

## БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА: АМИЛОИД БЕТА И МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ.

Н. В. КУДИНОВА<sup>1</sup>, А. Р. КУДИНОВ<sup>1</sup>, Т. Т. БЕРЕЗОВ<sup>1,2</sup>.

Институт Биомедхимии РАМН<sup>1</sup> и кафедра биохимии медицинского факультета  
Российского Университета Дружбы Народов<sup>2</sup>,  
ул. Миклухо-Маклая д. 8, Москва 117198, Россия. Телефон/факс: (095) 434-04-12  
Электронная почта: koudin@imb.imb.ac.ru

Главным морфобиохимическим признаком болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и старческого слабоумия является отложение в ткани мозга фибрилл амилоида бета, растворимая форма которого - нормальный белок организма. Ранее мы докладывали, что растворимый амилоид бета в плазме крови и спинномозговой жидкости здоровых доноров ассоциирован с липопротеинами высокой плотности. В данной работе дается обоснование существования взаимосвязи метаболизма липидов и амилоида бета.

**Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера, амилоид бета, липиды, липопротеины.

Болезнь Альцгеймера (БА) актуальная медико-социальная проблема, распространенность которой достигает размеров эпидемии, отражая рост доли пожилых людей в современном обществе. Этой болезнью страдают 5-10 % населения в возрасте старше 65 лет [1] и до 20 % населения в возрасте 80 лет. По данным Гавриловой [2], на территории бывшего СССР сенильные деменции составляют 7,6 % от всех впервые зарегистрированных в психоневрологическом диспансере больных позднего возраста. Известно, что некоторые морфо-биохимические признаки БА характерны и для нормального старения организма человека [2], поэтому выяснение молекулярных основ патогенеза этого заболевания позволило бы подойти к решению более общей проблемы понимания тонких механизмов старения, и прежде всего механизмов старения высокоорганизованной структуры и функции коры больших полушарий головного мозга человека.

Наиболее характерными чертами клинической картины БА являются малозаметное и медленное начало, хроническое прогрессирующее течение и исход с полным распадом психической деятельности. Хотя амнезия отводится первостепенное место в дебюте заболевания, БА может проявляться и нарушениями речи. На более поздних стадиях БА почти у всех больных развивается прогрессирующее нарушение позы, походки и тонуса мышц [3].

Тремя основными морфо-биохимическими признаками БА принято считать: внутринейрональные отложения фибрилл, так называемые нейро-фибрилярные клубки (НФК); нейритические (сенильные) бляшки и/или; амилоидоз сосудов мозга, поражающий сосуды малого и среднего калибра оболочек и коры головного мозга [4].

Отложения НФК обнаружены преимущественно в пирамидных нейронах неокортекса, гиппокампе, амигдале и базальных ядрах [5]. Они построены из закрученных фибрилл фосфорилированного белка тау [6,7]; в норме функция этого белка заключается в стабилизации микротрубочек. Избыточное фосфорилирование тау при БА ведет к нарушению процесса его связывания с микротрубочками и к гибели нейронов [8].

Нейритические (сенильные) бляшки представляют собой сферические островки

повреждения различного размера (от 10 до 200 мкм в диаметре) и обнаруживаются в коре головного мозга, в частности в ассоциативных районах неокортекса и лимбических структурах. Типичная "зрелая" бляшка построена из трёх основных элементов [9,10]: центрального амилоидного ядра, дистрофических отростков нейронов и глиальных клеток. Главным компонентом фибрилл в нейритической бляшке при БА, синдроме Дауна (СД) и старческом слабоумии (деменции) является белок, с молекулярной массой ~ 4 кДа, получивший название амилоид бета (Ab) или b-пептид [11,12]. Характерной особенностью структуры Ab является С- и N-концевая аминокислотная гетерогенность. Он состоит из 39 - 43 аминокислотных остатков [11,12]. Ab образуется из предшественника бета амилоида (ПБА), трансмембранного гликопротеина. ПБА экспрессируется в нейрональных клетках крыс, быков, обезьян, в культуре клеток человека HL-60 и HELA [13], первичной культуре гладкомышечных клеток аорты и кровеносных сосудов оболочек мозга [14], клетках гепатобластомы человека HepG2 [15] и во многих других животных клетках. Существует около 10 изоформ предшественника Ab, четыре из них - 695, 714, 751 и 770 аминокислотных остатков, содержат последовательность b-амилоида. Ab занимает часть трансмембранного (с 29 по 39-43 аминокислот Ab) и внеклеточного доменов (1-28 аминокислот Ab) ПБА (Рис.,)[16].

