

УДК 616-092

# Дифференциальное выявление аутоантител к $A\beta_{25-35}$ у пациентов с различной длительностью течения болезни Альцгеймера

Грудень М.А.<sup>1</sup>, Давыдова Т.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Патология ряда нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера, связана с агрегацией определенных белков и пептидов, приводящей к отложению амилоида в мозге. Показано, что иммунологические факторы также играют значительную роль в развитии данных заболеваний. **Целью** настоящей работы было сравнительное определение уровня аутоантител к префибриллярным (олигомерам) структурам  $A\beta_{25-35}$  в сыворотке крови пациентов с разным временем течения диагностированной болезни Альцгеймера по сравнению с возрастным контролем. **Методы.** Уровень антител к олигомерам  $A\beta_{25-35}$  выявляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа и выражали в титрах. **Результаты.** Обнаружено, что уровень аутоантител к олигомерам  $A\beta_{25-35}$  дифференциально меняется и зависит от продолжительности заболевания. Так, при 5-летней продолжительности болезни уровень аутоантител к олигомерам  $A\beta_{25-35}$  превышает в 2 раза таковой на начальных стадиях заболевания (1 год) и в сотни раз — возрастной контроль. Отмечено, что при продолжительности заболевания более 10 лет (15–20 лет) уровень антител к  $A\beta_{25-35}$  практически не меняется, что объясняется, вероятно, образованием иммунных комплексов. Полученные данные могут иметь практический интерес при разработке схем коррекции болезни Альцгеймера с учетом иммунных нарушений.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера;  $A\beta_{25-35}$ ; олигомеры; антитела; нейродегенерация.

**Для цитирования:** Грудень М.А., Давыдова Т.В. Дифференциальное выявление аутоантител к  $A\beta_{25-35}$  у пациентов с различной длительностью течения болезни Альцгеймера. Патогенез. 2018; 16(3): 105–107  
DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.105-107

**Для корреспонденции:** Грудень Марина Алексеевна, e-mail: mgruden@mail.ru

**Финансирование:** Работа не имеет спонсорской поддержки

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 19.08.2018

## Differential detection of autoantibodies to $A\beta_{25-35}$ in patients with different duration of Alzheimer's disease course

Gruden M.A.<sup>1</sup>, Davydova T.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

The pathology of a number of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease is associated with the aggregation of certain proteins and peptides, leading to the deposition of amyloid in the brain. It is shown that immunological factors also play a significant role in the development of these diseases. **The purpose** of this work was a comparative determination of the level of autoantibodies to prefibrillary (oligomers)  $A\beta_{25-35}$  structures in the blood serum of patients with different duration of the course of the diagnosed Alzheimer's disease compared with age control. **Methods.** The level of antibodies to oligomers  $A\beta_{25-35}$  was detected using enzyme-linked immunosorbent assay and expressed in titers. **Results.** It was found that the level of autoantibodies to  $A\beta_{25-35}$  oligomers varies differentially and depends on the duration of the disease. Thus, with a 5-year duration of the disease, the level of autoantibodies to oligomers  $A\beta_{25-35}$  is 2 times higher than in the initial stages of the disease (1 year) and the age control hundreds of times. It is noted that with a disease duration of more than 10 years (15–20 years), the level of antibodies to  $A\beta_{25-35}$  practically does not change, which is probably explained by the formation of immune complexes. The data obtained may be of practical interest in the development of correction schemes for Alzheimer's disease, taking into account immune disorders.

