

Биоинформатический поиск и формирование панели лигандов сывороточного альбумина, модулирующих его взаимодействие с Аβ-пептидом

Дерюшева Е.И., Немашкалова Е.Л., Шевелёва М.П., Литус Е.А.

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» г. Пушчино

evgenia.deryusheva@gmail.com

В сыворотке крови и спинномозговой жидкости человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) выполняет функцию депо амилоидного бета-пептида (Аβ), одного из основных участников патогенеза болезни Альцгеймера (БА). Замена собственного альбумина пациента на очищенный препарат ЧСА позволяет ускорить выведение Аβ из центральной нервной системы. Ускорения клиренса Аβ можно добиться за счёт усиления сродства ЧСА к Аβ посредством аллостерической регуляции. Разработка этого подхода требует проведения систематического поиска лигандов ЧСА и исследования их влияния на взаимодействие ЧСА с Аβ. На основе биоинформатического анализа нами были сформированы панели низкомолекулярных, пептидных и белковых лигандов ЧСА, ассоциированных с БА, подлежащих экспериментальному изучению на предмет их влияния на равновесие ЧСА-Аβ. В качестве первоначальных источников данных были использованы базы данных DrugBank, BioGRID и IntAct. Для низкомолекулярных веществ и пептидов в качестве критериев отбора кандидатов использовали величины их растворимости в воде, концентрации в плазме крови и проницаемости через гематоэнцефалический барьер, а также их строгую ассоциацию с БА, согласно ресурсу AlzForum. В качестве критериев отбора белковых кандидатов использовали величину молекулярной массы, внеклеточную локализацию и ассоциацию с БА, в соответствии с базой данных DisGeNET и платформой Open Targets. Итоговые панели включают в себя 100 низкомолекулярных веществ, 11 пептидов и 34 белковых кандидата. Методом поверхностного плазмонного резонанса изучено влияние ряда веществ из сформированных панелей на равновесные и кинетические параметры взаимодействия ЧСА с мономерной формой Аβ40/Аβ42, а также кинетика реакции фибриллообразования Аβ в присутствии ЧСА и его лигандов. Полученные результаты могут послужить основой для разработки средств терапии и профилактики БА.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, амилоидный бета-пептид, болезнь Альцгеймера, панели низкомолекулярных, пептидных и белковых лигандов, биоинформатический поиск, базы данных.

Bioinformatic search and formation of a panel of serum albumin ligands that modulate its interaction with Aβ-peptide

Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M. P., Litus E.A.

Institute for Biological Instrumentation, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

Human serum albumin (HSA) acts in blood serum and cerebrospinal fluid as a depot for amyloid beta-peptide (Aβ), one of the main participants in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Replacing patients HSA with a purified one induces excretion of Aβ from the central nervous system. Acceleration of Aβ clearance can be achieved by increasing the affinity of HSA for Aβ through allosteric regulation. This approach requires systematic search for HSA ligands and study of their influence on the HSA-Aβ interaction. Based on bioinformatics analysis, we have formed panels of low-molecular-weight, peptide and protein ligands of HSA associated with AD. The impact of the ligands on the HSA-Aβ equilibrium is the aim of experimental study. The DrugBank, BioGRID and IntAct databases were used as initial data sources. For low-molecular-weight substances and peptides, their water solubility values, plasma concentration and blood-brain barrier permeability, as well as

their strict association with AD from AlzForum resource were used as criteria for the candidates' choice. Molecular weight, extracellular localization, and association with AD, in accordance with the DisGeNET database and the Open Targets platform, were used for selecting protein candidates. Final panels include 100 low-molecular-weight substances, 11 peptides and 34 protein candidates. Impact of some substances from the panels on the equilibrium and kinetic parameters of HSA with the monomeric form of A β 40/A β 42 interaction was studied with surface plasmon resonance; the kinetics of the A β fibril formation in the presence of HSA together with its ligands was studied as well. The obtained results can serve as a basis for the development of drugs for the treatment and prevention of AD.

Key words: human serum albumin, amyloid beta peptide, Alzheimer's disease, panels of small molecular weight, peptide and protein ligands, bioinformatics search, databases.

