

ИСКУСТВА И НОВИНИ ОД СВЕТОТ

АНАЛИЗА НА СЕРУМОТ НА АМИЛОИД-БЕТА ПРОТЕИН₁₋₄₀ КАЈ ЗДРАВИ СУБЈЕКТИ, ДЕЦА СО АУТИЗАМ И ПАЦИЕНТИ СО АЛЦХАЈМЕРОВА БОЛЕСТ*Вијендра К. СИНГ*

Оддел за биологија, Државен универзитет на Јута, (САД)

Резиме

Амилоид бета-протеин₁₋₄₀ (АП40) е пептид со ниска молекуларна тежина произведен низ животот во текот на нормалниот метаболизам на клетката и неврогенеративните болести. Заради своите невротрофични и невротоксични ефекти, сегашната студија беше спроведена за да ги процени нивоата на серум на АП40 кај здравите субјекти, децата со аутизам и пациентите со Алцхајмерова болест. Серумот АП40 беше мерен со анализа на ензимо-поврзан имуносорбент (ЕЛИСА). АП40 е значително повисок кај нормалните деца споредени со нормалните постари контролни лица, кај нормалните деца споредени со децата со аутизам и кај децата со аутизам споредени со пациентите со Алцхајмерова болест (p вредноста беше помала од 0.05 за сите групи). Овој наод сугерира намалување на серумот АП40 во однос на возраста кај нормалното стареење, како и кај аутизмот и Алцхајмеровата болест. Овој пад можеби резултира од абнормалната обработка на претходникот на амилоид бета-протеинот (АПП) во текот на нормалното стареење и болестите поврзани со возраста како што се аутизмот кај децата и Алцхајмеровата болест кај постарите. Можното објаснување за овој пад може да ги вклучи зголемените интеракции на АП40 во однос на возраста кај цитоскелетните протеини за таложење во мозочното ткиво, зголемената серин протеаза

Адреса за кореспонденција:

Vijendra K. SINGH

Меѓународен центар за истражување на мозокот,
Технологиите за состојби на мозокот
15150 Н. Хајден Роуд, апарт. 106, Скотсдејл, АЗ 85260, САД
VSingh@BrainStateTech.com

world experience and current events

SERUM ANALYSIS OF AMYLOID BETA-PROTEIN₁₋₄₀ IN HEALTHY SUBJECTS, AUTISTIC CHILDREN AND ALZHEIMER'S PATIENTS*Vijendra K. SINGH*

Department of Biology, Utah State University,
Logan, Utah (USA)

UDK: 616.89:616.153.96-053.2
UDK: 616.892.3:616.153.96-053.2

Abstract

Amyloid beta-protein₁₋₄₀ (AP40) is a low molecular weight peptide produced throughout life during normal cell metabolism and neurodegenerative diseases. Owing to its neurotrophic and neurotoxic effects, the present study was conducted to evaluate serum levels of AP40 in healthy subjects, autistic children and Alzheimer's disease patients. Serum AP40 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AP40 was significantly higher in normal children compared to normal older controls, in normal children compared to autistic children, and in autistic children compared to Alzheimer's patients (p value was less than 0.05 for all groups). This finding suggests an age-related decline of serum AP40 in normal aging, as well as in autism and Alzheimer's disease. This decline may result from abnormal processing of amyloid beta-protein precursor (APP) during normal aging and age-related diseases such as autism in children and Alzheimer's disease in elderly. Possible explanations for this decline may include age-related increased interactions of AP40 with cytoskeletal proteins for brain tissue deposition, increased serine proteases for APP metabolism or

Corresponding Address:

Vijendra K. SINGH

Brain State International Research Center,
Brain State Technologies
15150 N. Hayden Road, Suite 106, Scottsdale, AZ 85260, USA
VSingh@BrainStateTech.com

за АП40 метаболизам или хиперимунолошка реакција (антитела на АП40) за отстранување на циркулирачкиот АП40. Да заклучиме, АП40 метаболизам опаѓа кај нормалното стареење, а што се однесува до неговата улога кај Алцхајмеровата болест овој протеин може исто така да биде придонесувачки фактор кај аутизмот.

