля составили 40 психически и соматически здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту исследуемой группе. Критерий включения людей в исследование: отсутствие хронических соматических заболеваний, наркомании и алкоголизма; добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось согласно протоколу, утвержденному локальным биоэтическим комитетом в соответствии с Хельсинкским соглашением по правам человека.

Изучено состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) по концентрации малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и сыворотке крови у лиц с невротическими расстройствами и контрольной группы. Также определялась активность антиоксидантных ферментов (АОФ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах здоровых людей и у лиц с психической дезадаптацией, проведен сравнительный биолуминесцентный анализ антиоксидантных свойств сыворотки крови изучаемых групп.

У обследуемых лиц брали кровь из локтевой вены утром, натощак, до начала лекарственной терапии. Кровь, стабилизированную гепарином, центрифугировали при 1500 об/мин, осаждая эритроциты. После трех кратной отмывки средой Хенкса эритроциты подвергали гемолизу дистиллированной водой в соотношении 1 : 10. АОФ изучали в супернатанте после центрифугирования гемолизата при 30000 g 45 мин при 4°C. Активность всех изучаемых ферментов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Schumacher. Для получения сыворотки пробирку с венозной кровью центрифугировали при 1500 об/мин 30 мин, сыворотку использовали для определения количества МДА и антиоксидантных свойств.

МДА определяли по методу Камышникова [7] по концентрации ТБК (тиобарбитуровая кислота) — активных продуктов в эритроцитах и сыворотке крови. Активность глутатионпероксидазы (ГП) определяли по увеличению количества НАДФН (NADPHN) в реакции с использованием гидроперекиси третбутила [8]. Активность глута-

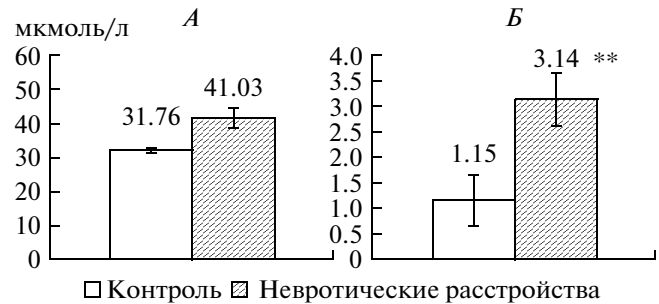


Рис. 1. Концентрация малонового диальдегида: А — в эритроцитах у здоровых лиц и у лиц с невротическими расстройствами, Б — в сыворотке крови у контрольной группы и у лиц с невротическими расстройствами.

** — уровень статистически значимых различий с контролем ($p < 0.05$).

тионредуктазы (ГР) определяли по скорости снижения концентрации НАДФН в реакции с использованием окисленного глутатиона [9]. Активность глутатион-S-трансферазы (ГТ) определяли по образованию хромогенных конъюгатов глутатиона с 1-хлоро-2,4-динитробензолом [10]. Активность каталазы определяли по скорости снижения количества перекиси водорода [11]. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) определяли по скорости образования НАДФН [12]. Расчет активности ферментов производили на мг белка. Содержание белка в исследуемом образце определяли по методу Бредфорда [13]. Определение антиоксидантных (АО) свойств сыворотки крови проводили по изменению люминолзависимой биолуминесценции [14].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных статистических программ STATISTICA 6.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона—Манна—Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате нашего исследования обнаружено достоверное увеличение концентрации МДА в эритроцитах у лиц с нарушениями психической адаптации (41.02 ± 2.35 мкмоль/л) по сравнению с контрольной группой (31.76 ± 1.78 мкмоль/л) (рис. 1, А). Количество МДА в сыворотке у лиц с невротическими расстройствами также было повышено в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой лиц (рис. 1, Б). Увеличение количества МДА свидетельствует об активации процессов ПОЛ у лиц, подвергнувшихся действию психического стресса.

