

БИОМАРКЕРЫ СЛЮНЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАННИХ СТАДИЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2020 г. А. Н. Кодинцев^{1, 2, *}, О. П. Ковтун¹, Л. И. Волкова¹

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Екатеринбург, Россия

²Институт высокотемпературной электрохимии Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.

После доработки 30.04.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

В настоящее время диагностика болезни Альцгеймера (БА) основывается на клинической оценке когнитивного статуса пациента. Разработанная в 2018 году система А/Т/Н расширила спектр применения биомаркеров, рекомендованных для диагностики БА. Однако, дороговизна и малодоступность предложенных методик (люмбальная пункция, позитронно-эмиссионная томография) ограничивает их использование в ежедневной клинической практике. Активный поиск альтернативных диагностических алгоритмов привел к изучению биомаркеров в периферических тканях, таких как кровь и слюна. Разработка ультрачувствительных методов позволила оценивать минимальные изменения концентрации различных веществ, белков и метаболитов, которые могут быть использованы для выявления пациентов на предклинической стадии БА. Слюна является одной из важнейших биологических жидкостей и потенциальным кандидатом для исследования различных биомаркеров. Однако отсутствие единого алгоритма сбора, консервирования и влияние множественных конфаундеров затрудняет создание диагностических панелей. В данном обзоре рассматриваются и анализируются основные проблемы исследования слюны, а также результаты выполненных научных работ, посвященных возможности использования бета-амилоида, тау-белка, ацетилхолинэстеразы, лактоферрина и метаболома в качестве маркеров ранней стадии БА.

Ключевые слова: биомаркеры, слюна, болезнь Альцгеймера, ранняя диагностика

DOI: 10.31857/S1027813320040044

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание с комплексной и гетерогенной патофизиологией. БА является наиболее частой причиной деменции и в настоящее время отмечается тенденция к росту заболеваемости данной патологией. По разным оценкам уже к 2050 г. число больных БА возрастет до 131.5 млн человек, и каждые 33 секунды будет диагностироваться новый случай, что позволяет отнести данное заболевание к группе социально значимых [1].

Основную роль в патогенезе БА играет накопление агрегатов бета-амилоида, состоящих из 42 аминокислот (сенильных бляшек), гиперфосфорилированного тау-белка (нейрофибриллярных клубков) и активация процессов нейровоспаления. Данные патологические изменения в головном мозге начинаются за несколько десятков лет до появления первых клинических симп-

томов, что послужило толчком к разработке методов выявления данных патологических изменений на начальной (предклинической) стадии. Основными маркерами нейродегенеративного процесса БА являются: амилоидный белок A β ₄₂, общий тау-белок (t-тау), фосфорилированный тау-белок (p-тау) и различные маркеры нейровоспаления. Возможность выявлять пациентов на ранних этапах заболевания позволит исследовать и моделировать фармакологическое действие потенциальных болезнь-модифицирующих препаратов (анти-амилоидных, анти-тау, ингибиторы гамма-секретазы и т.д.).

В настоящее время для диагностики БА в клинической практике применяются критерии МКБ-10, DSM-5 и NINCDS-ADRDA, позволяющие диагностировать “вероятную”, “возможную” и “определенную” форму БА [2]. В 2011 г. критерии NINCDS-ADRDA (1984) были модифицированы экспертами Американского национального института старения и Альцгеймеровской ассоциации (NIA-AA), в частности впервые было предло-

* Адресат для корреспонденции: 620028 Россия, Екатеринбург, ул. Репина, 3, e-mail: antonkodintsev@mail.ru.

жено оценивать уровень бета-амилоида ликвора в качестве вспомогательного метода для подтверждения заболевания и дифференциальной диагностики с деменциями другой этиологии [2, 3].

В 2018 г. разработана классификационная система А/Т/Н, которая в значительной степени расширила возможности использования биомаркеров [3]. А включает в себя обнаружение агрегатов амилоидного белка А β или ассоциированных патологических состояний: А β ₄₂ в ЦСЖ (соотношение А β ₄₂/А β ₄₀) или амилоидное ПЭТ-сканирование. Т — обнаружение агрегатов тау-белка (нейрофибрилярные клубки) или ассоциированных патологических состояний: р-тау (t-тау) в ЦСЖ или тау ПЭТ-сканирование. Н — различные маркеры нейродегенеративного или нейронального повреждения: ЦСЖ, МРТ, ФДГ ПЭТ [4]. Согласно Consensus Report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of AD рекомендуемая чувствительность и специфичность биомаркеров должна быть не менее 80% [5]. Исследование должно быть доступным, воспроизводимым, дешевым, точным и технически простым. Использование рекомендуемых NIA-AA методов (ПЭТ, люмбальная пункция, биопсия) в повседневной клинической практике весьма ограничено в виду их малодоступности, дороговизны, а также в связи с наличием риска развития осложнений. Данные обстоятельства привели к активному поиску и изучению альтернативных способов оценки биомаркеров. В настоящее время наиболее перспективными кандидатами являются кровь и слюна. Исследование данных биологических жидкостей является более дешевым, доступным и простым по сравнению с методами, предложенным NIA-AA.

В современной диагностике оценка концентрации различных компонентов слюны активно используется в токсикологии, эндокринологии, инфектологии и производстве новых лекарственных препаратов [6]. Предполагается, что изменение уровня различных веществ в слюне может отражать степень выраженности и стадию нейродегенеративных процессов головного мозга, в частности болезни Альцгеймера. Более того данные показатели могут использоваться для оценки динамики и эффективности терапии.

Целью данного обзора является анализ и обобщение имеющихся данных относительно исследований различных биомаркеров слюны, а также выявление основных тенденций и направлений будущей ранней диагностики БА.

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЮНЫ

Исследование слюны является неинвазивным, простым и недорогим методом диагностики. В настоящее время отсутствуют единые валидизи-

рованные алгоритмы сбора, хранения и изучения биомаркеров БА в слюне. В опубликованных научных работах используются различные подходы. Данная проблема связана с отсутствием данных по суточному колебанию концентрации различных веществ, влиянием коморбидности и других факторов, затрудняющих создание единого стандарта сбора и обработки полученных образцов.

Секреция слюны осуществляется тремя основными парами экзокринных желез: околоушными, подчелюстными и подъязычными. Следует отметить, что каждая железа секретирует различную по объему и качественному составу слюну. Например, околоушные железы обеспечивают секрецию слюны с низким содержанием муцина, в то время как подъязычные железы вырабатывают слюну с высокой концентрацией данного мукопротеина. Ацинарные и дуктальные клетки желез окружены слоем миоэпителиальных клеток, имеющих богатое кровоснабжение и вегетативную иннервацию. Миоэпителиальные клетки играют важную роль в процессе выделения слюны за счет контрактильного механизма [7].

