

## ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ КАК ИНДИКАТОР ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ МЕЛАНХОЛИЧЕСКОЙ ДЕПРЕССИИ

© 2019 г. Т.И. Сырейщикова, Н.В. Смолина\*, В.В. Бриллиантова\*,  
Е.Д. Сыромятникова, М.Г. Узбеков\*, Г.Е. Добрецов\*\*

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

*\*Московский научно-исследовательский институт психиатрии (филиал НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского МЗ РФ), 107076, Москва, ул. Потешная, 3*

*\*\*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а*

*E-mail: esmoline@mail.ru*

Поступила в редакцию 11.07.18 г.

После доработки 24.10.18 г.

Принята к публикации 19.11.18 г.

Проведены поиски таких показателей сыворотки крови, которые могли бы быть связаны с состоянием больного психическими расстройствами. Подобные показатели нужны для объективной оценки этого состояния в отличие от превалирующих ныне методик субъективной оценки. Измеряли кинетику затухания триптофановой флуоресценции альбуминовой фракции сыворотки больных меланхолической депрессией (до курса лечения) в сравнении с фракциями от здоровых доноров. Основной вклад во флуоресценцию вносили остатки триптофана-214, расположенного в непосредственной близости от первого лекарственного центра молекулы альбумина. Форма кинетики затухания была представлена в виде суммы трех экспонент, описываемых тремя временами затухания  $\tau_i$  (в области 6,5, 2,8 и 1,0 нс) и тремя амплитудами  $A_i$ . Величины  $\tau_i$  оказались близкими для обеих групп лиц. Напротив, соотношение амплитуд  $A_1/A_3$  достоверно различалось у пациентов и доноров. Возможно, величину  $A_1/A_3$  можно рассматривать как показатель наличия или отсутствия меланхолической депрессии у пациентов до начала курса лечения.

*Ключевые слова: затухание флуоресценции, триптофан, сывороточный, альбумин, меланхолическая депрессия.*

**DOI:** 10.1134/S0006302919010149

Диагностика и лечение психических расстройств нуждаются в объективных методах контроля состояния пациента и эффективности терапии, тогда как в настоящее время превалируют методы субъективного описания этого состояния. Показатели, с помощью которых можно было бы поставить объективный диагноз и оценить эффективность проводимой терапии, на сегодняшний день в медицинской практике лечения психических заболеваний отсутствуют. Поэтому в настоящее время наиболее актуальным является поиск показателей – биофизических и биохимических биомаркеров, которые бы «чувствовали» течение депрессивных состояний и эффективность их терапии [1].

Важной целью является обнаружение корреляторов болезни, которые могут быть использованы в качестве диагностических средств. В работе [2] обсуждаются потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода. В работе [3] сделано предположение, что диагностически важные признаки психических заболеваний, возможно, удалось бы найти на периферии, прежде всего в крови.

Альбумин сыворотки крови активно изучается не только как белок с уникальными свойствами и функциями, осуществляемыми в организме, но и как биомаркер патологических процессов.

Альбумин в крови выполняет функцию связывания и транспорта к органам и тканям различных веществ, таких как билирубин, жир-

Сокращение: ЧСА – сывороточный альбумин человека.

ные кислоты, стероидные гормоны, производные аминокислот, лекарственные препараты, ксенобиотики и др. [4,5].

У пациентов с психическими расстройствами предполагается возможная эндогенная интоксикация организма и вероятное повреждение главной функции белка крови альбумина (транспортной и детоксикационной). Можно полагать, что при эндогенной интоксикации в организме создаются условия для образования форм альбумина с измененными физико-химическими характеристиками, что препятствует обмену между тканями и сосудистым руслом, переносу токсинов к органам, выполняющим функции детоксикации и биотрансформации.