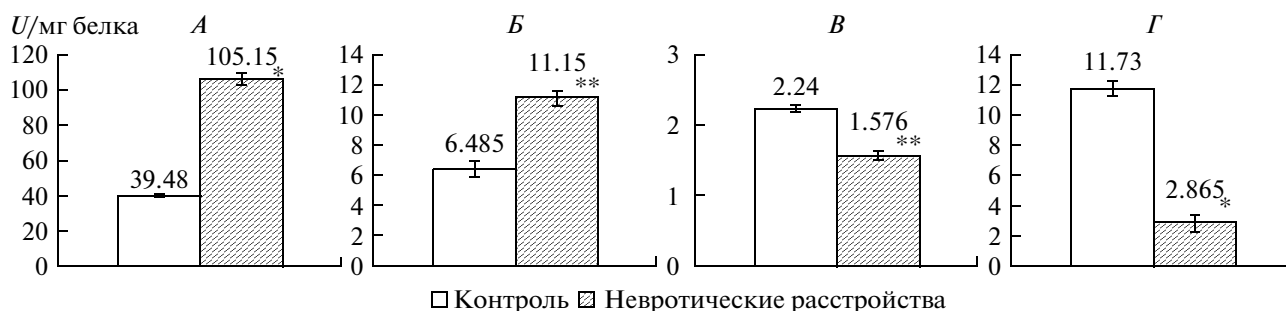


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов. А — активность каталазы ($U = \text{мМ перекиси водорода/мин}$) в эритроцитах у здоровых лиц и у лиц с невротическими расстройствами.

Б — активность глутатионпероксидазы ($U = \text{мкМ НАДФ-Н/мин}$) в эритроцитах у здоровых и у лиц с невротическими расстройствами.

В — активность глутатионредуктазы ($U = \text{мкМ НАДФ-Н/мин}$) в эритроцитах у группы контроля и у лиц с невротическими расстройствами.

Г — активность глутатион-S-трансферазы ($U = \text{мкМ НАДФ-Н/мин}$) в эритроцитах у здоровых лиц и у лиц с невротическими расстройствами.

* Звездочками обозначен уровень статистически значимых различий с контролем: * — $p < 0.01$, ** — $p < 0.05$.

Полученные нами результаты позволяют предположить, что у людей с расстройствами психической адаптации наблюдается активация окислительного стресса, что согласуется с данными литературы о вовлеченности окислительного стресса в патофизиологические механизмы нарушений метаболической адаптации при заболеваниях, связанных с воздействием стрессогенных факторов [15, 16, 17]. Нарушение структурной организации мембран приводит к повышению уровня цитозольного Ca^{2+} и неконтролируемому запуску каскада Ca^{2+} -зависимых реакций. Высокая концентрация Ca^{2+} приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, что сопровождается увеличением коферментов и субстратов в восстановленной форме и создает условия для дополнительной генерации активных форм кислорода (АФК) [18, 19, 20].

Обнаружено, что активность каталазы в эритроцитах у лиц с невротическими расстройствами достоверно выше (в 2.7 раза) значений контрольной группы ($p < 0.01$) (рис. 2, А). Активность глутатионпероксидазы (ГП) в эритроцитах лиц с расстройствами психической адаптации также достоверно (в 1.7 раза) превышала показатели контрольной группы ($p < 0.05$) (рис. 2, Б).

ГП катализирует реакцию восстановления нестойких органических гидропероксидов, включая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот мембран, в стабильные оксикислоты. Кроме того, все изоформы ГП, подобно каталазе, утилизируют гидропероксид водорода. В ходе исследования нами было обнаружено повышение активности каталазы и ГП в эритроцитах лиц с невротическими расстройствами. Это объясняется тем, что процессы ПОЛ накапливают содержание липо- и гидроперекисей в клетке, что приводит к

субстратной активации каталазы и ГП. Сродство ГП к перекиси водорода выше, чем у каталазы, поэтому глутатионзависимая пероксидаза более эффективно работает при низких концентрациях перекиси водорода, в то же время в защите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями перекиси водорода, ключевая роль принадлежит каталазе [21]. Поскольку ГП эффективно нейтрализует гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, функциональный акцент фермента, вероятно, смещается в сторону стабилизации поврежденных мембранных структур. Субстратное увеличение активности ГП и каталазы в эритроцитах лиц, подвергнувшихся действию психического стресса, позволяет вернуть окислительно-восстановительный потенциал клетки к исходному состоянию и, предположительно, может являться благоприятным прогностическим фактором в оценке возможности организма активировать свои ресурсы в ответ на неблагоприятные факторы.