С возрастом наблюдается уменьшение секреторного объема слюны. Является ли данный факт воздействием физиологических механизмов старения, патологических процессов (дегидратация, диарея, полиурия) или следствием побочных эффектов различных лекарственных препаратов — вопрос активно изучаемый. Например, холинолитики, антигистаминные, ингибиторы протонной помпы, некоторые антидепрессанты и гипотензивные препараты достоверно увеличивают риск гипосаливации [8].

В мета-анализе Affoo и соавт. указывается, что основной причиной снижения объема слюны является старение (при этом наибольшее изменение секреции наблюдались в подчелюстных и подъязычных железах). Побочные эффекты медицинских препаратов признаются как менее значимые факторы [9]. В кросс-секционном исследовании Dodds и соавт. наблюдалось снижение секреции как стимулированной, так и нестимулированной слюны у пожилых лиц. Помимо снижения объема также определялось изменение концентрации антимикробных и других белков. Некоторые из этих изменений были ассоциированы с сахарным диабетом [10]. Выводы относительно возрастных изменений в работе слюнных желез были подтверждены в работе Nagler и Hershkovich [11]. В исследовании Su и соавт. указывается на суточные колебания секреции различных белков слюны, что, по-видимому, обусловливается влиянием циркадианных ритмов [12]. Помимо органических причин изменения секреции изучается роль психогенных факторов, таких как тревога, депрессия, стресс и т.д.

Не менее важным аспектом является ухудшение качества ухода за ротовой полостью и, как следствие, гигиены полости рта у пациентов с деменцией, что также может приводить к изменению количественного и качественного состава слюны [13]. Согласно данным Galloway и соавт. пациенты с диагнозами: БА, болезнь Паркинсона и деменции только в 57.7% случаев смогли сдать необходимое количество слюны, достаточное для проведения диагностических тестов [14].

В работе Xu F и соавт. указывается на прямое влияние БА, онкологических и других хронических заболеваний на секрецию слюны. Авторы выделяют 5 основных причин, затрудняющих выявление точных механизмов, непосредственно связанных с изменением концентрации и продукции различных веществ:

1. В исследованиях не всегда подробно описываются алгоритмы сбора слюны;
2. Недостаточное количество респондентов;
3. Не проводится ранжирование участников исследования в соответствии с возрастом;
4. Статистические погрешности и ошибочный анализ данных;
5. Идентификация процессов старения как основной причины снижения секреции. Учет всех вышеперечисленных аспектов позволит наиболее точно исследовать механизмы воздействия на функцию слюнных желез, что в свою очередь позволит унифицировать алгоритмы сбора, моделировать и повысить точность определения различных биомаркеров [15].

Обнаружение экспрессии основных морфологических субстратов болезни Альцгеймера в слюнных железах: мРНК тау-белка и предшественника белка бета-амилоида, позволило рассматривать слюну в качестве альтернативного диагностического существующим методам исследования (ПЭТ, ликвор, биопсия) [16, 17].

Процессы образования и переноса бета-амилоида в слюну до конца не известны. В частности, Shi и соавт. описывают 2 возможных механизма. Первый механизм заключается в переносе тау-белка из нервных окончаний, обеспечивающих иннервацию железы. Второй механизм заключается в непосредственном синтезе тау-белка ацинарными клетками [18].

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕТА-АМИЛОИДА

Агрегация бета-амилоида является одним из основных звеньев патогенеза БА. Формирование нерастворимых соединений (A β 40 и A β 42) вследствие расщепления белка предшественника бета-амилоида бета-секретазой (BACE1) и гамма-секретазой приводит к образованию сенильных бляшек, нарушающих функционирование нейронов. Более того, имеются данные о влиянии сенильных

бляшек на процессы формирования нейрофибрилярных клубков (агрегаты гиперфосфорилированного тау-белка) [19]. Изменение концентрации A β 42 в ликворе является одним из ключевых показателей, который FDA рассматривает как один из возможных маркеров ранней стадии БА. Предполагается, что на основании изменений его концентрации возможен отбор пациентов для включения в клинические испытания новых препаратов [20]. Снижение уровня A β 42, повышение концентрации t-тау и p-тау в ЦСЖ обладают высокой чувствительностью (>95%) и достаточной специфичностью (>85%) [21]. Соотношение A β 42/A β 40 является более точным показателем стадии и выраженности нейродегенеративного процесса, чем концентрация A β 42.

В настоящее время проводится большое количество исследований, посвященных изучению A β 42 в крови. Однако, следует отметить, что для определения бета-амилоида в плазме, сыворотке и слюне рекомендуется использовать чувствительные методики, например, ультра-чувствительный иммуноанализ, единичный молекулярный анализ (платформа SIMOA), иммуномагнитическую редукцию (IMR), электрохемилюминесценцию или масс-спектрометрию [8, 22].

Одной из первых работ, оценивающих уровень A β 42 и A β 40 в слюне, является работа Vermejo-Pareja и соавт. [23]. В исследовании использовался метод ИФА (ELISA). Всего было сформировано три группы: 70 человек с БА (легкая стадия – 29, средняя стадия – 24, тяжелая стадия – 17), 51 с болезнью Паркинсона и 56 здоровых респондентов (контроль). В группе пациентов с БА наблюдалось достоверное увеличение A β 42 (6.81 ± 20.04 пг/мл) по сравнению с контрольной группой (2.89 ± 4.96 пг/мл). У пациентов с легкой стадией БА наблюдались более значимые результаты, в то время как в подгруппе пациентов с средней стадией величина стандартного отклонения (± 34.76) характеризует широкий разброс значений признака. Изменения концентрации A β 42 не коррелировали с результатами оценки когнитивного статуса (MMSE).

Данные ROC-анализа для порогового (cut-off) уровня A β 42 – 7.85 пг/мл: чувствительность = 16%, специфичность = 93% ($p < 0.05$). Показатель площади под кривой (AUC) = 0.547. Полученные результаты характеризуют неудовлетворительное качество построенной модели.

Следует отметить, что у пациентов с тяжелой деменцией, болезнью Паркинсона и контрольной группы уровни A β 42 (3.03 ± 3.49 , 3.66 ± 4.21 и 2.89 ± 4.96 пг/мл соответственно) статистически не отличались. Достоверные изменения концентрации A β 40 во всех трех группах не были выявлены [23].

Похожие результаты получены в работе Kim и соавт. Методом магнитного иммуноанализа с наночастицами сравнивались две группы: в первой 28 человек с БА (в том числе пациенты с умеренными когнитивными нарушениями), в контрольной 17 здоровых респондентов. Суть метода заключалась в оценке фотоинтенсивности связанного наночастицами бета-амилоида. Было выявлено достоверное повышение уровня Аβ42 в слюне у пациентов с БА по сравнению с УКР (умеренные когнитивные расстройства) и контрольной группой ($p < 0.001$). Также наблюдалась тенденция увеличения уровня бета-амилоида 42 у пациентов с более выраженными стадиями БА. Изменения концентрации Аβ40 также оказались статистически не значимыми. Результаты магнитного иммуноанализа с наночастицами, в целом, соответствовали результатам оценки бета-амилоида чувствительной ELISA [24].