Такая биологическая жидкость, как кровь, является очень удобным объектом для изучения флуоресцентными методами. Используются как внешние, так и внутренние флуоресцентные зонды. Адекватная и объективная регистрация конформационных изменений молекулы альбумина стала возможной в результате применения специальных флуоресцентных зондов и прежде всего флуоресцентного зонда К-35. Зонд К-35 связывается с первым лекарственным центром домена II молекулы альбумина. Флуоресценция зонда в сыворотке крови является показателем, который сравнительно легко измеряется и который весьма чувствителен к изменениям состава и структуры белков сыворотки [6,7].

Результаты клинических исследований альбумина, проводимых авторами в течение нескольких десятилетий на достаточно большом клиническом материале [8–14], показали, что при некоторых психических заболеваниях – стрессе, шизофрении и некоторых видах депрессии – изменяются конформация и соответственно физико-химические свойства транспортного белка крови альбумина. При развитии патологических процессов в организме конформационные изменения белков являются скорее правилом, чем исключением.

Использование разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии является дополнительным элементом для анализа структурных изменений в молекуле альбумина.

Появляется возможность избирательно следить за состоянием различных центров, излучающих флуоресценцию с различной длительностью. Метод позволяет легко обнаружить нарушение связывающей способности альбумина. В недавних наших работах [11–14] показано, что использование флуоресцентного зонда К-35 и импульсной флуоресцентной спектроскопии с субнаносекундным разрешением позволили выявить изменения в свойствах трех связывающих центров альбумина у больных меланхолической

и тревожной депрессией и больных с первым эпизодом шизофрении по сравнению со свойствами альбуминовых центров у здоровых доноров. Эти изменения указывают, что при психических заболеваниях изменена конформация молекулы альбумина, что может отражаться на функциональном состоянии этого белка.

В качестве внутреннего люминесцентного зонда белков наиболее часто используются аминокислотные остатки тирозинов и триптофанов. Последние обладают высокой чувствительностью их флуоресценции к изменениям микроокружения (т.е. растворителя, рН, присутствия тушителя, малой молекулы или соседних групп в белке). От микроокружения зависит интенсивность флуоресценции остатка. Флуоресценция триптофанового остатка весьма чувствительна к изменению структуры его окружения в белке, поэтому триптофан используется как репортер структурных изменений белков, в частности альбумина [15–17]. В сывороточном альбумине человека (ЧСА) имеется только один остаток триптофана. Этот центр расположен во второй  $\alpha$ -спирали второго домена (субдомена IIА) молекулы ЧСА в положении 214 полипептидной цепи в непосредственной близости от так называемого первого центра связывания лекарств [18]. В ЧСА излучение при длинах волн  $> 295$  нм поглощает главным образом триптофан, поэтому возбуждение в области от 295 до 305 нм позволяет селективно наблюдать за состоянием окружения Trp214. Кинетика затухания флуоресценции триптофана активно изучалась в работах [19–21].

Целью настоящей работы является попытка обнаружить изменение показателей, характеризующих кинетику флуоресценции внутреннего зонда – триптофана – в альбуминовых фракциях сывороток пациентов с меланхолической депрессией с помощью субнаносекундной флуоресцентной спектроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 14 пациентов и 14 здоровых доноров-волонтеров. Все пациенты наблюдались в периоде депрессивной фазы биполярного аффективного расстройства второго типа, что соответствует по шкале МКБ-10 рубрике F32, или текущему эпизоду (разной степени тяжести) в рамках рекуррентного депрессивного расстройства (F33). Анализ структуры депрессии позволил отнести изучаемые состояния к депрессиям меланхолического типа. Критериями исключения были расстройства шизофренического спектра, аддиктивные состоя-

ния, эпилепсия, наличие деменции. От всех обследованных пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводили в соответствии с Хельсинской декларацией об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей и заключением локального этического комитета Московского научно-исследовательского института психиатрии (протокол № 16 от 13.03.2017 г.). Кровь доноров и пациентов забирали натощак, сыворотку получали стандартным способом, все образцы хранили при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Из сывороток выделяли альбуминовую фракцию с помощью двухфазной системы «полиэтиленгликоль 3000/фосфатно-солевой буфер» (рН 6,4) [22]. Во всех фракциях были измерены концентрации альбумина с помощью метода бромкрезоловых красителей [23]. Среднеквадратичная ошибка среднего значения концентрации альбумина составляет 10%.