Причиной повышения уровня ПОЛ в органах и тканях может быть не только усиление генерации активных кислородных метаболитов, но и недостаточная эффективность антиоксидантов. Важную роль в антиоксидантной защите (АОЗ) играют SH-содержащие пептиды, особое место среди которых занимает глутатион. Его антиоксидантная роль реализуется, в основном, как кофактора ферментов — ГП и ГТ. Чрезмерное образование окисленного глутатиона при инактивации H_2O_2 и гидроперекисей липидов само по себе является неблагоприятным для клетки фактором, поэтому глутатиондисульфид постоянно восстанавливается в реакции, катализируемой ГР.

Активность глутатионредуктазы в эритроцитах у пациентов с невротическими расстройствами

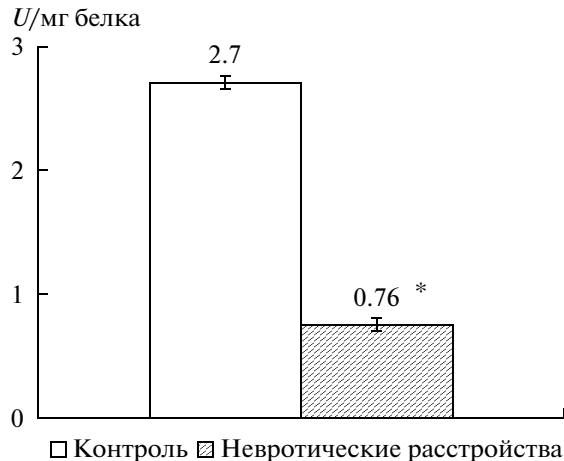


Рис. 3. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ($U = \text{мкМ НАДФ-Н/мин}$) в эритроцитах у здоровых лиц и у лиц с невротическими расстройствами.

* — уровень статистически значимых различий с контролем ($p < 0.01$).

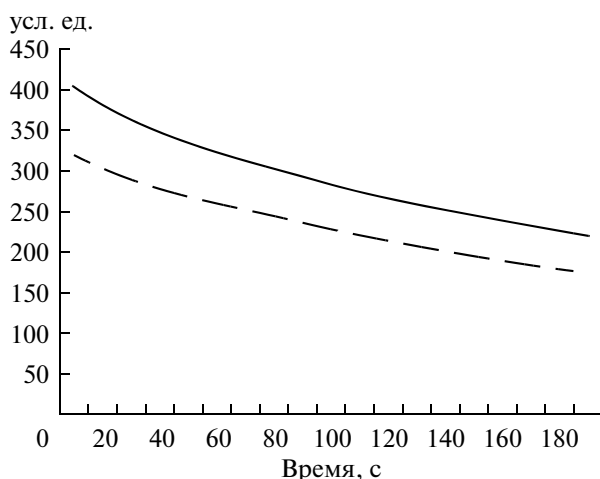


Рис. 4. Способность сыворотки крови снижать люминесценцию в модельной системе: гемоглобин—перекись водорода—люминол у контрольной группы (штриховая линия) и у лиц с невротическими расстройствами (сплошная линия).

Различия достоверны при $p < 0.05$.

была достоверно ниже (в 1.4 раза) этого показателя у лиц контрольной группы ($p < 0.05$) (рис. 2, В). Этот факт можно рассматривать как дезадаптивный эффект, препятствующий поддержанию необходимого уровня глутатиона, усиленно расходующего при окислительном стрессе.