В исследованиях Shi и соавт., Lau и соавт. выявить Аβ42 в слюне методом ELISA не удалось. Данный факт может быть связан с гидрофобностью и гетерогенностью бета-амилоида [18, 25]. Также не исключается возможность агрегации Аβ в образцах слюны, что теоретически могло приводить к уменьшению его концентрации ниже порога обнаружения ИФА. Данная гипотеза была учтена в небольшом исследовании Lee и соавт. методом ELISA было выявлено статистически значимое увеличение Аβ42 у пациентов с БА (10 человек) по сравнению с контрольной группой (26 человек). Для предотвращения агрегации бета-амилоида в образцы слюны добавлялся тиофлавин S и азид натрия в качестве антибактериального агента. Практически у всех пациентов с БА уровень Аβ42 был более чем в два раза выше по сравнению с контрольной группой. Измеряя концентрацию Аβ42 в замороженных тканевых образцах легких, печени, селезенки, тонкой кишки, сердца, почек и поджелудочной железы, авторы пришли к выводу, что образование бета-амилоида наблюдается не только в головном мозге, но и в других периферических тканях [26]. В обзоре McGeer и соавт., выполненном с учетом результатов работы Lee и соавт., указывается, что контрольная группа была разделена на пациентов с низким риском БА (25 человек, концентрация Аβ42 — 19–25 пг/мл) и высоким риском БА (6 человек, концентрация Аβ42 — 41–60 пг/мл). Таким образом у пациентов с низким риском БА, уровень Аβ42 в слюне приблизительно равнялся 20 пг/мл. Данная концентрация оставалась константной величиной и не изменялась при повторных измерениях. Уровень Аβ42 у лиц с высоким риском БА был сопоставим с концентрацией у пациентов с БА [27]. Протокол исследования, разработанный Lee и соавт. был повторно использован в небольшой работе Sabbagh и соавт. При измерении концентрации Аβ42 методом ELISA было выявлено статистически до-

стоверное повышение ($p < 0.001$) уровня Аβ42 у 15 пациентов с БА (51.7 ± 1.6 пг/мл) по сравнению с контрольной группой (7 человек, концентрация Аβ42 — 21.1 ± 0.3 пг/мл) [28]. Результаты, полученные Lee и соавт. и Sabbagh и соавт. свидетельствуют о потенциальной воспроизводимости разработанной методики исследования с добавлением антиагрегатных и антибактериальных веществ.

В новом исследовании Santos и соавт. использовался метод ELISA для оценки уровня Аβ42 у 120 участников (60 человек — пациенты с БА, 60 человек — контрольная группа). В группе пациентов с БА наблюдалось статистически достоверное повышение концентрации Аβ42 (11.47 ± 1.32 пг/мл) по сравнению с контрольной группой (10 ± 1.11 пг/мл). Однако, в данном случае целесообразна оценка доверительных интервалов величины эффекта в виду близких значений признака и значимого перекреста полученных данных [29]. В более крупной работе Tvarijonaviciute и соавт. наоборот наблюдалось уменьшение концентрации Аβ42 у пациентов с БА (3.15 ± 0.72 пг/мл) по сравнению с здоровыми лицами (3.57 ± 0.93 пг/мл). Уровни Аβ40 в группах достоверно не отличались (группа БА — 21.98 ± 16.94 пг/мл, контрольная группа — 19.97 ± 6.35 пг/мл). В исследование было включено 152 человека (69 — группа БА, 83 — контрольная группа) [30]. Таким образом из 9 выполненных исследований: в 6 — наблюдалось достоверное повышение уровня Аβ42 у пациентов с БА (Bermejo-Pareja и соавт., Kim и соавт., Lee и соавт., McGeer и соавт., Sabbagh и соавт., Santos и соавт.), в двух работах Аβ42 в слюне не был обнаружен (Shi и соавт., Lau и соавт.) и в одной работе наблюдалось уменьшение концентрации Аβ42 в группе БА [18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]. В 3 исследованиях достоверные различия уровня Аβ40 выявлены не были [23, 24, 30]. Однако, нельзя исключить возможную недостаточную чувствительность использованных статистических методов, то есть недостаточную мощность исследования. Подобные противоречивые результаты диктуют необходимость дальнейшего изучения взаимосвязи между концентрацией бета-амилоида и развитием болезни Альцгеймера в более крупных когортных наблюдениях. Возможно, протокол, предложенный в 2017 году Lee и соавт. позволяет в значительной степени повысить точность определения Аβ42, что может послужить основой создания будущих диагностических панелей. Поэтому необходимо оценить чувствительность и специфичность данного алгоритма с использованием ROC-анализа. Не менее важным аспектом является мониторинг динамики концентрации бета-амилоида в течение нескольких лет для выявления предикторных возможностей данного биомаркера. Первоначальная оценка прогностической ценности может производиться с исполь-

зованием метода логистической регрессии с расчётом отношений шансов.

Исследование изменений соотношения A β 42/A β 40, концентрации более короткоцепочечных форм бета-амилоида, а также его олигомеров является не менее перспективным направлением ранней диагностики БА.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТАУ-БЕЛКА

Тау-белок является важным компонентом функционирования нервных клеток. Фосфорилирования форма данного протеина играет важную функцию в процессах полимеризации микротрубочек. Гиперфосфорилирование тау-белка приводит к потере его физиологической функции и последующему образованию внутриклеточных агрегатов — нейрофибриллярных клубков.

Наряду с аккумуляцией бета-амилоида, агрегация тау-белка является важным патогенетическим процессом болезни Альцгеймера. В настоящее время выделяют две основные фракции тау-белка: общий тау-белок (t-тау) и фосфорилированный тау-белок (p-тау).

В 2003 г. была выявлена возможная роль тау-белка в качестве маркера острого нейронального повреждения и прогрессирующей нейродегенерации [31]. Однако повышение t-тау не является специфичным для БА. Например, при болезни Крейтцфельдта—Якоба наблюдается более, чем 10-кратное повышение t-тау в ЦСЖ по сравнению с деменциями другой этиологии. После черепно-мозговой травмы в ликворе также обнаруживалось повышение концентрации t-тау, которое сохранялось в течение нескольких недель [32].

В различных исследованиях было выявлено, что фосфорилированный тау-белок также может использоваться в качестве биомаркера БА. Определение фракций p-тау с сайтами фосфорилирования треонина 181, серина 199 и серина 231 является более специфичным для дифференциальной диагностики между болезнью Альцгеймера и другими нейродегенеративными процессами [32]. В мета-анализе Olsson и соавт. рекомендуется определение концентрации t-тау, p-тау вместе с A β 42 и нейрофиламентами легких цепей в ликворе для ранней диагностики БА [33].

