УДК 616.89
©Кольовска

АНТИТЕЛА IgG К ГАНГЛИОЗИДАМ GD1A И GM1 У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ

В. Кольовска

Институт экспериментальной морфологии, патологии и антропологии с музеем, Болгарской академии наук, 1113 Болгария, София; факс: (359)2-8710107; эл. почта: verakol@abv.bg

Работа посвящена поиску маркеров начальных стадий нейродегенеративных заболеваний у пожилых людей и предварительному исследованию распространенности этих заболеваний у пациентов данной возрастной группы. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови пожилых пациентов трёх групп (возраст 71-76 лет, 76-81 год, 81-90 лет, всего 18 пациентов) без клинических неврологических симптомов определяли IgG-антитела против ганглиозидов GD1a и GM1. Статистически значимое повышенное содержание антител против этих ганглиозидов было выявлено только у группы пациентов старше 80 лет. Полученные данные свидетельствуют о том, что после 80 лет у ранее здоровых лиц начинаются постепенно развивающиеся нейродегенеративные процессы, вначале не имеющие выраженной клинической симптоматики. В качестве биохимических маркеров этих заболеваний можно использовать величины титров антител против ганглиозидов GM1 и GD1a.

Ключевые слова: IgG антитела к GD1a и GM1, иммуноферментный анализ, пожилые люди

DOI: 10.18097/PBMC20166201093

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение продолжительности жизни и, соответственно, доли в обществе старых людей (возраст от 80 до 90 лет) требует разработки критериев оценки состояния их здоровья, прогноза течения и излечения соответствующих возрастных патологий. Известно, что одной из основных проблем со здоровьем у людей такого возраста, не имеющих выраженных органных патологий, являются нейродегенеративные заболевания, которые в самом начале могут протекать без заметных клинических симптомов. В течение последнего десятилетия были предприняты значительные усилия для выявления биохимических маркеров повреждения нейронов для диагностики, прогноза течения дегенеративных заболеваний нервной системы (ЦНС) и оценки эффективности терапии этих заболеваний [1, 2]. Есть основания полагать, что такими маркерами являются ганглиозиды нейронов. Ганглиозиды, представляющие собой кислые гликосфинголипиды, сконцентрированы в нервной системе, где они составляют около 10% от общего содержания липидов. Они находятся в основном в нейронах, а также определяются в меньших концентрациях в клетках других типов. Основными ганглиозидами миелина ЦНС человека являются моносиалоганглиозиды GM1, а основную фракцию ганглиозидов тел нейронов составляет дисиалоганглиозид GD1a [4]. В норме показатели содержания ганглиозидов различных типов в плазме крови стабильны, но демонстрируют выраженные изменения при патологических состояниях [3]. В наших предыдущих исследованиях значительное увеличение содержания ганглиозида GD1a в сыворотке крови была отмечено у больных с рассеянным склерозом (РС) – нейродегенеративным многофакторным расстройством с аутоиммунным компонентом [5-7]. У больных с РС также были обнаружены аутоантитела против ганглиозидов GM1 и GD1a, причем высокий титр аутоантител против GM1 коррелировал с демиелинизацией, в то время как высокий титр аутоантител против GD1a был связан с нейродегенерацией [8], а именно с острой двигательной аксональной нейропатией и с острой моторно-сенсорной аксональной нейропатией [9]. Наличие антител против ганглиозидов при воспалительной демиелинизации ЦНС позволяет идентифицировать этот процесс при исследовании патогенеза нейродегенерации.

Однако иммунологические исследования, позволяющее выявить аутоантитела к GD1a и GM1 в сыворотке крови у людей старше 70 лет и оценить их возможную роль в качестве маркеров нейродегенеративных процессов у пожилых людей, особенно в отсутствии явных клинических проявлений, до сих пор не проведены. Таким образом, целью настоящего исследования была оценка уровня антител к GD1a и GM1 в сыворотке крови пожилых людей.

МЕТОДИКА

Образцы сыворотки от 18 здоровых пожилых людей (71-91 лет) без неврологических клинических симптомов были получены из клинических лабораторий Софии. Все пациенты дали информированное согласие на использование образцов их сыворотки в данном исследовании. Наличие антител к GD1a и GM1 в сыворотке определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA), протокол которого выбран в соответствии с рекомендациями рабочего совещания “Измерение и значение антител к ганглиозиду GM1”. В работе использован модифицированный метод Mitzutamari и др. [10, 11]. Вкратце, 1000 нг GD1a или GM1 (“Sigma”, США) растворяли в 100 мл 100% метанола и с помощью пипетки заполняли лунки микротитрационного