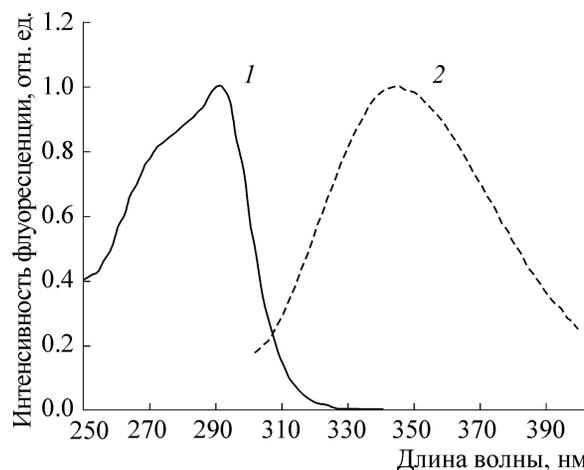
Альбуминовые фракции сывороток крови пациентов разбавляли в 10 раз фосфатно-солевым буфером (Sigma-Aldrich, США), содержащим 0,137 М NaCl и 0,01 М фосфата натрия, рН 7,4. В контрольную группу входили здоровые волонтеры без соматической и психической патологии, сопоставимые по полу и возрасту с группой пациентов (средний возраст 36  $\pm$  6 лет).

Измерения кинетики затухания флуоресценции были выполнены в ФИАНе на установке с пульсирующим источником света (LED) фирмы Pico-Quant (Германия) [11]. Флуоресценцию возбуждали быстрой вспышкой лазера длительностью  $7 \cdot 10^{-10}$  с. Длина волны возбуждения в пике составляла  $290 \pm 10$  нм, ширина спектра излучения лазера на уровне половины высоты пика равна 20 нм. На базе персонального компьютера с процессором AMD Sempron автоматизированы как процесс измерения, так и обработка экспериментальных данных (программы TimeHarp и FluoFit фирмы Pico-Quant). Для формального описания кинетики затухания флуоресценции триптофана требуется использовать сумму не менее трех экспонент:

$$F(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3) + \dots,$$

где  $t$  – время,  $\tau_i$  – постоянные времена затухания,  $A_i$  – амплитуды, пропорциональные количеству молекул с данным временем затухания [5,24].

Перед измерением затухания флуоресценции триптофана каждой альбуминовой фракции проводили измерение кинетики затухания флуоресценции калибровочного раствора – раствора изомера *L*-триптофана в фосфатно-солевом бу-



**Рис. 1.** Спектры возбуждения флуоресценции (1) и излучения (2) альбуминовой фракции крови пациента с меланхолической депрессией. Спектр 1 измерен при длине волны излучения 350 нм, спектр 2 измерен при длине волны возбуждения 290 нм. Типичная концентрация альбумина после разбавления альбуминовой фракции в 10 раз равна 20 мкМ.

фере и этаноле. Это позволяло сопоставлять интенсивности флуоресценции, измеренные в разные дни [5,25].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Спектры возбуждения и излучения ароматических аминокислотных остатков в альбуминовой фракции сыворотки пациента с меланхолической депрессией приведены на рис. 1 в диапазоне 250–400 нм. Каждый из спектров нормирован на свой пик. Спектры флуоресценции триптофана здоровых индивидуумов известны в литературе давно, начиная с середины двадцатого века. Приводить их еще раз представлялось излишним [15,26,27].

Интерпретация наносекундной кинетики затухания флуоресценции триптофана в белках является сложной задачей, потому что флуоресценция триптофана гетерогенна и не может быть охарактеризована одним временем жизни даже в простейших случаях – в растворе и в составе белков [15–17]. Это указывает на гетерогенность триптофановых остатков, различия в их взаимодействии с окружением, а также на реакции в возбужденном состоянии. В табл. 1 приведены измеренные в данной работе средние значения времен затухания флуоресценции ( $\tau_i$  в наносекундах), амплитуды и их соотношения для флуоресценции триптофана в альбуминовых фракциях сывороток доноров и пациентов и среднеквадратичные ошибки их средних значений ( $M \pm m$ ).