В исследовании Zetterberg и соавт., посвященном оценке возможности использования плазменного тау-белка в качестве маркера БА, наблюдаемые изменения плазменной концентрации t-тау характеризовались слабой корреляцией с изменением уровня тау-белка в ликворе. Также наблюдался значительный перекрест концентрации t-тау с контрольной группой, что затрудняло выявление порогового уровня, на основании которого можно было бы разграничить здоровых респондентов от пациентов с заболеванием [34]. Похожие резуль-

таты были получены в более поздней работе Mattsson и соавт. [35]. Помимо возможного увеличения концентрации t-тау, получены данные о повышении уровня p-тау (181) и NT1 тау в плазме крови у пациентов с БА. Увеличение p-тау (181) коррелировало с нейровизуализационными изменениями по данным амилоидной и тау ПЭТ, а также обладало большей чувствительностью и специфичностью, чем t-тау [36, 37].

Данных относительно возможного использования тау-белка слюны в качестве биомаркера для ранней диагностики БА меньше, чем для бета-амилоида. В одном из первых исследований Shi и соавт. методом Luminex ELISA было обнаружено значительное повышение соотношения p-тау (181)/t-тау у пациентов с БА (21 человек) по сравнению с контрольной группой (38 человек). Уровни общего тау-белка в исследуемых группах статистически достоверно не различались [18]. В исследовании Lau и соавт. были получены похожие результаты. При использовании метода ELISA (сэндвич-методика) наблюдалось достоверное повышение концентрации p-тау в группе БА, в то время как статистически значимые различия уровня t-тау у пациентов с БА, болезнью Паркинсона и контрольной группы отсутствовали. В каждую группу было включено по 20 человек [25].

В работе Ashton и соавт. также не удалось обнаружить статистически значимых различий концентрации t-тау в группах пациентов с БА (53 человека), УКР (68 человек) и в контрольной группе (160 человек). Несмотря на применение сверхчувствительного единичного молекулярного анализа (платформа SIMOA), полученные результаты (группа БА — 12.3 нг/л, УКР — 9.8 нг/л, контрольная группа — 9.6 нг/л, $p = 0.219$) не коррелировали с данными нейропсихологического исследования и структурной МРТ. Более того, обнаруженный значительный перекрест значений концентрации не позволял определить приблизительный пороговый уровень t-тау [38].

В исследовании Pেকেles и соавт. было выявлено значительное повышение уровня соотношения p-тау (S396)/t-тау у пациентов с БА по сравнению с здоровыми лицами. Для анализа использовался метод вестерн блота. Повышение p-тау (S396)/t-тау не коррелировало с изменениями концентрации тау-белка в ЦСЖ и данными нейровизуализации (объем гиппокампа). Широкий разброс и перекрест полученных значений у пациентов в группе БА ограничивает использование данного показателя в качестве биомаркера (чувствительность 73%–83%) [39]. В работе Santos и соавт. было обнаружено снижение уровня t-тау у пациентов с БА (86.7 ± 8.4 пг/мл) по сравнению с здоровыми лицами (134.4 ± 14.5 пг/мл). Однако, необходимо отметить отсутствие данных о нормальности распределения выборок, так как в разделе “Материалы и

методы” описывается использование непараметрических тестов (Критерий Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса), а на графиках приведены примеры с использованием параметрических тестов (дисперсионный анализ ANOVA и t-критерий Стьюдента для независимых выборок) [29]. В исследовании Tvarijonaviciute и соавт. концентрации t-тау и p-тау практически не отличались у пациентов с БА (t-тау – 21.57 ± 22.11 пг/мл, p-тау – 40.33 ± 42.95 пг/мл) и здоровых лиц (t-тау – 21.15 ± 16.58 пг/мл, p-тау – 42.5 ± 38.35 пг/мл) [30].

Таким образом, в 4 исследованиях концентрация t-тау статистически не отличалась в группах пациентов с БА и здоровых респондентов [18, 25, 30, 38]. В данных исследованиях не удалось выявить оценку чувствительности используемых критериев, то есть оценить мощность исследования, что не позволяет достоверно исключить ошибку второго рода (ложноотрицательный результат). В одном исследовании было выявлено снижение уровня t-тау у пациентов с БА (Santos и соавт. [29]). В двух работах было обнаружено повышение соотношения p-тау/ t-тау для сайтов фосфорилирования треонина 181 [18] и серина 396 [39]. В другом исследовании уровень p-тау (181) достоверно не отличался в группах пациентов БА и здоровых лиц [30]. Противоречивые результаты обуславливаются отсутствием единого алгоритма сбора слюны, различной величиной выборок, использованием разных статистических методов. Целесообразно дальнейшее комплексное исследование других сайтов фосфорилирования тау-белка (треонин 231, серин 404, серин 199 и т.д.), расчет выборки на этапе планирования с учетом достаточной мощности исследования ($>80\%$), а также построение регрессионных моделей для оценки прогностической ценности. Для исключения влияния конфаундеров, оценки чувствительности и специфичности, необходимо использование регрессионного анализа и построение ROC-кривых с анализом AUC как для тау-белка (в том числе различных фосфорилированных фракций), так и для комплексной панели в сочетании с другими маркерами.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА

Слюна является важным механизмом защиты от проникновения различных патогенов. Вещества, содержащиеся в слюне, регулируют иммунные и воспалительные процессы и тем самым обеспечивают антибактериальную защиту широкого спектра. Одним из важных компонентов данной защиты является лактоферрин [6]. Лактоферрин – антимикробный белок с Аβ-связывающими свойствами. Предполагается, что изменение его концентрации в слюне обусловлено возможной взаимосвязью инфекционных заболеваний и болезни Альцгеймера. Различные спирохеты, *Chlamydia*

pneumoniae, некоторые грибковые и герпетические инфекции рассматриваются в качестве потенциальных триггеров, способствующих развитию БА. Известно, что бета-амилоид обладает антибактериальными и противогрибковыми свойствами, следовательно, персистенция инфекционного процесса может влиять на процессы аккумуляции Аβ [40, 41]. Также имеются данные о возможной каталитической роли бактериальной ДНК, способствующей процессам агрегации тау-белка [42]. В частности, была обнаружена взаимосвязь между инфекционными заболеваниями ротовой полости, вызванными *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* и увеличением риска болезни Альцгеймера [43]. При хроническом периодонтите, вызванном *Porphyromonas gingivalis* наблюдается выделение токсических протеаз (gingipains), которые, как предполагается, увеличивают скорость образования бета-амилоида и нарушают функционирование тау-белка [44]. В настоящее время появляются данные о возможном влиянии микрофлоры ЖКТ на риск развития БА, особенно инфицирование *H. pylori* [45].