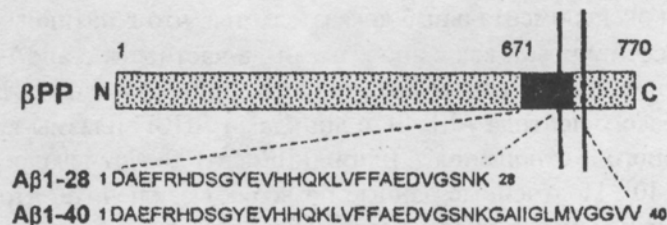


Рисунок.

Схематическое представление ПБА, Ab1-40, Ab1-28 [46].

Ab начинается с позиции 671 предшественника (ПБА 770 аминокислот). Вертикальные линии схематически представляют клеточную мембрану.

В течение длительного времени считали [17-19], что Ab синтезируется в организме только при болезни и является исключительно амилоидогенным и патологическим. Однако в 1992 году в ряде работ [20-22] были получены доказательства существования растворимого Ab (pAb), состоящего преимущественно из 40 аминокислотных остатков (Ab1-40) [21, 22]. Этот белок был обнаружен в культуральной среде ряда клеточных линий, в плазме крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) как больных БА, так и здоровых лиц. Это было показано в экспериментах по иммунопреципитации pAb со специфическими антисыворотками и подтверждено методами определения аминокислотной последовательности белка и масс-спектропией. Выявленные физиологические концентрации pAb составляют около 1 нг/мл для плазмы крови и 4-20 нг/мл для СМЖ и в случае патологии изменяются незначительно [14, 21, 23].

В литературе выдвинуто предположение, что pAb является нормальным белком организма человека [20, 21]. Однако исследования физико-химических свойств пептида показали, что Ab представляет собой чрезвычайно гидрофобную молекулу, склонную к агрегации и полимеризации [18, 19, 24, 25]. Эти процессы сопровождаются переходом молекулы в структуру b-складчатого слоя, что имеет место в ткани мозга при БА и нормальном старении организма [24-26]. Закономерно возникает вопрос, что предотвращает полимеризацию растворимой формы Ab и удерживает его в нативном физиологическом состоянии?

В экспериментах *in vitro* показано, что синтетические пептиды, гомологичные Ab легко полимеризуются в воде и в физиологических растворах [24-26]. Эти же пептиды



полимеризуются и при инкубации с ультрафильтратом спинномозговой жидкости, чего, однако, не происходит при их инкубации с нативной СМЖ [27]. На основании этого простого эксперимента было сделано предположение о возможном взаимодействии рАб с макромолекулами СМЖ и/или плазмы, которые и поддерживают его в растворенной форме [27].

В литературе получены экспериментальные доказательства взаимодействия Аб с целым рядом белков в опытах *in vitro*: а1-антихимотрипсином, витронектином, а также с аполипопротеинами (апо) плазмы крови, в частности с апоJ, апоА-I и апоЕ [28-31]. Эти данные легли в основу нашей гипотезы о возможности существования взаимодействия растворимой формы Аб с липопротеиновыми комплексами. Недавно [32-34] нами было показано, что рАб в плазме крови и СМЖ здоровых доноров ассоциирован с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП), преимущественно с ЛПВП3 и липопротеинами очень высокой плотности (ЛПОВП) (Таблица ). Полученные результаты позволяют рассматривать липопротеины высокой плотности как систему транспорта рАб и дают основание предположить, что ЛПВП играют важную роль в поддержании Аб в растворенном состоянии в биологических жидкостях и тканях целостного организма.