**Таблица 1.** Параметры функции затухания флуоресценции триптофана в альбуминовой фракции сывороток доноров и пациентов с меланхолической депрессией

	$\tau_1$ , нс	$\tau_2$ , нс	$\tau_3$ , нс	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_1/A_3$	$A_1/A_2$
Доноры	$6,45 \pm 0,02$	$2,72 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,02$	$440 \pm 12$	$585 \pm 16$	$285 \pm 7$	$1,54 \pm 0,04$	$0,75 \pm 0,01$
Пациенты до лечения	$6,55 \pm 0,03$	$2,83 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,01$	$378 \pm 5$	$576 \pm 18$	$327 \pm 15$	$1,16 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,01$

**Таблица 2.** Доли фотонов, испускаемых с каждым из трех времен затухания флуоресценции триптофана

	$V_1$	$V_2$	$V_3$
Доноры	$0,60 \pm 0,004$	$0,34 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,002$
Пациенты до лечения	$0,55 \pm 0,007$	$0,38 \pm 0,005$	$0,08 \pm 0,002$

Полученные величины  $\tau_i$  и степень гетерогенности затухания близки к типичной ситуации с белками, в частности с ЧСА [15]. Параметры затухания очень близки по величине в обеих группах пациентов. Из табл. 1 следует, что абсолютные значения времен затухания флуоресценции Trp214 у доноров и пациентов практически совпадают (до 0,1 нс), а из табл. 2 следует, что доли фотонов с данным временем  $V_i$  совпадают до 0,05. Однако численность популяции молекул триптофана (амплитуды  $A_i$ ), соответствующая данному времени излучения, варьирует.

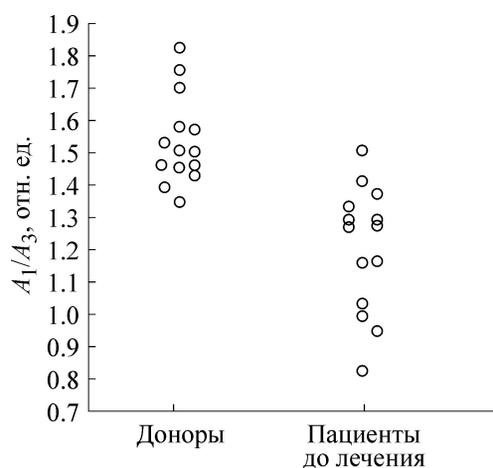
В табл. 2 приведены средние значения долей числа фотонов ( $V_i$ ), испускаемых с каждым из трех времен затухания, и среднеквадратичные ошибки их средних значений ( $M \pm m$ ). Эти величины соответствуют интенсивности стационарной флуоресценции.

$$V_i = \frac{A_i \tau_i}{\sum_1 A_i \tau_i}$$

Для оценки уровня достоверности различий между двумя исследованными группами здоровых доноров и пациентов с меланхолической депрессией для всех показателей, приведенных в табл. 1 и 2, был использован критерий Вилкоксона для независимых выборок. Для всех показателей, кроме  $A_2$ , различия между пациентами и донорами имеют  $p < 0,01$ ; для  $A_2 - p < 0,1$ .

Что касается амплитуд  $A_i$ , то часть погрешности их измерения обусловлена различием условий хранения разных сывороток и условий их измерений в разные дни.