На сегодняшний день опубликованы результаты одного исследования концентрации лактоферрина в слюне у пациентов с БА. В 2017 г. Саго и соавт. использовали метод ELISA в кросс-секционном и проверочном исследованиях для оценки уровня лактоферрина у пациентов с УКР, БА, болезнью Паркинсона и здоровых лиц. В группе пациентов с УКР и БА наблюдалось статистически значимое снижение концентрации лактоферрина по сравнению с контрольной группой. У пациентов с БП наоборот наблюдался рост концентрации. В группе пациентов с БА изменения уровня лактоферрина коррелировало с результатами оценки когнитивного статуса по шкале MMSE и изменением концентрации Аβ42 в ликворе ($r = 0.688$, $p < 0.0001$). Также наблюдалась обратная корреляция с уровнем тау-белка в ЦСЖ ($r = -0.601$, $p < 0.0001$). В результате длительного наблюдения за пациентами (в течение 5 лет) удалось выявить пороговые уровни лактоферрина, позволяющие прогнозировать развитие БА. Например, у пациентов с концентрацией ниже 7.43 мкг/мл, в 78% наблюдалось прогрессирование УКР до признаков деменции. В контрольной группе (концентрация менее 7.43 мкг/мл) когнитивный статус не изменился. При построении ROC-кривой и анализа AUC была получена 100% чувствительность и специфичность теста для порогового значения 7.43 мкг/мл [46].

На основании результатов исследования [46] можно сделать предположение о прогностической роли лактоферрина в качестве биомаркера для диагностики ранней стадии БА. В связи с этим, необходимо проведение дальнейших исследований в комплексе с другими предполагаемыми маркерами слюны для изучения их взаимосвязи, а также целесообразна оценка изменений концентрации лактоферрина при деменциях дру-

гой этиологии. До сих пор не установлено влияние инфекционных процессов ротовой полости на колебания уровня лактоферрина в слюне у пациентов с различным когнитивным статусом. Возможно, ухудшение гигиены полости рта у пациентов с БА приводит к увеличению риска развития воспалительных процессов и, как следствие, к повышению концентрации лактоферрина.

ИССЛЕДОВАНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) — фермент, катализирующий гидролиз нейромедиатора ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты. Известно, что немаловажную роль в патогенезе БА играет снижение синтеза ацетилхолина (АЦХ) вследствие гибели АЦХ-синтезирующих нейронов ядра Мейнерта [47]. Дисфункция АЦХ-синтезирующих нейронов, вызванная влиянием растворимых олигомеров Аβ, приводит к нарушению процессов запоминания и консолидации памяти на ранней стадии БА [48]. Известно, что обратимые ингибиторы ацетилхолинэстеразы (иАХЭ) (донепезил, ривастигмин, галантамин) активно используются в клинической практике для лечения пациентов с деменцией на легкой и умеренной стадии заболевания. Данные препараты позволяют замедлить прогрессирование когнитивных нарушений путем ингибирования АЦХ-опосредованного гидролиза ацетилхолина в синапсах.

Предполагается, что изменение концентрации АХЭ может являться прогностическим фактором БА. На основании данного предположения было начато изучение концентрации АХЭ в различных биологических жидкостях с целью выявления пациентов на ранней стадии БА. В различных исследованиях по концентрации АХЭ в ЦСЖ получены противоречивые результаты. Время забора ликвора, диета, условия, в которых выполняется люмбальная пункция и прием различных препаратов являются важными факторами, влияющими на концентрацию АХЭ в ЦСЖ [49]. В 1982 г. Smith и соавт. обнаружили значительное повышение уровня плазменной псевдохолинэстеразы и снижение содержания АХЭ в эритроцитах у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой [50].

Близость расположения слюнных желез к структурам ЦНС и богатая парасимпатическая иннервация позволяют предположить, что изменение концентрации АХЭ в слюне может отражать активность и стадию БА. Для изучения АХЭ в слюне наиболее часто используется колориметрический метод при помощи реактива Элмана. Sayer и соавт. в 2004 году выполнили одно из первых исследований, посвященных изучению изменений концентрации АХЭ в слюне. В исследовании было выделено три группы испытуемых: первая группа — пациенты с БА отвечавшие на терапию иАХЭ

(22 человека), вторая группа — пациенты с БА не отвечавшие на терапию иАХЭ (14 человек), третья группа — контрольная (11 человек). Было выявлено снижение АХЭ у пациентов с БА (у которых отсутствовал терапевтический ответ на ингибиторы АХЭ), по сравнению с здоровыми респондентами. Среди пациентов с БА концентрация значительно отличалась в зависимости от эффективности иАХЭ. Следует отметить, что и в контрольной группе также наблюдалось снижение уровня АХЭ, что может отражать возрастное физиологическое снижение функции холинергической системы [51]. В работе Boston и соавт. статистически значимых различий уровня АХЭ между пациентами с БА (15 человек), пациентами с сосудистой деменцией и здоровыми испытуемыми (по 13 человек в каждой группе) выявлено не было ($p = 0.83$). Автор отмечает, что все пациенты с БА, включенные в исследование, не принимали иАХЭ, так как прием данных препаратов может вызвать долгосрочные адаптивные изменения уровня ацетилхолинэстеразы. Также остается неизученным с какой точностью изменения концентрации в слюне отражают истинную степень дисфункции центральной холинергической системы [52]. В более позднем исследовании Bakhtiari и соавт. были получены результаты, аналогичные результатам Boston и соавт. У 15 пациентов с БА наблюдался более низкий уровень АХЭ по сравнению контрольной группой (15 человек). Однако полученные данные были оценены как статистически недостоверные ($p = 0.25$) [53]. В более крупной работе Ahmadi-Motamayel и соавт. были обнаружены достоверные различия концентрации ацетилхолинэстеразы (группа БА — 20.99 ± 10.99 ед./л, контроль — 13.08 ± 7.23 ед./л, $p = 0.002$) и псевдохолинэстеразы (группа БА — 3.00 ± 0.93 ед./л, контроль — 1.66 ± 0.59 ед./л, $p = 0.000$). В каждую группу было включено по 30 человек. Большое значение стандартного отклонения характеризует широкий разброс показателей в сравниваемых группах, что затрудняет выявление порогового уровня и построение прогностической модели [54].

Таким образом, в четырех работах, посвященных изучению концентрации АХЭ наблюдались противоречивые результаты. Разница результатов может объясняться различным методологическим подходом, возможной недостаточной мощностью исследований (высокий риск ошибки второго рода) вследствие малых выборок. Также немаловажным конфаундером является терапия и АХЭ, которая может приводить к значительному сдвигу истинной концентрации ацетилхолинэстеразы. Степень влияния приема данных препаратов может быть оценена при использовании множественного регрессионного анализа. В работах Sayer и соавт. и Ahmadi-Motamayel и соавт. отсутствуют данные о чувствительности, специфичности и предполагаемом cut-off уровне АХЭ,

поэтому в настоящее время достоверные данные о возможности использования АХЭ слюны в качестве маркера БА отсутствуют [51, 54].

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛОМА

Помимо исследования бета-амилоида, тау-белка, лактоферрина и ацетилхолинэстеразы в настоящее время изучается прогностическая значимость других биомаркеров. На сегодняшний день опубликованы результаты нескольких работ изучения метаболома слюны, а также его изменений при БА. Предполагается, что метаболом слюны может отражать геномный, транскриптомный и протеомный каскад биохимических изменений в организме. Понимание сути метаболических сдвигов при болезни Альцгеймера может способствовать оптимизации лечебно-диагностического процесса.