Клучни заборови: Аутизам, амилоид-бета протеин Autism; Amyloid-beta protein, Алцхајмерова болест; стареење, невропатологија

Вовед

Акумулација на АП40 се јавува во мозокот во текот на нормалното стареење но неговата количина е зголемена во мозокот на пациентите со Алцхајмерова болест (1). Во однос на мозокот, АП40 се локализира надвор од мозокот на кожните фибробласти и био-лошките течности, вклучувајќи го и крвниот серум. Добро е познато дека АП40 покажува и невротрофички и невротоксички ефекти (2-4), вклучувајќи невrogenско делување врз стеблото на нервните клетки (5). Земајќи ги предвид овие својства, претпоставуваме дека АП40 може да игра патогенетска улога кај аутизмот.

Аутизмот е рано нарушување на централниот нервен систем во развој (ЦНС), манифестирајќи невролошки и бихевиорални оштетувања. Ова нарушување причинува тешки дефицити на повисоките ментални функции како што се социјалната интеракција, јазик, сознавање, комуникација и имагинација. Ова нарушување ги погодува милиони луѓе ширум светов, но многу малку се знае за етиологијата и патогенезата на нарушувањето. Актуелните теории ги вклучуваат генетските фактори, имунолошките фактори, факторите на средината и други неидентификувани фактори. Кај аутизмот бргу се акумулираат и податоци за поддршка на „автоимунолошката хипотеза“ (6-10). Автоимунитетот кај децата со аутизам е прикажан со неколку автоимунолошки фактори: специфични мозочни автоантитела, оштетени лимфоцитни функции, абнормална цитокинска регулација, вирусна асоцијација, поврзаност на извесни имуногенетски фактори и реагирање на терапијата за имунолошка модулација (6-10).

hyperimmune reaction (antibodies to AP40) for removal of circulating AP40. To conclude, the AP40 metabolism declines with normal aging and in addition to its role in Alzheimer's disease this protein might also be a contributing factor in autism.

Key Words: Autism; Amyloid-beta protein, Alzheimer's disease; Aging, Neuropathology

Introduction

Accumulation of AP40 occurs in the brain during normal aging but its amount is increased in the brain of patients with Alzheimer's disease (1). In addition to brain, AP40 has been localized outside the brain in skin fibroblasts and biological fluids, including the blood serum. AP40 is well known to exhibit both neurotrophic and neurotoxic effects (2-4), including neurogenic action on neural stem cells (5). Considering these properties, we hypothesized that AP40 might play a pathogenic role in autism.

Autism is an early-onset disorder of the developing central nervous system (CNS), manifesting both neurological and behavioral impairments. The disorder causes severe deficits of higher mental functions such as social interaction, language, cognition, communication, and imagination. Autism is the fastest-growing developmental disability today. The disorder affects millions of people worldwide, but very little is known about the etiology and pathogenesis of the disorder. Current theories include genetic factors, immune factors, environmental factors and yet other unidentified factors. The evidence is rapidly accumulating to support "autoimmune hypothesis" in autism (6-10). Autoimmunity in autistic children is shown by several autoimmune factors: brain-specific autoantibodies, impaired lymphocyte functions, abnormal cytokine regulation, viral association, linkage of certain immunogenetic factors, and response to immune modulation therapy (6-10).

Сегашната студија ги опишува резултатите од лабораториската анализа на серумот АП40, кој откривме дека се намалува во текот на нормалното стареење, кај децата со аутизам и пациентите со Алцхајмерова болест. Прелиминарните наоди на оваа студија беа презентирани на друго место (11).