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции (60–70 %, по данным ВОЗ) и относится к категории социально значимых (постановление Правительства РФ №715 от 01.12.04) и дорогостоящих для общества заболеваний. Согласно отчету, представленному Alzheimer's association в 2022 г., за период с 2000 г. по 2019 г. смертность по причине БА выросла на 145.2%. Несмотря на множество работ, посвященных изучению БА, до сих пор нет полного понимания ее этиологии и патогенеза, что осложняет разработку эффективных средств профилактики и терапии. В клиническую практику до недавнего времени были внедрены препараты, оказывающие только симптоматическое действие (ингибиторы холинэстеразы и мемантин-неконкурентный антагонист глутаматных NMDA-рецепторов) [1]. Только в 2021 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) был одобрен первый таргетный препарат для лечения БА – адуканумаб, антитело к амилоидному бета-пептиду (A β), применение которого приводило к снижению отложений A β в центральной нервной системе (ЦНС) пациентов с диагнозом БА и клиническим улучшением. A β – один из ключевых факторов развития БА. Доказано, что в результате повышения продукции и снижения скорости выведения A β накапливается в тканях головного мозга и инициирует образование нейрофибриллярных клубков, воспаление, нарушение синоптической передачи и гибель нейронов [2]. Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) является природным буфером A β , неся на себе ~90 % A β сыворотки крови [3] и 40-90 % A β цереброспинальной жидкости [4]. ЧСА подавляет агрегацию A β и снижает риск развития БА и ее прогрессию [5]. В этой связи, ЧСА рассматривают в качестве терапевтической мишени для лечения БА. Данные клинических испытаний подтверждают эффективность лечения БА посредством замены ЧСА пациента на очищенный фармакологический препарат ЧСА. Этот подход сопровождается выводом из кровотока большого количества природных лигандов ЧСА, что

сопряжено со множеством побочных эффектов. Более физиологичный подход – аллостерическое увеличение сродства ЧСА к A β . Наши исследования показывают возможность увеличения сродства ЧСА к A β путем насыщения ЧСА линолевой кислотой, уровень которой существенно снижается при БА [6]. Прием ингибиторов обратного захвата серотонина снижает количество амилоидных отложений в мозге возрастных пациентов [7], а длительный прием ибупрофена ассоциирован со значительным снижением риска развития БА [8].

В этой связи, изучение влияния лигандов ЧСА на его взаимодействие с A β , а также поиск лигандов ЧСА, способных модулировать это взаимодействие, является актуальной задачей.

2. Материалы и методы

2.1. Базы данных лигандов ЧСА

Для формирования панелей низкомолекулярных, пептидных и белковых лигандов ЧСА, потенциально способных модулировать образование комплекса ЧСА-A β , были проанализированы базы данных DrugBank [9], BioGRID [10] и IntAct [11]. DrugBank, база данных лекарственных веществ с химической, фармакологической и фармацевтической информацией, содержит 407 записей, непосредственно относящихся к ЧСА (*H. sapiens*). База содержит только низкомолекулярные эндогенные и экзогенные вещества, лекарственная эффективность которых показана экспериментально. Среди 407 записей лигандов ЧСА 21 запись соответствует пептидам. Базы BioGRID и IntAct содержат 226 и 136 записи белковых лигандов ЧСА, соответственно. Пересечение списков белковых лигандов ЧСА баз BioGRID и IntAct дало конечную панель, содержащую 242 записи.

2.2. Ассоциация с БА

Анализ ассоциации исследуемых панелей лигандов ЧСА с патогенезом БА был проведен путем поиска подтверждающих литературных данных. Поиск и анализ соответствующих литературных источников для низкомолекулярных

лигандов и пептидов был проведен на основе данных онлайн-ресурса Alzforum [12]. Ассоциация белковых лигандов с БА проверялась по базам DisGeNET [13] и Open Targets Genetics [14]. Использование базы данных Open Targets Genetics позволило также оценить степень ассоциации конкретного белка (гена) с заболеванием (association score).