Решение этого вопроса нашло отражение в наших последующих работах [35]. Нами были получены экспериментальные доказательства, что в нативных ЛПВП плазмы крови человека Аб ассоциирован как с апобелками, в частности с апоА-I, апоА-II, апоЕ и апоJ, так и с липидными компонентами этих липопротеинов. Более того при инкубации синтетического пептида Ab1-40 с липидами ЛПВП плазмы крови человека с увеличением молярного отношения [липид]:[b-пептид] отмечалось уменьшение фибриллогенеза Ab1-40. Полученные данные позволяют заключить, что липидная фаза ЛПВП играет критическую роль в поддержании Аб в растворимом состоянии.

Существование ассоциации рАб с ЛПВП, в свою очередь, поднимает важный вопрос о биологической роли рАб в обмене липидов. Опубликованные данные о нарушении липидного метаболизма при БА придают этому вопросу особую значимость. Обнаруженное нарушение липидного состава мембран нейрональных клеток в определенных участках мозга считают одной из возможных причин нейродегенерации при БА [36]: изменение состава липидов мембран нейронов ведет к дестабилизации липидного бислоя, что, в свою очередь, приводит к ограничению регенеративной способности клеток и, в конечном итоге, к их гибели. В этой и ряде других работ [36-39] были отмечены выраженные аномалии энергетического и фосфолипидного (ФЛ) метаболизма мозговой ткани у больных БА. Нарушение фосфолипидного метаболизма в мозге больных БА выражается в сниженном уровне фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, также отмечается уменьшение уровня холестерина (ХС) [36]. В ряде других исследований [38,39] было показано увеличение концентрации фосфомоноэфиров (ФМЭ) в ткани мозга больных БА по сравнению с контролем. Известно, что ФМЭ оказывают влияние на синаптическую передачу в некоторых нейронах и влияют на структуру модельных и клеточных мембран, изменяя упаковку фосфолипидных гидрофильных мембранных головок и жирно-кислотных участков молекул ФЛ [38, 39]. Считается, что такого рода изменения ведут к дисфункции мембран нейронов, что, в конечном итоге, приводит к нарушению памяти у больных БА [39]. Также было обнаружено [40], что мембраны с нарушенной структурой приводят к изменению аффинности связывания D<sub>1</sub> дофаминового рецептора в мозге больных БА. Изучение липидного состава ткани мозга больных БА [41] показало, что у больных по сравнению с контрольной группой значительно снижено молярное отношение [ХС]: [ФЛ], являющееся основной физиологической характеристики текучести мембран, изменение которого, по мнению авторов, может увеличивать протеолитическое высвобождение Аб из ПБА и приводить к повышению уровня Аб в ткани мозга.

В последнее время в литературе высказывается предположение, что на метаболизм предшественника Ab могут оказывать влияние и изменения обмена холестерина [42, 43]. Исследованию взаимосвязи уровня холестерина плазмы крови и отложениями фибрилл Ab в ткани мозга была посвящена одна из недавних работ [44], где авторы проводили исследование эффекта гиперхолестеринемии на отложения Ab в мозге кроликов. Результаты исследования показали, что у лабораторных животных, находящихся на 2% холестериневой диете, в ткани мозга откладывался Ab. Эти данные указывают на определенную связь обмена холестерина и метаболизма Ab.

Таблица. Экспериментальные доказательства взаимосвязи амилоида бета и липидного обмена.