В настоящее время проводится поиск различных низкомолекулярных метаболитов, изменение концентрации которых можно было бы использовать в качестве надежных маркеров ранней стадии БА. Следует отметить, что для изучения метаболома необходимо использование дорогостоящих и сверхчувствительных методик, таких как ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (NMR), масс-спектрометрия, совмещенная с жидкостной (LC) или газовой (GS) хроматографией, а также масс-спектрометрия с капиллярным электрофорезом (CE) [6].

В одном из первых исследований было выявлено достоверное изменение уровня 18 метаболитов у пациентов с УКР по сравнению с группой здоровых лиц методом жидкостной LC-MS. С наибольшей точностью было определено изменение уровня таурина [55].

В более крупной работе Liang и соавт. оценка изменений метаболитов выполнялась у 256 человек с БА и 218 здоровых лиц методом быстрой ультраэффективной LC-MS. Было выявлено достоверное изменение концентрации 6 веществ (увеличение сфинганина-1-фосфата, орнитина и фенилуксусной кислоты; уменьшение 3-дегидрокарнитина, инозина, гипоксантина, $p < 0.01$). При проведении ROC-анализа панели из 3 метаболитов (сфинганина-1-фосфата, орнитина и фенилуксусной кислоты) была построена модель, которая с достаточной точностью прогнозировала развитие и прогрессирование нейродегенеративного заболевания ($AUC > 0.8$). Наиболее значимые изменения концентрации наблюдались для сфинганина-1-фосфата ($AUC = 0.998$, чувствительность — 99.4%, специфичность — 98.2%) [56].

В пилотном исследовании Yilmaz и соавт. было обнаружено изменение концентрации 22 метаболитов (в частности пропионата) у пациентов с БА (9 человек) по сравнению с группой здоровых лиц (12 человек) методом протонной ядерной магнитно-резонансной спектроскопии ($p = 0.034$). Также

в исследование была включена группа пациентов с УКР (8 человек). Путем логистического регрессионного анализа при сравнении группы БА с контрольной группой было обнаружено достоверное повышение пропионата: $p = 0.034$, отношение шансов 0.48 (1.95–445.53). Изменения концентрации ацетона в группах статистически не отличались: $p = 0.591$, отношение шансов 2.88 (1.04–18.46). Регрессионная модель для пропионата/ацетона характеризовалась достаточной точностью теста ($AUC = 0.871$, чувствительность — 90.9%, специфичность — 84.2%) [57].

В более новой работе Nuan и соавт. изучалось изменение уровня различных метаболитов методом LC-MS. Концентрация метаболитов оценивалась в трех группах пациентов: пациенты с БА, пациенты с амнестической УКР и контрольная группа. 100% чувствительностью и специфичностью обладал 3-х метаболитный панельный комплекс маркеров: метилгуанозин, гистидилфенилаланин и холин-цитидин, концентрация которых достоверно отличалась у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой. Другая трех метаболитная панельная система (амино-дигидроксibenзол, глюкозил-галактозил-гидроксиксиллизин- H_2O , аминобутировая кислота + H_2) также с 100% чувствительностью и специфичностью позволила разграничить предементную (УКР) и дементную стадию БА. Для оценки изменений между группой УКР и контролем использовалась двухкомпонентная метаболитная панель (глюкозил-галактозил-гидроксиксиллизин- H_2O и глутамин-карнитин), которая с 100% чувствительностью и 70% специфичностью позволяла разграничить здоровых лиц и пациентов с УКР. Таким образом, при использовании данных метаболитов возможно достоверное выявление и дифференциация патологического процесса (УКР, БА) от физиологического возрастного снижения когнитивных функций ($AUC > 0.8$) [58].

Полученные данные об изменении концентрации различных метаболитов, свидетельствуют о возможности с достаточной точностью выявлять пациентов с признаками болезни Альцгеймера. Однако не установлено влияние сопутствующих факторов на уровни данных метаболитов (метаболический синдром, прием различных препаратов и т.д.). Также весьма интересным представляется изучение связи изменений метаболома и других маркеров БА (бета-амилоида, тау-белка). Целесообразно выявление и апробация наиболее значимых маркеров с высокой чувствительностью и специфичностью (например, сфинганин-1-фосфат) в последующих когортных исследованиях, в том числе для оценки воспроизводимости ранее опубликованных результатов. Следует отметить, что оценка низкомолекулярных метаболитов требует применение дорогостоящего и малодоступного

оборудования, что затрудняет оценку метаболома за пределами крупных городов и научно-исследовательских центров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время клиническая диагностика болезни Альцгеймера остается первостепенной, что обусловлено трудоемкостью, недоступностью и дороговизной повсеместного использования маркеров системы А/Т/Н. Клиническая манифестация БА развивается на стадии значительно выраженных нейродегенеративных процессов, когда эффективность болезнь-модифицирующей терапии значительно ограничена. Данный факт объясняет неэффективность тестируемых таргетных препаратов, в частности моноклонального антитела — адуканумаба на фоне приема которого наблюдалось уменьшение количества сенильных бляшек в головном мозге, однако, клиническое течение процесса в группе пациентов, получавших препарат, не отличалось от контрольной группы, получавших плацебо. Тем не менее, считается, что применение болезнь-модифицирующей терапии на ранней стадии позволит значительно замедлить прогрессирование нейродегенеративного процесса.

Следовательно, выявление пациентов на предклинической стадии БА является важнейшей задачей, позволяющей планировать и проводить исследования эффективности различных антидементных препаратов. Повсеместное выполнение люмбальной пункции и специализированной ПЭТ в повседневной клинической практике невозможно, поэтому изучается возможность оценки изменений биомаркеров заболевания более доступным и простым способом.

Исследование слюны является перспективным направлением разработки метода диагностики ранней стадии болезни Альцгеймера. Накопленные данные свидетельствуют, что изменение концентрации белков, ферментов и низкомолекулярных метаболитов могут являться потенциальными биомаркерами ранних стадии нейродегенеративного процесса. Однако, зачастую положительные результаты были получены в одномоментных исследованиях и на небольших выборках, в которых авторы использовали различные методологические и статистические алгоритмы. Отсутствие единого регламентирующего протокола значительно затрудняет выявление наиболее точного метода сбора, консервирования и изучения слюны [59]. В большинстве исследований сбор осуществлялся без стимуляции, поэтому, неизвестно влияет ли стимуляция слюноотделения на изменение концентрации веществ. Более того, до конца не изучена связь маркеров слюны с этим же биомаркерами БА по данным ликвора или ПЭТ. Если в исследовании Сагго и соавт. концентрация лактоферрина

в слюне коррелировала с изменением концентрации бета-амилоида и тау-белка, то однозначных данных о подобной взаимосвязи относительно A β 42, t-tau, p-tau в настоящее время не получено.