2.3. Характеристика лигандов

Для каждой записи о низкомолекулярном и пептидном лиганде ЧСА из DrugBank были собраны данные об ID вещества, название вещества, а также поля, относящиеся к химической классификации вещества. Дополнительно были собраны физико-химические характеристики: молекулярная масса, экспериментальная и теоретическая растворимость, расчетная величина вероятности прохождения гематоэнцефалического барьера, значение полудетальной дозы. Низкомолекулярные лиганды на основании их CAS номера были исключены из списка исследуемых веществ, если они ограничены к свободному обороту на территории РФ. Для низкомолекулярных лигандов информация о концентрации в плазме крови была собрана из литературных данных, подобранных для каждой записи вручную из баз данных Pubmed и DrugBank. Для каждого белкового лиганда ЧСА дополнительно были собраны данные о доступных трехмерных структурах, DisProt ID [15] – для оценки степени внутренней неупорядоченности, а также данные о структурной классификации (SCOP [16]) и молекулярной функции. Изоэлектрическая точка и коэффициенты экстинкции были рассчитаны с помощью ProtParam tool [17]. К каждой записи лиганда был привязан номер UniProt ID, что позволило также собрать данные о клеточной локализации лиганда и отобрать только те лиганды, которые могут образовывать комплексы с ЧСА *in vivo*.

2.4. Критерии отбора

В качестве основного критерия отбора для формирования конечной панели лигандов ЧСА, способных модулировать образование его комплекса с А β , была использована строгая ассоциация с БА. Для низкомолекулярных и пептидных лигандов вторичные критерии отбора включали в себя растворимость (> 1 мкМ), вероятность (%) проникновения через гематоэнцефалический барьер (> 50 %) и концентрацию в плазме (≥ 0.5 нМ, нижний предел диапазона концентраций лиганда должен быть не ниже концентрации А β в плазме). Для белков, дополнительно к ассоциации с БА, в качестве критерия отбора была использована клеточная локализация белка.

2.5. Оценка сайтов связывания

Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов были смоделированы трехмерные комплексы низкомолекулярных, пептидных и некоторых белковых лигандов, отобранных из сформированных панелей. Трехмерная структура ЧСА была получена из Protein Data Bank [18]. Трехмерные структуры низкомолекулярных и некоторых пептидов лигандов были получены в формате sdf с сервера PubChem [19] и преобразованы в файлы pdb с помощью PyMOL v.1.6.9.0. [20]. Для остальных лигандов (высокомолекулярных пептидов и белков) структуры были получены из Protein Data Bank. Сервер ClusPro [21] использовался для моделирования комплексов ЧСА-лиганд. Для низкомолекулярных веществ и низкомолекулярных пептидных лигандов для моделирования комплексов ЧСА-лиганд использовалась программа AutoDock Vina [22].

2.6. Реализация

Реализация алгоритма идентификации и извлечения данных была осуществлена на свободно распространяемом высокоуровневом языке программирования Python 3.6 [23] в среде разработки PyCharm v.2020. Специализированная библиотека Python requests была использована для составления HTTP-запросов, а библиотека BeautifulSoup, предназначенная для парсинга веб-страниц, использовалась для обработки HTML документов, поиска и сбора данных в локальную базу. Синтаксический анализ HTML проводили с использованием методов parse(), get(), find(), findall(), get_text(). Характеристики взаимодействий в комплексах белок-лиганд были получены с помощью скрипта, написанного на языке программирования Python 3.6. Характеристики взаимодействий в комплексах ЧСА-низкомолекулярный лиганд были получены с помощью специализированного сервиса PLIP [24].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Панель низкомолекулярных веществ

На основе анализа и применении критериев отбора к списку низкомолекулярных веществ базы DrugBank была сформирована панель низкомолекулярных лигандов ЧСА небелковой природы, ассоциированных с БА. Итоговая панель кандидатов включает в себя 100 веществ, в том числе росиглитазон, метиленовый голубой, ибупрофен, рисперидон, некоторые витамины (А и В1), антибиотики (тетрациклин, мелоксикам, ампициллин) и гормоны (тестостерон, эстрадиол). Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов были смоделированы трехмерные структуры комплексов с ЧСА. На основе специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов с ЧСА вещества были

разбиты на пять групп, в каждой из которых выявлены наиболее перспективные кандидаты для дальнейшего экспериментального изучения.