Также была исследована активность глутатион-S-трансферазы (ГТ), которая, подобно ГП, способна восстанавливать гидропероксигруппы жирных кислот окисленных фосфолипидов непосредственно в мембранах, а также, конъюгировать с глутатионом токсичные продукты ПОЛ (децина-

ли, холестерин- α -оксид), способствуя их выведению из организма. ГТ является одним из ключевых ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков и ряда важных эндогенных метаболитов [22]. Активность ГТ была снижена в 4.1 раза у лиц с нарушениями психической адаптации (рис. 2, Г). Глутатион-трансферазная активность при наличии окислительного стресса в клетке может подавляться вследствие активации фосфолипазы A2 [23] и появления избытка свободных жирных кислот. Угнетение ГТ при окислительном стрессе выступает свидетельством дисбаланса в окислительном метаболизме и становится одним из проявлений нарушения окислительно-восстановительного равновесия в клетке.

Активность Г6ФДГ в эритроцитах у лиц с неврозами достоверно ниже этого показателя у лиц контрольной группы, она в эритроцитах у лиц под действием психического стресса снижается в 3.5 раза. (рис. 3). С глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакцией начинается аэробное превращение фосфогексоз, в результате которого происходит генерация пентозофосфатов — необходимых компонентов таких важных соединений клетки, как нуклеиновые кислоты, многие коферменты и т.д. Кроме того, в процессе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции происходит образование восстановленной формы НАДФ — неременного участника многих окислительно-восстановительных процессов в организме, в частности, НАДФН восстанавливает окисленный глутатион. Обнаруженное нами снижение активности Г6ФДГ также может внести свой вклад в снижение активности ГР и ГТ.

Индивидуальный уровень продукции свободных радикалов можно оценить по интегральной хемилюминесценции сыворотки крови. Интенсивность хемилюминесценции обратно пропорциональна активности антиоксидантной системы. По скорости снижения интенсивности хемилюминесценции судят об общей антиоксидантной активности сыворотки крови. Антиоксидантные свойства сыворотки крови, выраженные в способности сыворотки крови тушить свободно-радикальную люминесценцию, достоверно ($p < 0.05$) снижены (291.79 ± 12.67 отн. ед. за 3 мин измерения с интервалом в 10 с) у лиц с расстройством психической адаптации, относительно контрольной группы (232.20 ± 9.95 отн. ед.) (рис. 4). Отклонение от нормы способности сыворотки крови тушить спонтанную хемилюминесценцию выявлено не только при различных патологических состояниях, но и при некоторых предпатологических состояниях (длительный эмоциональный стресс, предельные физические нагрузки) [24]. Нами обнаружено достоверное снижение общей антиоксидантной активности сыворотки крови у лиц с невротическими расстройствами по сравнению с контрольной группой, что, в свою очередь,

свидетельствует о дезадаптационных процессах у лиц, подвергнувшихся действию психического стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из патогенетических звеньев, вызывающих изменения в уровне реагирования ЦНС у человека, находящегося в состоянии психической дезадаптации, является усиление свободнорадикальных процессов и развитие окислительного стресса на уровне всего организма. Причины, вызывающие интенсификацию свободнорадикальных процессов, могут быть разными, но процессы генерации активных форм кислорода имеют неспецифичный характер. Общим же механизмом является усиление свободнорадикальных процессов и нарушение мобилизации антиоксидантной защиты в ответ на повышение активности прооксидантных систем.

В результате нашего исследования у лиц в состоянии психической дезадаптации обнаружен дисбаланс в работе системы антиоксидантной защиты организма. Активность каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах больных возрастает в связи с увеличением в организме количества активированных кислородных метаболитов, появление которых обусловлено окислительным стрессом, вызванным психотравмирующим воздействием. Выявлено достоверное снижение активности глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у лиц с расстройствами психической адаптации. Эти изменения свидетельствуют о срыве общих адаптационных механизмов, снижении индуцибельных свойств ферментов, а это, в свою очередь, приводит к потере способности эритроцитов к утилизации возросшего количества АФК в организме. Анализ общих антиоксидантных свойств сыворотки крови изучаемых групп также выявил снижение антиоксидантных свойств сыворотки крови под действием психического стресса.

Таким образом, выявленные изменения свидетельствуют об активации окислительного стресса на организменном уровне при психической дезадаптации, а также — о вовлеченности антиоксидантных ферментов в патогенез адаптационных нарушений на клеточном уровне при невротических расстройствах, вызванных психогенным стрессом.