**Key words:** Alzheimer disease;  $A\beta_{25-35}$ ; oligomers; antibodies; neurodegeneration.

**For citation:** Gruden M., Davydova T.V. [Differential detection of autoantibodies to  $A\beta_{25-35}$  in patients with different duration of Alzheimer's disease course]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(3): 105–107 (in Russian)  
DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.105-107

**For correspondence:** Gruden Marina Alekseevna, e-mail mgruden@mail.ru

**Financing:** This work was no sponsorship.

**Conflict of Interest:** The authors state that there is no conflict of interest.

В настоящее время нейродегенеративные заболевания все больше привлекают к себе внимание во всем мире в связи с увеличением количества заболевших людей, а также социальными аспектами и экономическими затратами на лечение. Болезнь Альцгеймера (БА) — одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, приводящее к тяжелой деменции. Чаще всего БА развивается после 50 лет, хотя выявлены случаи диагностики заболевания в более ранних возрастных периодах. В настоящий момент БА диагностирована у 46 миллионов человек в мире и, по прогнозам ученых, в ближайшие 30 лет этот показатель может увеличиться втрое. Патогенетические причины БА до сих пор изучены недостаточно, хотя показано, что БА всегда сопровождается накоплением в тканях мозга белков с патологической структурой, а именно бета-амилоида (A-beta, A $\beta$ ) и Тау-белка [1]. Амилоидные бляшки в мозгу пациентов с БА образуются из небольших пептидов длиной в 39—43 аминокислот, именуемых A $\beta$ , которые являются фрагментами более крупного трансмембранного белка-предшественника — APP (Amyloid precursor protein), играющего важную роль в развитии, выживании и восстановлении нейронов после повреждений. При патологических условиях, ведущих к развитию БА, APP подвергается ограниченному протеолизу с образованием пептидных фрагментов, которые впоследствии образуют амилоидные структуры в виде олигомеров и фибрилл и со временем организуются в межклеточном пространстве в плотные образования, известные как сенильные бляшки. Амилоидная гипотеза, базирующаяся в случае БА на разрушительном влиянии A $\beta$  агрегатов на клетки мозга, на данный момент является одной из основных при рассмотрении патогенетических особенностей протекания БА [2]. Показано, что если клеточные механизмы не смогут устранить амилоидные агрегаты, то наблюдается увеличение экспрессии гена белка-предшественника. Кроме того, выявлена еще одна распространенная особенность амилоидных агрегатов, которая состоит в том, что они формируются при наличии определенных полипептидных затравок. Документировано, что олигомерные и префибриллярные структуры обладают выраженной цитотоксичностью. При этом, зрелые фибриллы по сравнению с олигомерными образованиями рассматриваются как более инертный материал, который может нанести некоторый токсический эффект, но в большей мере, причиняющий механический ущерб тканям и органам. До настоящего времени не решен вопрос о механизмах как индукции образования амилоидных агрегатов и амилоидных бляшек в мозгу, так и их устранения, и роли в прогрессировании заболевания [3]. На современном этапе существует большое количество доказательств того, что иммунологические факторы также играют значительную роль в развитии БА [4]. Показано, что в механизмах патогенеза БА участвует как периферическая иммунная система организма через моноциты и лимфоциты, так и собственная иммунная система мозга, включая участие системы комплемента и микроглии [5]. Однако вопрос о роли аутоиммунитета, в частности его гуморального звена, в развитии БА требует своего дальнейшего изучения.

В связи этим целью данной работы было сравнительное определение уровня аутоантител к A $\beta$ <sub>25-35</sub> в сыворотке крови пациентов с разным временем течения диагности-

рованной болезни Альцгеймера по сравнению с возрастным контролем.