Погрешности могут быть значительно уменьшены, если оперировать не интенсивностью флуоресценции, а формой кривой затухания. Форма может характеризоваться соотношением амплитуд разных компонентов затухания, например величиной  $A_1/A_3$ . Эти данные получены на фракции альбумина, выделенной из сыворотки крови. Поэтому небольшие изменения амплитуд могли бы быть следствием небольших колебаний концентрации альбумина во фракциях из-за процедуры выделения. Кроме того, разные сыворотки могут храниться разное время и измеряться в разные дни, что также может увеличить погрешность измерения амплитуд. Чтобы исключить этот концентрационный фактор, были использованы две процедуры. Во-первых, во всех фракциях были измерены концентрации альбумина с помощью метода бромкрезоловых красителей. Составлялось отношение измеренной концентрации альбумина пробы к концентрации средней, нормальной сыворотки (45 г/л или 34 мкМ в кювете для измерения). В предположении линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации альбумина, амплитуды каждой пробы приводились к средней интенсивности с учетом рассчитанных коэффициентов отношений. По этим данным выравнивали концентрации ЧСА в пробах. Во-вторых, было использовано соотношение амплитуд  $A_1/A_3$  и  $A_1/A_2$ , которое практически не зависит от концентрации ЧСА (см. табл. 1 и рис. 2). Как видно, соотношение амплитуд оказалось весьма чувствительным показателем наличия депрессии. Среднее значение показателя  $A_1/A_3$  различается с  $p = 0,01$ . Но что еще более важно – область перекрытия значений отношения  $A_1/A_3$  для здоровых доноров и больных мала: она вклю-



**Рис. 2.** Соотношения амплитуд  $A_1/A_3$  (произвольные единицы) затухания триптофановой флуоресценции альбуминовой фракции сыворотки больных меланхолической депрессией до лечения и здоровых доноров. Концентрация ЧСА во всех пробах близка к 20 мкМ. Средние значения соотношения амплитуд и их средне-квадратичные ошибки составляли  $1,16 \pm 0,05$  и  $1,54 \pm 0,04$  для пациентов и доноров соответственно.

чае только трех человек из 14. То есть чувствительность этого способа отнесения пациента к группе больных еще до лечения близка к 79%.

Были получены статистически достоверные различия для амплитуд ( $A_1$ ,  $A_3$ ) и отношений  $A_1/A_3$  и  $A_1/A_2$  (табл. 1). При этом амплитуды затухания флуоресценции больных были ниже амплитуд для альбуминовых фракций доноров. Полученные данные показали, что флуоресценция Trp214 указывает на изменения в структуре молекулы альбумина при психических заболеваниях.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе была исследована кинетика затухания триптофановой флуоресценции альбуминовой фракции сыворотки крови пациентов с меланхолической депрессией и здоровых доноров. В молекуле альбумина есть один остаток триптофана Trp214, располагающийся вблизи первого лекарственного центра. Кинетику затухания аппроксимировали суммой трех экспонент, которые соответственно описываются тремя временами затухания и тремя амплитудами. Источником этой флуоресценции являются в основном белки, прежде всего альбумин и иммуноглобулин. Показано, что отношение амплитуд  $A_1/A_3$  больных было выше отношения амплитуд для фракций доноров. Таким обра-

зом, для заболевания меланхолической депрессией наглядно показано изменение структуры молекулы альбумина при болезни.