планшета. После высушивания на воздухе, лунки блокировали с BSA-PBS (1% бычий сывороточный альбумин в фосфатно-солевом буфере) в течение 1 ч с последующим шестикратным промыванием PBS (10 мМ PO_4^{3-}, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl; pH 7,4). Сыворотку (100 мкл) разбавляли от 1:20 до 1:5000 в BSA-PBS, 100 мкл разбавленного раствора добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение ночи. После этого планшеты промывали шесть раз PBS и добавляли в лунки разбавленный (1/3200) раствор конъюгированных с пероксидазой козьих антител к IgG человека ("Bul Bio Ltd." NCIPD, София, Болгария) в BSA-PBS. Связывание определяли после 2-часовой инкубации. Все стадии инкубации проводили при 4°C. После шестикратной промывки PBS и добавления субстратной смеси, содержащей 15 мМ *opto*-фенилендиамин и 0,015% H_2O_2 в 0,1 М ацетатном буфере, планшеты инкубировали при комнатной температуре 30 мин для развития окраски. Реакцию останавливают через 30 мин добавлением 50 мкл 0,5 М (1 N) H_2SO_4. Оптическую плотность измеряли с помощью ELISA reader TECAN TM ("Sunrise", Австрия). Величину ОП, обусловленную неспецифическим связыванием антител (значение ОП в каждой лунке, не содержащей GM1 ганглиозида сыворотки) вычитали из величины ОП каждого измерения.

Пациенты считались положительными, если среднее значение ОП их сывороток превышало $\chi \pm 2$ SD (стандартное отклонение) здоровых людей (определено ранее на репрезентативном числе сывороток). Определения проводили три раза. Для выявления статистических различий между группами использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистическими значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пожилых людей были обнаружены статистически значимо повышенные титры сывороточных антител к GD1a и GM1 (таблица).

Таблица. Оптическая плотность IgG анти-GD1a и анти-GM1 антител у пожилых людей.

Возраст ОП	71–75 n=6	76-81 n=6	82–91 n=6
IgG анти-GD1a	(-) <0,06±0,01	(+/-) 0,06–0,08	(+) >0,08±0,02
IgG анти-GM1	(-) <0,06±0,02	(+/-) 0,06–0,08	(+) >0,08±0,01

Примечание. Результаты представлены в виде средней величины ± ошибка средней. Знаки в скобках (-, +/-, +) показывают выраженность изменений в анализируемом уровне антител.

Из 18 сывороток, испытанных в нашей лаборатории, высокие титры селективных антител к GD1a и GM1 (>1:400) были найдены у здоровых пациентов старше 80 лет. Почти все пациенты в этом возрасте имели проявления нейродегенерации и моторно-аксональные нейропатии. Первая группа (под 76 лет) состояла из лиц, без острых нейродегенеративных изменений и без демиелинизации.

Пациенты промежуточной группы (от 76 до 81 лет) характеризовались проявлениями хронической нейродегенерации без блока проведения или признаков демиелинизации. Эти данные подтверждают, что в процессе старения в возрасте от 76 до 81 лет нейродегенеративные изменения происходят постепенно и индивидуально.

В третьей группе (свыше 81 года), наличие высокого титра антител к GD1a в сыворотке крови встречается не у всех пациентов, однако высокий титр антител к GD1a всегда ассоциирован с острой нейродегенерацией. Наличие высокого титра антитела IgG к GM1 в сыворотке указывает на демиелинизацию.

Различия в оптической плотности сывороточных антител GD1a и GM1 между тремя группами пациентов было статистически значимыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нейродегенеративные изменения появляются постепенно с возрастом, и они очень индивидуальны. Результаты работы не выявили данных в пользу существования нейродегенеративных изменений у людей в возрасте от 71 до 76 лет, в то время как у пожилых людей в возрасте от 82 до 91 лет существуют убедительные доказательства о развитии нейродегенеративных изменений и демиелинизации.

Эти данные полностью согласуются с нашими предыдущими исследованиями, которые показали значительное увеличение титра антител к GD1a и GM1 в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом [5, 7].

Сыворотчные IgG антитела к GD1a и GM1 появляются при различных расстройствах, в том числе нейродегенеративных и хронических полиневропатиях. Антитела к GM1 связаны с процессом демиелинизации [3].