### Материалы и методы исследования

В данном исследовании были использованы образцы сыворотки крови ментально здоровых людей (женщины,  $n = 45$ ) и 47 пациенток-женщин, отобранных из 300 семей с историей по БА, которым по рекомендациям Международной организации здравоохранения 1994 г. на основе психиатрических, неврологических и психологических тестов с критериями, описанными Mc Khann с соавт. [6] была диагностирована БА. Пациентам с БА проводили также компьютерную томографию мозга и магнитно-резонансную томографию для диагностики структурного очага поражения. Для установления степени когнитивных нарушений применяли вербальный и запоминающий тест (Mini-Mental State Examination, MMSE) [7]. Пациентов разделили на группы страдающих БА в течение 1 ( $n = 12$ ), 5 ( $n = 11$ ), 10 ( $n = 15$ ) и 15—20 лет ( $n = 9$ ). Все пациенты и их родственники выразили свое информированное согласие на участие в исследовании. В исследовании использовали амилоидогенный пептид A $\beta$ <sub>25-35</sub> — NH-2-GSNKGAIGLM-COOH (ИБХ РАН, Россия), сохраняющий токсические свойства A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Морфологию амилоидной структуры A $\beta$ <sub>25-35</sub> исследовали с помощью атомной силовой микроскопии на микроскопе Nanoscope Multimode (Digital Instruments, США) и PICO PLUS SPM (Molecular Imaging, США) в 2 мМ натрий бикарбонатном буфере (PBS) при pH 8,0 с использованием концентрации амилоида 20 мкг/мл, что соответствовало условиям твердофазного иммуоферментного анализа. Уровень сывороточных антител к амилоидогенным структурам A $\beta$ <sub>25-35</sub> определяли с использованием ИФА в 96-луночных планшетах из полистирола (Costar, США) с использованием 6 повторов образца в эксперименте. После инкубации 100 мкл на лунку раствора A $\beta$ <sub>25-35</sub>, планшеты промывали 3 раза PBS с 0,05% Твином 20, далее наносили 1% раствор БСА в PBS, pH 7,5 (Sigma, США) для устранения неспецифического связывания антигена и инкубировали в течение 2 ч при 4°C, затем отмывали PBS с 0,05% Твином 20. Образцы сывороток пациентов с БА наносили в отмытые лунки планшетов в 2-кратном разведении, начиная с разведения 1:2 и инкубируя 12 ч при 4°C. В отмытые от несвязавшихся с A $\beta$ <sub>25-35</sub>, иммуноглобулинов из сывороток PBS с 0,05% Твином 20 планшеты наносили конъюгат пероксидазы хрена, с козыми антителами к IgG человека (Amersham, Великобритания) с титром 1:1000. После отмывки избытка данного конъюгата PBS с 0,05% Твином 20, в лунки планшетов добавляли о-фенилендиамин (Сигма, США) в качестве субстрата пероксидазы хрена, инкубируют в течение 3 минут и далее измеряли абсорбцию при 492 нм с помощью планшетного ридера (Flow Lab., США). Результаты оценивали в титрах аутоантител к A $\beta$ <sub>25-35</sub>, при котором реакция фермент-субстрат давала величину оптической плотности, в два раза превышающую значение средней оптической плотности у возрастного контроля.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 7.0» с использованием межгрупповых сравнений по U критерию Манна—Уитни.

### Результаты исследования и обсуждение

В настоящее время возрастает интерес к использованию иммунокоррекции при лечении БА, в частности препаратов антител как к мономерным, так и амилоидным формам Аβ. Агрегация, приводящая к образованию амилоидов, приводит к их значительной неоднородности и разнообразию [8]. Это может препятствовать идентификации отдельных видов амилоидогенных форм, индуцирующих аутоиммунные реакции. В связи с этим в работе была детально изучена морфология олигомеров Аβ<sub>25-35</sub>, использованных в качестве антигенов для детекции аутоантител в сыворотке пациентов с БА. Наноимиджи олигомеров Аβ<sub>25-35</sub> морфологически напоминают сферические структуры, определяемые на стадии зарождения префибриллярных форм Аβ<sub>1-42</sub>, которые способны инициировать рост фибрилл. Однако, хотя мы не можем исключить наличие в нашем препарате олигомеров Аβ<sub>25-35</sub> присутствия мономера, мы учитывали его низкую иммуногенность. В связи с этим в работе использовали четко охарактеризованные методом атомно-силовой микроскопии префибриллярные амилоидные структуры Аβ<sub>25-35</sub> сферической формы.