Човечки субјекти и методи

Студијата вклучи 53 нормални деца (на возраст од 3-13 години), 9 нормални возрасни (25-40 години), 9 нормални контролни лица (50-80 години), 53 деца со аутизам (4-12 години) и 21 пациент со Алцхајмерова болест (60-82 години). Клиничката дијагноза кај аутизмот беше направена во основа според стандардните DSM-IV критериуми на Американската асоцијација на педијатри, Вашингтон, ДиСи. Невролозите направија клиничка дијагноза на Алцхајмеровата болест (АБ) според критериумите на NINCDS-ADRDA, која исто така вклучи едно испитување на „мини-ментална состојба“ и двегодишен опаѓачки тек на прогресијата на болеста. IRB на Универзитетот на државата Јута и Универзитетот на Мичиген го оценија и одобрија протоколот на нашето истражување, кое вклучи и користење на примероци на човечка крв (6-8). Сите субјекти беа на основната линија без никаков третман со препишени медикаменти во време на собирањето на крвта или барем 2 недели претходно од третманот. Сите примероци на серум претходно беа собрани како дел на тековната студија за автоимунитетот при нарушувања на ЦНС и се чуваа замрзнати на околу -20°C.

Ова мерење на серумот АП40 се изведе главно според анализата на ензимо-поврзан имunosorbent (ЕЛИСА). Опремата за анализата (Code No. 17713) користејќи едно антитело против АП₁₁₋₂₈ беше купена од IBL Америка, Оддел на KMI Diagnostics, Inc. (Минијаполис, МН, САД) и упатствата на производителот за процедурата на анализата се следеа без никакви модификации. Примероците од нормалните испитаници и пациентите беа истовремено анализирани. Анализата на податоците беше изведена со Student-овиот t-тест за примероците без двојник користејќи го софтверот Statview за компјутерите Макинтош. Податоците се презентирани како средна вредност ± стандардна грешка (S.E.)

The present study describes results of laboratory analysis of serum AP40, which was found to decline during normal aging, autistic children and Alzheimer's patients. Preliminary findings of this study were presented elsewhere (11).

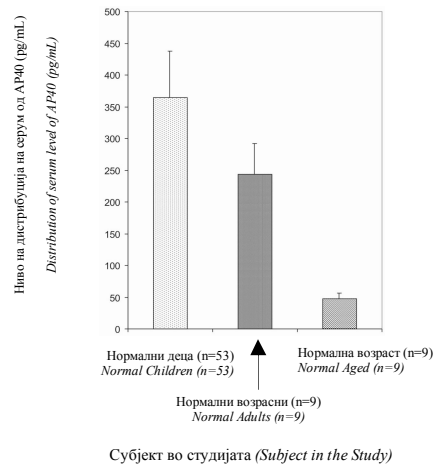
Human Subjects and Methods

The study included 53 normal children (age 3-13 yrs), 9 normal adults (age 25-40 yrs), 9 normal aged controls (age 50-80 yrs), 53 autistic children (age 4-12 yrs) and 21 Alzheimer's disease patients (age 60-82 yrs). The clinical diagnosis of autism was made essentially according to the standard DSM-IV criteria of the American Association of Psychiatrists, Washington, DC. Neurologists made the clinical diagnosis of Alzheimer's disease (AD) according to the NINCDS-ADRDA criteria, which also included a 'Mini-Mental State' examination and a two-year downward course of the disease progression. The IRB of Utah State University and the University of Michigan reviewed and approved our research protocol involving the use of human blood samples (6-8). All subjects were at the baseline without any treatment with prescription medications at the time of blood collection or at least two weeks prior to it. All serum samples were previously collected as part of our ongoing study of autoimmunity in CNS disorders and they were stored frozen at about -20°C.

This measurement of serum AP40 was performed essentially according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The assay kits (Code No. 17713) employing an antibody against AP₁₁₋₂₈ were purchased from IBL America, a Division of KMI Diagnostics, Inc. (Minneapolis, MN, USA) and the manufacturer's instructions of assay procedure were followed without any modification. The normal and patient samples were analyzed simultaneously. Data analysis was performed by Student's t test for non-paired samples by using the Statview software for Macintosh computer. The data are presented as the mean value ± standard error (S.E.).

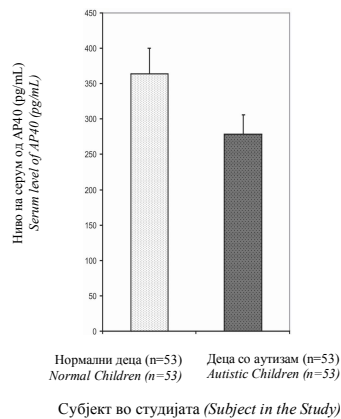
Резултати и дискусија

Нормалните деца имаа значително повисоко ниво на АП40 споредено со нормалното стареење на индивидуите (Слика 1).