Неизученным остается вопрос по степени влияния различных конфаундеров на концентрацию потенциальных биомаркеров. Выявление наиболее значимых воздействий на концентрации веществ в слюне позволит персонифицировать диагностику, то есть, в условиях наличия того или иного влияющего фактора исследовать наименее зависимый от него маркер. Непосредственная оценка взаимосвязи между маркерами, например, между белками (бета-амилоидом, тау-белком) и низкомолекулярными метаболитами в более крупных когортных исследованиях позволит создать точные прогностические модели в условиях влияния различных конфаундеров.

Таким образом, дальнейшее комплексное изучение биомаркеров, стандартизация алгоритмов забора, консервации и исследования слюны — основные направления будущих исследований. Не менее важными аспектами являются: расчет необходимого количества выборок, правомерное применение статистических методов с оценкой параметров чувствительности, специфичности, предсказательного значения, а также отношений правдоподобия. Целесообразно сравнение разрабатываемого метода с “золотым стандартом” в качестве которого могут использоваться показатели ликвора или ПЭТ. Учет всех вышеперечисленных особенностей позволит планировать и проводить более качественные исследования, результаты которых должны стать основой разработки и внедрения тестов в клиническую практику с целью диагностики стадии нейродегенерации и контроля за эффективностью терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковтун О.П., Волкова Л.И., Кодинцев А.Н. // Уральский медицинский журнал. № 8. 2019. С. 5—13.
2. Cummings J. // *Alzheimers Res. Ther.* 2012. V. 4. № 35. 6 p.
3. Lee J.C., Kim S.J., Hong S., Kim Y.S. // *Exp. Mol. Med.* 2019. V. 51. № 5. P. 1—10.
4. Jack C.R. Jr., Bennett D.A., Blennow K., Carrillo M.C., Dunn B., Haeberlein S.B., Holtzman D.M., Jagust W., Jessen F., Karlawish J., Liu E., Molinuevo J.L., Montine T., Phelps C., Rankin K.P., Rowe C.C., Scheltens P., Siemers E.,

- Snyder H.M., Sperling R. // *Alzheimers Dement.* 2018. V. 14. № 4. P. 535–562.
5. Thies B., Truschke E., Morrison-Bogorad M., Hodes R.J. // *Neurobiology of Aging.* 1999. V. 20. № 2. P. 247.
6. Liang D., Lu H. // *Arch. Oral. Biol.* 2019. V. 105. P. 5–12.
7. Redman R.S. // *Microsc. Res. Tech.* 1994. V. 27. № 1. P. 25–45.
8. Ashton N.J., Ide M., Zetterberg H., Blennow K. // *Neurol. Ther.* 2019. V. 8. № 2. P. 83–94.
9. Affoo R.H., Foley N., Garrick R., Siqueira W.L., Martin R.E. // *J. Am. Geriatr. Soc.* 2015. V. 63. № 10. P. 2142–2151.
10. Dodds M.W., Johnson D.A., Yeh C.K. // *J. Dent.* 2005. V. 33. № 3. P. 223–233.
11. Nagler R.M., Hershkovich O. // *Aging Clin. Exp. Res.* 2005. V. 17. № 5. P. 358–366.
12. Su H., Gornitsky M., Geng G., Velly A.M., Chertkow H., Schipper H.M. // *Age (Dordr.).* 2008. V. 30. № 1. P. 1–9.
13. Gleerup H.S., Hasselbalch S.G., Simonsen A.H. // *Dis. Markers.* 2019. 11 p.
14. Galloway J.W., Keijser B.J., Williams D.M. // *Periodontol.* 2000. 2016. V. 70. № 1. P. 184–195.
15. Xu F., Laguna L., Sarkar A. // *J. Texture Stud.* 2019. V. 50. № 1. P. 27–35.
16. Conrad C., Vianna C., Freeman M., Davies P. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. V. 99. № 11. P. 7751–7756.
17. Oh Y.S., Turner R.J. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006. V. 291. № 1. P. 76–82.
18. Shi M., Sui Y.T., Peskind E.R., Li G., Hwang H., Devic I., Gingham C., Edgar J.S., Pan C., Goodlett D.R., Furay A.R., Gonzalez-Cuyar L.F., Zhang J. // *J. Alzheimers Dis.* 2011. V. 27. № 2. P. 299–305.
19. Bakota L., Brandt R. // *Drugs.* 2016. V. 76. № 3. P. 301–313.
20. Molinuevo J.L., Ayton S., Batrla R., Bednar M.M., Bittner T., Cummings J., Fagan A.M., Hampel H., Mielke M.M., Mikulskis A., O'Bryant S., Scheltens P., Sevigny J., Shaw L.M., Soares H.D., Tong G., Trojanowski J.Q., Zetterberg H., Blennow K. // *Acta Neuropathol.* 2018. V. 136. № 6. P. 821–853.
21. Benilova I., Karran E., De Strooper B. // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. № 3. P. 349–357.
22. Sancesario G., Bernardini S. // *Clin. Biochem.* 2019. V. 72. P. 52–57.
23. Bermejo-Pareja F., Antequera D., Vargas T., Molina J.A., Carro E. // *BMC Neurol.* 2010. V. 10. 7 p.
24. Kim C.B., Choi Y.Y., Song W.K., Song K.B. // *J. Biomed. Opt.* 2014. P. 19. № 5. 8 p.
25. Lau H.C., Lee I.K., Ko P.W., Lee H.W., Huh J.S., Cho W.J., Lim J.O. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 2. 16 p.
26. Lee M., Guo J.P., Kennedy K., McGeer E.G., McGeer P.L. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 55. № 3. P. 1175–1182.
27. McGeer P.L., Guo J.P., Lee M., Kennedy K., McGeer E.G. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. V. 62. № 3. P. 1219–1222.
28. Sabbagh M.N., Shi J., Lee M., Arnold L., Al-Hasan Y., Heim J., McGeer P. // *BMC Neurol.* 2018. V. 18. № 1. 4 p.
29. Santos G.A.A., Olave E., Pardi P.C. // *Int. J. Morphol.* 2020. V. 38. № 1. P. 230–234.
30. Tvarijonaviciute A., Zamora C., Ceron J.J., Bravo-Cantero A.F., Pardo-Marin L., Valverde S., Lopez-Jornet P. // *Clin. Oral. Invest.* 2020. Online ahead of print. 8 p.
31. Blennow K., Hampel H. // *Lancet Neurol.* 2003. V. 2. № 10. P. 605–613.
32. Schöll M., Maass A., Mattsson N., Ashton N.J., Blennow K., Zetterberg H., Jagust W. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2019. V. 97. P. 18–33.
33. Olsson B., Lautner R., Andreasson U., Öhrfelt A., Portelius E., Bjerke M., Hölttä M., Rosén C., Olsson C., Strobel G., Wu E., Dakin K., Petzold M., Blennow K., Zetterberg H. // *Lancet Neurol.* 2016. V. 15. № 7. P. 673–684.
34. Zetterberg H., Wilson D., Andreasson U., Minthon L., Blennow K., Randall J., Hansson O. // *Alzheimers. Res. Ther.* 2013. V. 5. № 2. 3 p.
35. Mattsson N., Zetterberg H., Janelidze S., Insel P.S., Andreasson U., Stomrud E., Palmqvist S., Baker D., Tan Hehir C.A., Jeromin A., Hanlon D., Song L., Shaw L.M., Trojanowski J.Q., Weiner M.W., Hansson O., Blennow K. // *Neurology.* 2016. V. 87. № 17. P. 1827–1835.
36. Mielke M.M., Hagen C.E., Xu J., Chai X., Vemuri P., Lowe V.J., Airey D.C., Knopman D.S., Roberts R.O., Machulda M.M., Jack C.R., Jr., Petersen R.C., Dage J.L. // *Alzheimers Dement.* 2018. V. 14. № 8. P. 989–997.
37. Chen Z., Mengel D., Keshavan A., Rissman R.A., Billington A., Perkinton M., Percival-Alwyn J., Schultz A., Properzi M., Johnson K., Selkoe D.J., Sperling R.A., Patel P., Zetterberg H., Galasko D., Schott J.M., Walsh D.M. // *Alzheimers Dement.* 2019. V. 15. № 3. P. 487–496.
38. Ashton N.J., Ide M., Schöll M., Blennow K., Lovestone S., Hye A., Zetterberg H. // *Neurobiol. Aging.* 2018. V. 70. P. 125–127.
39. Pেকেles H., Qureshi H.Y., Paudel H.K., Schipper H.M., Gornitsky M., Chertkow H. // *Alzheimers Dement. (Amst.).* 2019. V. 11. P. 53–60.
40. Fülöp T., Itzhaki R.F., Balin B.J., Miklossy J., Barron A.E. // *An International Symposium Presented at the 2017 IAGG Congress in San Francisco.* 2018. V. 9. 16 p.
41. Itzhaki R.F., Lathe R., Balin B.J., Ball M.J., Bearer E.L., Braak H., Bullido M.J., Carter C., Clerici M., Cosby S.L., Del Tredici K., Field H., Fulop T., Grassi C., Griffin W.S., Haas J., Hudson A.P., Kamer A.R., Kell D.B., Licastro F., Letenneur L., Lövhelm H., Mancuso R., Miklossy J., Oth C., Palamara A.T., Perry G., Preston C., Pretorius E., Strandberg T., Tabet N., Taylor-Robinson S.D., Whitlum-Hudson J.A. // *J. Alzheimers Dis.* 2016. V. 51. № 4. P. 979–984.
42. Tetz G., Pinho M., Pritzkow S., Mendez N., Soto C., Tetz V. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. 11 p.
43. Sochocka M., Zwolińska K., Leszek J. // *Curr. Neuropharmacol.* 2017. V. 15. № 7. P. 996–1009.
44. Dominy S.S., Lynch C., Ermini F., Benedyk M., Marczyk A., Konradi A., Nguyen M., Haditsch U., Raha D., Griffin C., Holsinger L.J., Arastu-Kapur S., Kaba S., Lee A., Ryder M.I., Potempa B., Mydel P., Hellvard A., Adamowicz K., Hasturk H., Walker G.D., Reynolds E.C., Faull R.L.M., Curtis M.A., Dragunow M., Potempa J. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. № 1. 21 p.
45. Doulberis M., Kotronis G., Gialamprinou D., Polyzos S.A., Papaefthymiou A., Katsinelos P., Kountouras J. // *Int. J. Neurosci.* 2020. P. 1–13.
46. Carro E., Bartolomé F., Bermejo-Pareja F., Villarejo-Galende A., Molina J.A., Ortiz P., Calero M., Rabano A., Cantero J.L., Orive G. // *Alzheimers Dement. (Amst.).* 2017. V. 8. P. 131–138.