По данным наших предыдущих исследований [3, 5-8], высокие титры IgG анти-GD1a соответствуют нейродегенерации, в то время как высокие титры IgG анти-GM1 антител соответствуют наличию демиелинизации. Мы полагаем, что нейродегенерация может быть охарактеризована значениями титров антиганглиозидных антител к GD1a и GM1. Тем не менее, мы используем класс IgG антител, потому что они выявляют существование хронического процесса. В организме человека, ганглиозиды вызывают независимый Т-клеточный IgG-ответ. Антитела к ганглиозидам могут служить в качестве маркеров для установления повреждения аксонов как при нейропатии, так и при рассеянном склерозе [11]. Таким образом, антитела к ганглиозидам могут быть полезными диагностическими и прогностическими маркерами нейропатии [12]. Пациенты с положительным титром антител к ганглиозидам имеют значительные изменения в параметрах моторной проводимости, которые способствуют развитию нейропатии [13]. Механизм иммуноопосредованной невропатии, связанной с антителами к GD1a, включает комплемент-зависимую дисфункцию и разрушение перехвата Ранвье;

это приводит к изменению патофизиологического континуума от раннего обратимого нарушения проводимости до дегенерации аксонов [14]. Эти данные подтверждают, что возрастные характеристики коррелируют с специфической невропатией и антитела к ганглиозидам могут быть клинически полезны [15].

ВЫВОДЫ

Данное исследование позволяет сделать вывод, что повышенные титры IgG-антител к GD1a и GM1 свидетельствуют о наличии иммуноопосредованной нейродегенерации и демиелинизации. Титры антитела IgG к GD1a и GM1 могут служить в качестве биологических маркеров повреждений нейронов и аксонов, что является показанием для проведения нейропротективного лечения и оценки его эффективности. Эти данные также показывают, что нейронные изменения у людей происходят после 80-летнего возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Brettschneider J., Petzold A., Junker A., Tumani H.* (2006) Mult. Scler., **12**, 143-148.
2. *Malmeström C., Haghighi S., Rosengren L., Andersen D., Lycke J.* (2003) Neurology, **61**, 1720-1725.
3. *Zaprianova E., Majtenyi K., Deleva D., Mikova O., Filchev A., Sultanov B., Kolyovska V., Sultanov E., Christova L., Kmetska X., Georgiev D.* (2004) Clin. Neurosci., **57**, 94-99.
4. *Prokazova N., Bergelson L.* (1994) Lipids, **29**, 1-5.
5. *Zaprianova E., Deleva D., Sultanov B., Kolyovska V*. (2008) Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., **61**, 407-412.
6. *Zaprianova E., Deleva D., Sultanov B., Kolyovska V.* (2009) Acta Morphol. et Anthropol., **14**, 136-140.
7. *Zaprianova E., Sergeeva S.S., Sotnikov O.S., Deleva D., Sultanov B., Kolyovska V., Krasnova T. V.* (2010) Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., **63**, 447-454.
8. *Kolyovska V., Deleva D.* (2012) Acta Morphol. Anthropol., **19**, 114-117.
9. *Susuki K., Yuki N., Schafer D.P., Hirata K., Zhang G., Funakoshi K. et al.* (2012) Exp. Neurol., **233**, 534-542.
10. *Mizutamari R.K., Wiegandt H., Nores G*. (1994) J. Neuroimmunol., **50**, 215-220.
11. *Ravindranath M.H., Muthugounder S.* (2005) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **1050**, 229-242.
12. *Kusunoki S.* (2009) Rinsho Shinkeigaku, **49**, 956-958.
13. *Matà S., Betti E., Masotti G., Pinto F., Lolli F.* (2004) J. Peripher. Nerv. Syst., **9**, 138-143.
14. *Uncini A.* (2012) Exp. Neurol., **235**, 513-516.
15. *Gallardo E., Rojas-García R., Belvís R., Serrano-Munuera C., Ortiz E., Grau J.M., Illa I.* (2001) Neurologia, **16**, 293-297.

Поступила: 11. 12. 2014.
Принята к печати: 15. 03. 2015.

SERUM IgG ANTIBODIES TO GD1A AND GM1 GANGLIOSIDES IN ELDERLY PEOPLE

V. Kolyovska

Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 1113 Bulgaria; fax (359)2-8710107; e-mail: verakol@abv.bg

Nowadays, the percentage of elderly people in society grows. Good nutrition and medical care help older people to have a normal life over 80 to 90 years. In the last ten years it is of critical importance to establish the clinical significance of serum IgG anti-GD1a and anti-GM1 ganglioside antibodies as potential biomarkers for neuronal damage in neurodegenerative diseases and immune-mediated neuropathies and demyelination. In the current study, the diagnostic values of IgG anti-GD1a and anti-GM1 antibodies were determined by the ELISA method in serum samples of 18 elderly patients (71-91 years). Significantly elevated serum IgG anti-GD1a and anti-GM1 antibodies titers were detected only in patients over 80 years. These data suggest that the immune-mediated neuropathies, neurodegeneration and demyelination in healthy elderly occur after 80 years old. Therefore, IgG anti-GD1a and anti-GM1 antibodies can serve as biomarkers, showing the nervous system dysfunction.

Key words: serum IgG anti-GD1a and anti-GM1 antibodies, ELISA, elderly people