Слика 1. Дистрибуцијата на серумот АП40 како функција на нормалното стареење. Левата вертикална колона ги прикажува податоците за нормалните деца, средната колона за нормалните возрасни и десната колона за индивидуите што стареат. Аритметичката средина \pm S.E. е прикажана за секоја група. Нормалните деца имаа значително повисока вредност споредена со нормалните индивидуи што стареат ($p=0.000$).

Нивото на АП40 кај нормалните возрасни беше поблиску до нивото на нормалните деца но повисоко од нормалното стареење на субјектите. Децата со аутизам задржаа значително пониско ниво на АП40 од нормалните деца (Слика 2).



Слика 2. Ниво на серум на АП40 кај нормални деца и деца со аутизам. Левата вертикална колона ги прикажува податоците за нормалните деца а десната колона за децата со аутизам. Аритметичката средина \pm S.E. е прикажана за секоја група. Децата со аутизам имаа значително пониска вредност споредена со нормалните деца ($p=0.034$).

Results and Discussion

Normal children had a significantly higher level of AP40 compared to the normal aged individuals (Figure 1).

Figure 1. Distribution of serum AP40 as a function of normal aging. The left hand vertical column shows data for normal children, middle column for normal adults and the right hand column for aged individuals. The arithmetic mean \pm S.E. is depicted for each group. Normal children had a significantly higher value as compared to normal aged individuals ($p=0.000$).

The level of AP40 in normal adults was closer to the level in normal children but higher than the normal aged subjects. Autistic children harbored a significantly lower level of AP40 than the normal children (Figure 2).

Figure 2. Serum level of AP40 in Normal Children and Autistic Children. The left hand vertical column shows data for normal children and the right hand column for autistic children. The arithmetic mean \pm S.E. is depicted for each group. Autistic children had a significantly lower value as compared to normal children ($p=0.034$).

Децата со аутизам имаа значително повисоко ниво на АП40 од пациентите со Алцхајмерова болест. Така откривме дека нивото на серумот АП40 опаѓа со стареењето кај здравите индивидуи. Нормалните деца имаа највисоко ниво, но нивото беше намалено кај децата со аутизам, што сугерираше за улогата на овој неuropeпид кај невропатологијата на аутизмот.

Акумулација на АП40 во мозокот се јавува природно како функција на нормалното стареење, меѓутоа, неговото количество драматично се намалува во мозокот кај пациентите со Алцхајмерова болест (1, 2). И покрај екстензивните испитувања, улогата на пептидот сè уште останува контроверзна кај Алцхајмеровата болест. Не е познато дали тој е причина за болеста или едноставно е нуспроизвод на болеста. Во однос на мозокот, АП40 се јавува природно во крвниот серум/плазма, цереброспиналната течност, кожните фибробласти и други клетки на цицачи (1-4). Присуството на АП40 во биолошките течности сугерираше дека овој пептид се произведува во текот на нормалниот метаболизам на клетката најверојатно имајќи физиолошка функција низ животот. Навистина, АП40 ги покажува двојните дејствија, т.е. невротрофичкиот ефект на пониски концентрации (помалку од 5-10 micromolar) и невротоксичкиот ефект на повисоки концентрации (поголеми од 15-20 micromolar) (1-5). Кон тоа, ние претходно покажавме дека АП40 предизвикува пролиферација на периферните крвни мононуклеарни клетки (ПКМНК) (фракција на бели крвни клетки кои содржат лимфоцити и моноцити) на нормалните човечки субјекти, но ПКМНК на пациентите со Алцхајмерова болест не реагираа на АП40 во функционалната анализа (3). Ова беше единствената карактеристика што би можело потенцијално да се разликува меѓу нормалното стареење и Алцхајмеровата болест.

Понатаму, ние известивме дека АП40 предизвикува пролиферација на мозочните клетки во примарните култури на клетките (4). Овој ефект беше со дополнување на супстанцата Р во културите на мозочните клетки и посредуваше виа протеинската киназа С (ПКЦ), патека на клеточното сигнализирање (4).