47. Francis P.T., Palmer A.M., Snape M., Wilcock G.K. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. V. 66. № 2. P. 137–147.
48. Nunes-Tavares N., Santos L.E., Stutz B., Brito-Moreira J., Klein W.L., Ferreira S.T., de Mello F.G. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 23. P. 19377–19385.
49. Talesa V.N. // *Mech. Ageing. Dev.* 2001. V. 122. № 16. P. 1961–1969.
50. Smith R.C., Ho B.T., Hsu L., Voulis G., Claghorn J., Schoolar J. // *Life Sci.* 1982. V. 30. № 6. P. 543–546.
51. Sayer R., Law E., Connelly P.J., Breen K.C. // *Clin. Biochem.* 2004. V. 37. № 2. P. 98–104.
52. Boston P.F., Gopalkaje K., Manning L., Middleton L., Loxley M. // *Int. J. Geriatr. Psychiatry*. 2008. V. 23. № 4. P. 439–440.
53. Bakhtiari S., Moghadam N.B., Ehsani M., Mortazavi H., Sabour S., Bakhshi M. // *J. Clin. Diagn. Res.* 2017. V. 11. № 1. P. 58–60.
54. Ahmadi-Motamayel F., Goodarzi M.T., Tarazi S., Vahabian M. // *Spec. Care Dentist*. 2019. V. 39. № 1. P. 39–44.
55. Zheng J., Dixon R.A., Li L. // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 24. P. 10802–10811.
56. Liang Q., Liu H., Zhang T., Jiang Y., Xing H., Zhang A. // *RSC Advances*. 2015. V. 5. № 116. P. 96074–96079.
57. Yilmaz A., Geddes T., Han B., Bahado-Singh R.O., Wilson G.D., Imam K., Maddens M., Graham S.F. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 58. № 2. P. 355–359.
58. Huan T., Tran T., Zheng J., Sapkota S., MacDonald S.W., Camicioli R., Dixon R.A., Li L. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. V. 65. № 4. P. 1401–1416.
59. Reale M., Gonzales-Portillo I., Borlongan C.V. // *Brain Res.* 2020. V. 1727. 35 p.

Saliva Biomarkers in Diagnostics of Early Stages of Alzheimer's Disease

A. N. Kodintsev^{a, b}, O. P. Kovtun^a, and L. I. Volkova^a

^aUral State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia

^bInstitute of High Temperature Electrochemistry of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia

To date, diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is based on clinical examination of patient's cognitive state. In 2018, the A/T/N system was developed, which expanded a spectrum of biomarkers recommended for AD diagnostics. However, expensiveness and low availability of the suggested methods, including lumbar puncture or positron-emission tomography, limit their use in daily clinical practice. Active search for other diagnostic tools led to studies on biomarkers in peripheral tissues, such as blood and saliva. Development of ultrasensitive methods allowed to detect minimal alterations of concentrations of various substances, proteins or metabolites, which can be used for diagnostics of AD patients at preclinical stage. Saliva is one of the most important biological fluids and potential candidates to study various biomarkers. However, the absence of a single protocol of its collection and conservation as well as the effects of multiple confounders make the development of diagnosis panels difficult. In the present review, we consider and analyze main problems of saliva research and the results of recent studies on the opportunity to use beta-amyloid, tau-protein, acetylcholinesterase, lactoferrin, and metabolome as the markers of early stages of AD.

Keywords: biomarkers, saliva, Alzheimer's disease, early diagnosing