Результат	Ссылки	Экспериментальный подход
Ассоциация pAb с ЛПВП в плазме крови здоровых людей	32,34	1) перераспределение экзогенного биотинилированного Ab1-40 в ЛПВП плазмы крови здоровых доноров. 2) иммунопреципитация эндогенного pAb анти-Ab антителами из ЛПВП плазмы крови.
Ассоциация pAb с ЛПВП спинномозговой жидкости здоровых доноров	33, 34	1) иммунохимическое выявление Ab в ЛПВП СМЖ. 2) определение аминокислотной последовательности иммунореактивного pAb. 3) ультраструктурная визуализация pAb на поверхности ЛПВП СМЖ методом электронной микроскопии. 4) высокоэффективная жидкостная гелефильтрация ЛПВП3 и ЛПОВП СМЖ с последующим иммунохимическим выявлением pAb в этих частицах.
Взаимодействие Ab с аполипопротеинами липидами в составе нативных ЛПВП плазмы крови здоровых доноров	35	1) инкубация биотинилированного Ab1-40 и с ЛПВП плазмы крови с последующим иммуноблот анализом. 2) инкубация биотинилированного Ab1-40 с депротенизированными ЛПВП плазмы крови, последующей очисткой их обратной фазой высокоэффективной жидкостной хроматографией и иммунохимическим выявлением пептида.
Ингибирование <i>in vitro</i> фибриллогенеза Ab1-40 липидной фазой ЛПВП	35	1) электронномикроскопическая визуализация фибрилл пептида Ab1-40 при инкубации его с реконструированными депротенизированными ЛПВП.
Ингибирование этерификации холестерина плазмы крови пептидами Ab1-40 и Ab1-28	46	1) оценка влияния пептидов Ab1-40 и Ab1-28 на этерификацию холестерина плазмы крови здоровых доноров колориметрическим методом..
Ингибирование пептидом Ab1-40 синтеза внутриклеточных липидов в культуре клеток печени человека	47	1) синтез липидов различных классов в присутствии пептида Ab1-40 оценивали по степени встраивания радиоактивного <sup>14</sup> C-ацетата в новосинтезированные фосфолипиды триацилглицериды, холестерин и его эфиры.



Дополнительным подтверждением этому служат данные о сниженном уровне у больных БА этерификации холестерина плазмы крови, катализируемой специфическим ферментом лецитин-холестерин-ацил-трансферазой (ЛХАТ), белковым компонентом ЛПВП [45]. Скорость этерификации холестерина плазмы крови (% этерификации холестерина за час) была на 16% ниже у больных БА по сравнению с контролем.

Основываясь на этих данных и на обнаруженном нами факте ассоциации Ab с ЛПВП3 и ЛПОВП, мы исследовали влияние синтетических пептидов Ab1-40 и Ab1-28 на этерификацию холестерина в плазме крови здоровых доноров [46] и обнаружили, что оба пептида в концентрации  $>1$  нг/мл ингибировали эту реакцию. Возможно, что этот эффект отражает одну из физиологических функций Ab - участие в липидном метаболизме (Табл.).

Эта идея получила развитие в следующей нашей работе [47]: в культуре клеток печени человека HepG2 синтетический пептид Ab1-40 оказывал ингибирующее действие на синтез внутриклеточных липидов: фосфолипидов, триацилглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина. Ингибирующий эффект достигал насыщения в диапазоне концентраций пептида от 10 до 100 нг/мл среды. Статистически значимый ингибирующий эффект Ab1-40 на синтез липидов обнаружен и при низких его концентрациях 0,5-10 нг/мл среды, соответствующих физиологическим концентрациям pAb [21, 14, 23]. Эти результаты отражают еще одну физиологическую функцию Ab в обмене липидов: регуляцию синтеза внутриклеточных липидов (Табл.).

Обнаруженные ингибирующие эффекты амилоида  $\beta$  позволяют сделать вывод о потенциальной роли этого белка в регуляции обмена липидов. Наряду с этим, полученные данные об ассоциации pAb с липопротеинами высокой плотности дают основание рассматривать pAb в качестве непосредственного участника липидного метаболизма (Табл.).