Autistic children had a significantly higher level of AP40 than the Alzheimer's disease patients. Thus we found that the serum level of AP40 decreased with aging in healthy individuals. Normal children had the highest level but the level was reduced in autistic children, suggesting a role for this neuropeptide in the neuropathology of autism.

The brain accumulation of AP40 occurs naturally as a function of normal aging; however, its amount is dramatically increased in the brain of patients with Alzheimer's disease (1, 2). In spite of extensive investigations, the role of this peptide still remains controversial in Alzheimer's disease. It is not known if it is the cause of the disease or simply a by-product of the disease. In addition to brain, AP40 occurs naturally in the blood serum/plasma, cerebrospinal fluid, skin fibroblasts and other mammalian cells (1-4). The presence of AP40 in biological fluids suggested that this peptide is produced during normal cell metabolism presumably having a physiological function throughout life. Indeed, AP40 displays dual actions, i.e. a neurotrophic effect at lower concentrations (less than 5-10 micromolar) and a neurotoxic effect at higher concentrations (greater than 15-20 micromolar) (1-5). To that end, we previously showed that AP40 induces proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) (a fraction of white blood cells containing lymphocytes and monocytes) of normal human subjects but the PBMNC of Alzheimer's patients did not respond to AP40 in this functional assay (3). This was a unique feature that could potentially distinguish between normal aging and Alzheimer's disease.

Furthermore, we reported that AP40 induced proliferation of brain cells in primary cell cultures (4). This effect was reversed by the supplementation of substance P in brain cell cultures and mediated via protein kinase C (PKC) pathway of cell signaling (4).

Тие наоди идентификуваа еден клеточна пролиферација или невротрофично дејство за АП40, кое неодамна покажа дека се поврзува со невrogenскиот ефект на АП40 на стеблото на нервните клетки (5).

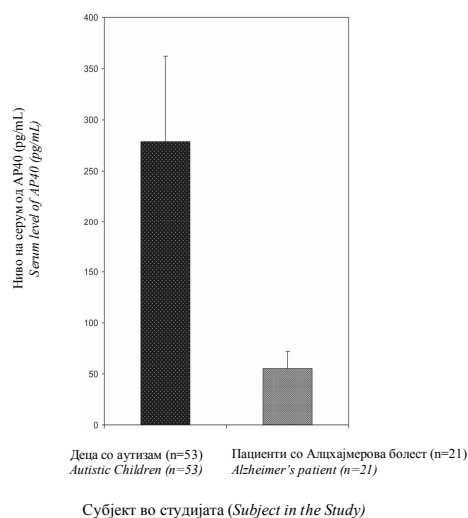
Како што е овде опишано, ние откривме пониско од нормалното ниво на АП40 кај децата со аутизам. Овој наод може да укаже на недостаток на АП40 кај аутизмот. Како резултат на тоа ние претпоставивме дека аутизмот може да вклучува дефект или недостаток на АП40 метаболизмот заради неговите невротрофички и/или невrogenски активности. Овој недостаток веројатно може да резултира од дефектната обработка на претходникот на бета-амилоид протеинот (АПП) или имунолошката реакција (антитела на АП40) за отстранување на циркулирачкиот АП40 (1). Може да има нарушување на АПП метаболизмот кај аутистичкото мозочно нарушување, слично на, но различно од АПП метаболизмот кај Алцхајмеровата болест. Алтернативно, аутизмот може да инволвира различни протеински интеракции меѓу АП40 и други клеточни протеини од што тоа го прави Алцхајмеровата болест.

Понатаму, ние откривме дека децата со аутизам имаа повисоко ниво на АП40 споредени со пациентите со Алцхајмерова болест. Ова е прв извештај кој ја покажува главната разлика меѓу овие две невролошки нарушувања. Пред нашиот извештај, АП40 се сметаше како карактеристична црта на Алцхајмеровата болест. Меѓутоа, споредено со пациентите со Алцхајмерова болест, повисокото ниво на АП40 кај децата со аутизам може да сугерира нов механизам за негова дистрибуција во телото, посебно неговата акумулација и таложење во мозокот. Природно, оваа тема ги оправдува понатамошните истражувања за улогата на бета-амилоид протеинот кај аутизмот и Алцхајмеровата болест.