Во всех образцах сыворотки крови пациентов с БА обнаружен повышенный уровень аутоантител к Аβ<sub>25-35</sub>, по сравнению с возрастным контролем ( $p < 0,05$ ). Так, в сыворотке крови здоровых людей с непатологическим старением титры аутоантител к Аβ<sub>25-35</sub> в среднем составили  $1:5,6 \pm 1:2,3$ . Обращает на себя внимание тот факт, что в работе обнаружена дифференциальная продукция аутоантел к Аβ<sub>25-35</sub>, которая напрямую зависит от продолжительности заболевания. Первоначально наличие иммунного ответа на Аβ<sub>1-42</sub>, обнаруженное у пациентов с БА, рассматривалось как защитная реакция организма и инструмент удаления токсических агрегатов, но анализ клинических данных показал, что аутоантитела к Аβ<sub>1-42</sub> могут инициировать и усугублять нейрональную дегенерацию и служить повреждающими факторами [9]. Так, паттерн аутоантител к Аβ<sub>25-35</sub> отличается ростом их уровня от 1 до 15 лет от начала заболевания. Показано, что титры аутоантител к Аβ<sub>25-35</sub> составляют у пациентов с БА продолжительностью 1 год  $1:256,2 \pm 1:20,8$ , 5 лет —  $1:512,3 \pm 1:16,1$ , 10 лет —  $1:380,8 \pm 1:80,2$ , 15—20 лет —  $1:340,0 \pm 1:48,5$  (во всех случаях при сравнении с контролем  $p < 0,05$ ), что косвенно может свидетельствовать о том, что образование аутоантител является динамическим процессом в мозге пациентов с БА и о вовлечении иммунной системы в процесс утилизации токсических форм Аβ<sub>25-35</sub> на ранних сроках течения БА. На более поздних сроках (10—20 лет) в работе не выявлено увеличения уровня аутоантител к амилоиду по сравнению с 5-летней продолжительностью БА, но их уровень повышен по отношению к таковому на первом году развития БА от момента диагностики заболевания ( $p < 0,05$ ).

#### Сведения об авторах:

Грудень Марина Алексеевна — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейрхимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»

Давыдова Татьяна Викторовна — доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Учитывая, что когнитивный дефицит у пациентов с БА более выражен через 10—15 лет от начала заболевания, роль аутоантител к Аβ<sub>25-35</sub>, действительно из защитной может трансформироваться к регуляторной и повреждающей нейрональные клетки. Использование активных антител против амилоидных структур Аβ для лечения БА несомненно представляет клинический интерес [10].

#### Заключение

Таким образом, в сыворотке крови всех обследованных пациентов с болезнью Альцгеймера были обнаружены аутоантитела к префибриллярным структурам Аβ<sub>25-35</sub>. Уровень выявленных антител против Аβ<sub>25-35</sub> значительно отличается от обнаруженного уровня Аβ<sub>25-35</sub> антител у людей с непатологическим старением, а также был ассоциирован с продолжительностью БА и с выраженностью нейродегенерации.

#### References

1. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 2012; 148(6): 1204-1222. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.040
2. Karran E., De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J. Neurochem*. 2016; 139 Suppl 2: 237-252. DOI: 10.1111/jnc.13632
3. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015; 52: 1-18. DOI: 10.1016/j.nepe.2015.06.008
4. Jevtic S., Sengar A.S., Salter M.W., McLaurin J. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res. Rev.* 2017; 40: 84-94. DOI: 10.1016/j.arr.2017.08.005
5. Sarlus H., Heneka M.T. Microglia in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 2017; 127(9): 3240-3249. DOI: 10.1172/JCI90606
6. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984; 34: 939-944.
7. Folstein M., Folstein S., McHugh P. 'Mini-mental state': A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; 12: 189-198.
8. Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T., Lansbury P.T.Jr: Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores. *J. Mol. Biol.* 2003; 332: 795-808.
9. Nath A., Hall E., Tuzova M., Dobbs M., Jons M., Anderson C., Woodward J., Guo Z., Fu W., Kryscio R., Wekstein D., Smith C., Markesbery W.R., Mattson M.P. Autoantibodies to amyloid beta-peptide (Abeta) are increased in Alzheimer's disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med.* 2003; 3(1): 29-39.
10. Dodel R.C., Hampel H., Du Y: Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2003; 2: 215-220.