Таким образом, проблема связи между обменом липидов и болезнью Альцгеймера приобретает возрастающий интерес. Однако тонкие молекулярные механизмы причинно-следственных отношений между нарушениями липидного метаболизма и отложениями Ab, составляющими морфобioхимическую основу БА, СД и старческого слабоумия, еще требуют детального исследования.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Katzman R. (1986). N. Engl. J. Med. - 314, 964- 973.
2. Гаврилова С.И. (1973). Журнал невропатологии и психиатрии. - № 9, 1339-1345.
3. Молчанова Е.К., Сударева Л.О., Селезнева Н.Д., Воскресенская Н.И. (1966). - Журнал невропатологии и психиатрии № 9, 1371-1375.
4. Ghiso J., Wisniewski T., Frangione B. (1994). Mol. Neurobiol. 8, 49-64
5. Selkoe D.J., Ihara Y., Abraham C., Rasool C.G., and McCluskey A. (1983). -Biological Aspects of Alzheimer's Disease.-Edt. Karzman R.-Banbury Report 15, Cold Spring Harbor, New York. - pp. 125-135.
6. Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Goedert M., Roses A. (1994). Exp. Neurology 125, 163-171.
7. Wisniewski H.M., Narang H.K. and Terry R.D. (1976). J. Neurol. Sci. 27.-p. 173-178.
8. Marx J. (1993). Science. - 262, 1210-1211.
9. Merz P.A., Wisniewski H.M., Somerville R.A., Bobin S.A., and Iqbal K. (1983). Acta

- Neuropathol. (Berl.).- **60**, 113-124.
10. Terry R.D., Gonatas N.K., and Weiss M. (1964). *Am. J. Pathol.*- **44**, 269-281.
11. Glenner G.G. and Wong C.S. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- **120**, 885- 890.
12. Masters C.L., Simms G., Weinmann N.A., and Beyreuther K. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4245-4249.
13. Shoji M., Golde T.E., Ghiso J. Cheung T. et al (1992). *Science.*- **258**, 126-129.
14. Nostrand, W., Rozemuller, A.J.M., Chung, R., Cotman, C. and Saporito-Irwin, S. (1994). *Amyloid: Int. J. Clin. Invest.*- **1**.- p. 1-7.
15. Smith, R., Higuchi, D. and Broze, G. (1990). *Science.*- **248**, 1126-1128.
16. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J., Mullr-Hill B. (1987). *Nature.*- **325**, 733-738.
17. Glenner G.G., Terry W., Harada M., Isersky C., Page C. (1971). *Science.* **172**, 150-151.
18. Eanes E.D., Glenner G. (1968). *J. Histochem. Cytochem.*- **16**, 673-677.
19. Bonar L.C., Cohen A.S., Skinner M. (1969). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 1373-1375.
20. Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C. et al (1992). *Nature.*- **359**, 322-325
21. Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F.D., Lee M., et al (1992). *Nature.*- **359**, 325-327.
22. Wisniewski, H.M., Mehta, P.D., Kim, K.S. and Merz G.S. (1989). *Biological Markers of Alzheimer's Disease, Cerebrospinal fluid-based laboratory test for Alzheimer's disease.* - Springer-Verlag, Berlin. pp. 23-29.
23. Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P.S., Leiberburg I., Schenk D. (1993). *J. Neurochem.* **61**, 1965-1967.
24. Hilbich C., Kisters-Woike B., Reed J. et al. (1991). *J. Mol. Biol.*- **218**, 149-163.
25. Levy E., Carman M., Fernandez-Madrid I. et al. (1990). *Science.*- **248**, 1124-1126.
26. Snyder S., Lador U., Wade W. et al. (1994). *Biophys. J.*- **67**, 1216-1228.
27. Wisniewski T., Castano E., Ghiso J., Frangione B. (1993). *Ann. Neurol.*- **34**, 631-633.
28. Ma J. Yee A., Brewer H.B., Das S., Potter H. (1994). *Nature.*- **372**, 92-94.
29. Matsubara E., Frangione B., Ghiso J. (1995). *J. Biol. Chem.* -**270**.- 7563-7567.
30. Schwarzman A., Gregori L., Vitek M. et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**.- 8368-8372.
31. Strittmatter W., Saunders A., Schmechel D. et al. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*- **90**, 1977-1981.
32. Koudinov A., Matsubara E., Wisniewski T., Frangione B., Ghiso J. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*- **205**, 1164-1171.
33. Koudinov A. R., Koudinova, N. V., Kumar A., Beavis R., Ghiso J. (1996). *Biochem Biophys Res Commun*- **223**, 592-597.
34. Кудинова Н., Кудинов А., Березов Т. (1996). *Вопр. мед. химии.*- **42**, 253-262.
35. Koudinov A. R., Berezov T. T., Kumar A., Koudinova N. V. Submitted.
36. Nitsch R.M., Blusztajn J.K., Pittas A.G., Slack B.E., Wurtman R.J. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1671-1675.
37. Petegrew J.W., Panchaligam K., Moossy J. (1988). *Arch. Neurol.* **8**, 1093-1096.
38. Petegrew J.W. Moossy J., Withers G. J. (1988). *Neuropathol. Exp. Neurol.*- **47**, 235-248.
39. Petegrew J.W. Klunk W.E., McClure R.J., Strychor S. *Alzheimer's Disease. New treatment Strategies.*-1991.-Edt. Khachaturian Z.C., Blass J.P.-Marcell Dekker Inc., New York.-pp.193- 213.
40. Keyser J.D., Ebinger G., Vauquilin G. (1990). *Arch. Neurol.*- **47**, 761-763.
41. Mason R.P., Shoemaker W.J., Shajenko L., Chambers T.E., Herbette L.G. (1992). *Neurobiology Aging.*- **13**, 413-418.
42. Assmann G.G., Schmitz H.J., Menzel J., Schulte H. (1984). *Clin. Chem.* **30**, 641-643.
43. Peacock M.L., Warren A.D., Roses A.D., Fink J.K. (1993). *Neurology.* **43**, 1254-1256.