These findings identified a cell proliferative or neurotrophic action for AP40, which has recently shown to be associated with the neurogenic effect of AP40 on neural stem cells (5).

As described here, we found lower than normal level of AP40 in autistic children. This finding may point to a deficiency of AP40 in autism. Consequently, we postulate that autism may involve a defect or deficiency of AP40 metabolism because of its neurotrophic and/or neurogenic activities. This deficiency presumably may result from a defective processing of beta-amyloid protein precursor (APP) or immune response (antibodies to AP40) for removal of circulating AP40 (1). There might be a disturbance of the APP metabolism in autistic brain disorder, similar to but different from APP metabolism in Alzheimer's disease. Alternatively, autism may involve different protein interactions between AP40 and other cellular proteins than the Alzheimer's disease does.

Furthermore, we found that autistic children had a much higher level of AP40 as compared to Alzheimer's disease patients. This is the first report to show a major difference between these two neurological disorders. Until our report, AP40 was regarded as the hallmark feature of Alzheimer's disease only. However, relative to Alzheimer's patients, the higher levels of AP40 in autistic children may suggest a novel mechanism of its distribution in the body, in particular its accumulation and deposition in the brain. Naturally, this topic warrants further investigations on the role of beta-amyloid protein in autism and Alzheimer's disease.



Слика 3. Ниво на серум на АП40 кај деца со аутизам и пациенти со Алцхајмерова болест. Левата вертикална колона ги прикажува податоците за деца со аутизам, а десната колона за пациенти со Алцхајмерова болест. Аритметичката средина \pm S.E. е прикажана за секоја група. Децата со аутизам имаа значително повисока вредност споредена со пациенти со Алцхајмерова болест ($p=0.000$).

Figure 3. Serum level of AP40 in Autistic Children and Alzheimer's patients. The left hand vertical column shows data for autistic children and the right hand column for Alzheimer's disease patients. The arithmetic mean \pm S.E. is depicted for each group. Autistic children had a significantly higher value as compared to Alzheimer's disease patients ($p=0.000$).

Литература / References

1. Singh VK. *Neuroautoimmunity: Pathogenic implications for Alzheimer's disease.* Gerontology 1977; 43: 79-94.
2. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides.* Science 1990; 250: 279-282.
3. Singh VK. *Studies of neuroimmune markers in Alzheimer's disease.* Molecular Neurobiology 1994; 9: 73-81.
4. Singh VK, Cheng JF, Leu SC. *Effect of substance P and protein kinase inhibitors on beta-amyloid peptide-induced proliferation of cultured brain cells.* Brain Research 1994; 660: 353-356.
5. Lopez-Toledano MA, Shelanski ML. *Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells.* J. Neuroscience 2004; 24: 5439-5444.
6. Singh VK. *Neuro-immunopathogenesis in autism.* Berczi I, Gorczynski RM, eds. In: NeuroImmune Biology: New Foundation of Biology, Netherlands: Elsevier BV Publishing, 2001; 1: 443-454.
7. Singh VK, Lin XE, Newell E, Nelson C. *Abnormal measles-mumps-rubella antibodies and CNS autoimmunity in children with autism.* J. Biomedical Science 2002; 9: 359-364.
8. Singh VK. *Cytokine regulation in autism.* In: Kronfol Z, ed. Cytokines and Mental Health, Boston: Kluwer Academic Publishers, 2003; 369-383.
9. Singh VK. *Rehabilitation of autism by immune modulation therapy.* J. Spec. Educ. Rehab. 2004; 3-4:161-178.
10. Singh VK. *Phenotypic expression of autoimmune autistic disorder (AAD): a major subset of autism.* Annals of Clinical Psychiatry (in press, 2008).
11. Singh VK. *Age-related changes of amyloid beta-protein1-40 in healthy volunteers, autistic children and Alzheimer's patients.* The Fifth Neurobiology of Aging Conference, October 21-22, 2004; San Diego, California.