Работа выполнена при поддержке РГНФ (грант № 08-06-00284а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenberg B.D., Hamer D.H., Sabol S.Z. Role of the serotonin transporter gene in temperament and character // J. Personal. Disord. 1999. V. 13. P. 312.
2. Меерсон Ф.З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. М.: Нур. Мед. LtD, 1993. С. 332.
3. Северин Е.С. Биохимические основы патологических процессов: учебное пособие. М.: Медицина, 2000. С. 304.
4. Александров Ю.И. Психофизиология: учебник для вузов. СПб., 2007. С. 464.
5. Семке В.Я., Гуткевич Е.В., Иванова С.А. Психосоциальные и биологические факторы психической дезадаптации (на модели невротических расстройств). Томск, 2008. 204 с.
6. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. 1991. Т. 29. С. 241.
7. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / в 2-х томах. Минск: Беларусь, 2000. Т. 2. С. 463.
8. Litteel C., O'Brien P.J. An intracellular GSH—peroxidase with a lipid peroxide substrate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. V. 31. P. 145.
9. Carbery J., Mannervick B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 5475.
10. Keen J.H., Habing W.H., Jakoby W.B. Mechanisms for several activities of the glutathione—S—transferase // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 6183.
11. Beers R.F., Sizer J.W. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme actand oxidant resistance // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 133.
12. Суханова Г.А., Мамонтова И.П., Сальник Б.Ю. Энзимология. Томск, 1983. 76 с.
13. Bredford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. № 72. P. 248.
14. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., Сидоров Ю.С. Перекисное окисление липидов в биомембранах. М.: Медицина, 1975. 176 с.
15. Жуков А.О. Патогенез психических расстройств, возникающих в условиях дефицита йода // Педиатрия. Consilium medicum. 2006. № 1. С. 107.
16. Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г. Неврозы и перекисное окисление липидов. М.: Наука, 1991. 144 с.
17. Барабой В.А. Роль перекисного окисления в механизме стресса // Физиологический журнал. 1989. Т. 35. С. 5.
18. Зенков Н.К., Ланкин В.Э., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК “Наука / Интерпериодика”, 2001. 343 с.
19. Саприн А.С., Калинина Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биологической химии. 1999. Т. 39. С. 289.
20. Бабичаев М.А., Савов В.М., Каган В.Е. Образование комплексов анион—радикалов суперокиси с кальцием // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1983. № 11. С. 47.

21. Бондарь Т.Н., Ланкин В.З., Антоновский В.Л. Восстановление органических гидропероксидов глутатионпероксидазой и глутатион-S-трансферазой: влияние структуры субстрата // Докл. АН СССР. 1989. Т. 304. № 1. С. 217.
22. Carr A., Frei B. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide // Free Rad. Biol. Med. 2000. V. 28. P. 1806.
23. Wilce M.C.J., Parker M.W. Structure and function of GST // Biochem. Biophys. Acta. 1994. V. 1205. P. 1.
24. Теровский С.С., Снигирева Г.Я., Гусев С.И. и др. Характеристика показателей окислительного стресса у лиц с психическими расстройствами, находящихся в условиях пенитенциарных учреждений // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2006. Приложение 41. С. 281.

Characteristics of Oxidative Stress in Mental Maladaptation

L. P. Smirnova, S. A. Ivanova, N. M. Krotenko, L. A. Levchuk, E. V. Gutkevich, V. Ya. Semke

Changes in the balance of pro and antioxidant systems were studied in persons in state of mental maladaptation, developed under the influence of emotional stress. Activation of lipid peroxidation has been revealed associated with increase of amount of malondialdehyde in erythrocytes and blood serum in persons surveyed. Activity of catalase and glutathione peroxidase in erythrocytes in persons in state of mental stress was increased and glutathione preductase, glutathione-S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase has been reliably reduced as compared with group of healthy people. Comparative chemiluminiscent analysis of common antioxidant properties of serum of blood of studied groups has also revealed decrease of antioxidant properties of blood under influence of mental stress.

Keywords: mental stress, POL, antioxidant enzymes.