44. Sparks D.L., Scheff S.W., Hunsaker J.C., Lui H., Gross D.R. (1994). *Exp. Neurol.*- **126**, 88-94.
45. Knebl J., DeFazio P., Clearfield M.B., Little L., McConathy W.J., Lacko A.G. (1994). *Mechan. Aging and Develop.*- **73** (1), 69-77.
46. Koudinov A. R., Koudinova N. V., Berezov T. T. (1996). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38** (4), 747-752.
47. Koudinova N. V., Berezov T. T., Koudinov A. R. (1996). *FEBS Letters.*- **395** (2-3).- 204-206.

# **ALZHEIMER'S DISEASE: BETA AMYLOID AND LIPID METABOLISM.**

N.V. KOUDINOVA<sup>1</sup>, T.T. BEREZOV<sup>1,2</sup>, A.R. KOUDINOV<sup>1</sup>.

Russian Academy of Medical Sciences<sup>1</sup> and Department of Biochemistry, School of Medicine, Russian Peoples' Friendship University<sup>2</sup>.  
 Mikluho-Maklay St. 8, Moscow 117198, Russia. Tel/fax:(095) 434-0412.  
 E. mail: koudin@imb.imb.ac.ru

Amyloid deposits found in brains of Alzheimer's disease, Down's syndrome and normal aged individuals are composed mainly of aggregated amyloid beta (Ab), soluble form which is a normal protein. We previously reported that soluble Ab (sAb) in normal human plasma and cerebrospinal fluid is complexed to high density lipoprotein (HDL). Consequences of sAb association with the HDL and Ab involvement in the lipid turnover are discussed herein.

**Key Words:** Alzheimers disease, amyloid beta, lipids, lipoproteins.