Распределение параметра  $A_1/A_3$  в группе пациентов почти не перекрывается с распределением в группе доноров. Возможно, в сыворотке крови могут существовать факторы негормональной природы, коррелирующие с наличием психических расстройств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Mossner, O. Mikova, E. Koutsilieri, et al., *World J. Biol. Psychiatry* **8** (3), 141 (2007).
2. М. Г. Узбекиков, И. Я. Гурович и С. А. Иванова, *Социальная клин. психиатрия* **26** (1), 98 (2016).
3. G. Stober, D. Ben-Shachar, M. Cardon, et al., *World J. Biol. Psychiatry* **10** (2), 127 (2009).
4. *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине* под ред. Ю. А. Грызунова и Г. Е. Добрецова (Ириус, М., 1994), кн. 1.
5. Ю. А. Грызунов и Г. Е. Добрецов, *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине* (Геотар, М., 1998).
6. G. E. Dobretsov, T. I. Syrejschikova, N. V. Smolina, and M. G. Uzbekov, in: *Protein Biochemistry, Synthesis, Structure and Cellular Functions*, Ed. by T. Stokes (Nova Publishers, 2015), pp. 129–173.
7. G. Dobretsov, B. Polyak, N. Smolina, et al., *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **251**, 134 (2013).
8. Yu. A. Gryzunov, E. Koplik, N. Smolina, et al., *Int. J. on the Biology of Stress* **9** (1), 59 (2006).
9. M. G. Uzbekov, N. V. Smolina, E. Yu. Misionzhnik, et al., *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S. S. Korsakova* **108**, 67 (2008).
10. М. Г. Узбекиков, Н. В. Смолина, Э. Ю. Миссионжник и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова* **108** (5), 67 (2008).
11. T. I. Syrejschikova, Y. A. Gryzunov, N. V. Smolina, et al., *Laser Physics* **20** (5), 1074 (2010).
12. Т. И. Сырейщикова, Н. В. Смолина, М. Г. Узбекиков и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова* **115** (1) 56 (2015).
13. T. I. Syrejschikova, N. V. Smolina, V. V. Brilliantova, et al., *Biophysics* **6** (2), 286 (2017).
14. M. Uzbekov, E. Misionzhnik, A. Shmukler, et al., *Eur. Acta Neuropsychiatr.* **25** (5), 268 (2013).
15. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Ed. (Springer Science, New York, 2006).
16. Е. В. Немцева, О. О. Лащук и М.А. Герасимова, *Биофизика* **61** (2), 231 (2016).
17. Sh. Gorinstein, I. Goshev, S. Moncheva, et al., *J. Prot. Chem.*, **19** (8), 637 (2000).
18. U. Kragh-Hansen, *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 695 (2002).
19. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **19**, 1061 (2009).
20. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **24**, 93 (2014).
21. J. R. Albani, *J. Fluoresc.* **24**, 105 (2014).

22. A. Vasileva, M. Jakob, and F. Hasko, *J. Chromatogr.* **216**, 279 (1981).
23. B. T. Doumas, W. A. Watsonand, and H. G. Biggs, *Clin. Chim. Acta* **31**, 87 (1971).
24. G. E. Dobretsov, T. I. Syrejshchikova, Y. A. Gryzunov, and M. N. Yakimenko, *J. Fluoresc.* **8** (1), 27 (1998).
25. Y. A. Gryzunov, T. I. Syrejshchikova, M. N. Komarova, et al., *Nucl. Instrum. Methods Physics Res.* **448** (Section A), 478 (2000).
26. G. Wever, *Biochem. J.* **75**, 335 (1960).
27. Ю. А. Владимиров, *Фотохимия и люминисценция белков* (Наука, Москва, 1965).

## Time-Resolved Tryptophan Fluorescence as an Indication of Alterations in Serum Proteins in Melancholic Depression

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

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

\*\*Moscow Research Institute of Psychiatry (Branch of Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Addiction Psychiatry, Ministry of Health of the Russian Federation), Poteshnaya ul. 3, Moscow, 107076 Russia

\*\*\*Federal Research and Clinical Center of Physical Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119435 Russia

The aim of the work was to find such indicators of blood serum, which would be associated with the state of the patient with mental disorders. Such indicators are needed for an objective assessment of this state versus the prevailing subjective evaluation methodologies. The tryptophan fluorescence intensity decay kinetics of serum albumin fraction of patients with melancholic depression (before treatment) was compared to that of the fractions of healthy volunteers. Tryptophan-214 residues, located in the immediate vicinity of the first drug-binding center of the albumin molecule mainly contribute to the fluorescence emission. The decay kinetics was represented by a sum of three exponentials, described by three decay times  $\tau_i$  (in the 6.5, 2.8 and 1.0 ns region) and three amplitudes  $A_i$ . The values of  $\tau_i$  were close in both groups of individuals. In contrast, patients showed significant difference in the  $A_1/A_3$  amplitude ratio compared to donors. It is suggested that the  $A_1/A_3$  value can be considered as an indication of the presence or absence of melancholic depression in patients before starting treatment.

*Keywords: fluorescence intensity decay, tryptophan, serum albumin, melancholic depression*