На данный момент методом поверхностного плазмонного резонанса изучено влияние некоторых кандидатов (ибупрофен, рисперидон, триптофан, серотонин) на равновесные и кинетические параметры взаимодействия ЧСА с мономерной формой Аβ40/Аβ42, а также кинетику реакции фибриллообразования Аβ в присутствии ЧСА и его лигандов. Показано, что все кандидаты, изученные экспериментально, за исключением триптофана, усиливают сродство ЧСА к Аβ [25, 26].

3.2. Панель пептидных лигандов

Для формирования панели пептидов - лигандов ЧСА, потенциально способных модулировать образование комплекса ЧСА-Аβ, из базы DrugBank был отобран 21 пептид. Пептиды, являющиеся лигандами ЧСА в базах данных BioGRID и IntAct, пересекались с данными DrugBank. Применение критериев отбора и анализ соответствующих литературных источников на основе данных онлайн-ресурса Alzforum, а именно наличие более 1 источника, ассоциирующего пептид с БА, выявил 11 записей, соответствующих целям исследования. К таким веществам относятся, например, ванкомицин, инсулин детемир, семаглутид и другие.

11 пептидов были разделены на 3 группы: 1 группа (масса до 1.5 кДа) – низкомолекулярные пептиды (дипептиды, олигопептиды, циклические пептиды), 2 группа (масса 1.5 кДа- 10 кДа) – пептиды средней массы и 3 группа (масса более 10 кДа) – высокомолекулярные пептиды. Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов с ЧСА были смоделированы трехмерные комплексы ЧСА с отобранными пептидами. Для каждого пептида выявлены специфичные сайты связывания с ЧСА.

Экспериментальные и молекулярно-динамические исследования показали, что бороздка ЧСА между доменами I и III является наиболее вероятным местом связывания мономера Аβ [27]. Информация о вероятных сайтах связывания Аβ может быть использована для объяснения механизмов изменения сродства ЧСА-Аβ под влиянием лигандов ЧСА. Данный подход был успешно апробирован при изучении модулирующих эффектов ибупрофена по отношению к процессу комплексообразования ЧСА-Аβ [25].

Анализ полученных сайтов связывания ЧСА с изучаемыми пептидами показал, что наиболее перспективными для дальнейших экспериментальных исследований могут быть пептиды группы 2 (лираглутид, эксенатид, семаглутид и инсулин детемир). Эти пептиды обладают гипогликемической активностью и используются для лечения сахарного диабета. В то же время отобранные пептиды этой группы активно изучаются на предмет лечебного эффекта по отношению к БА.

3.3. Панель белковых лигандов

Для формирования панели белковых лигандов ЧСА -модуляторов комплексообразования ЧСА с Аβ, были исследованы базы данных белок-белковых взаимодействий BioGRID и IntAct (242 записи). Ассоциация выбранных лигандов с БА проверялась по базам DisGeNET и Open Targets Genetics. По соответствующему номеру UniProt ID были собраны данные о клеточной локализации лиганда (Subcellular location) для выбора только тех лигандов, которые могут образовывать комплексы с ЧСА *in vivo*. В результате конечная панель белковых лигандов содержит 34 белка.

Наиболее перспективными для дальнейших экспериментальных исследований по данным молекулярного моделирования отобранных белковых лигандов ЧСА являются белки S100A8, цистатин С, серотрансферин, ингибитор С1 эстеразы. Молекулярное моделирование их сайтов связывания с ЧСА дает пересечение с потенциальными сайтами связывания ЧСА-Аβ. Отобранные кандидаты различаются по структурному классу (по данным базы SCOP), что потенциально может приводить к различным механизмам комплексообразования с ЧСА и влиянию на его взаимодействие с Аβ.

Отобранные кандидаты вовлечены в патогенез БА. Ингибитор С1 эстеразы относится к белкам острой фазы, подавляет воспаление сосудов [28]. Серотрансферин - переносчик ионов железа в сыворотке крови [29]. Его уровень в образцах ткани головного мозга и плазмы снижен у пациентов с БА. Цистатин С (ингибитор сериновых протеаз) обладает нейропротекторной активностью, снижая гибель нейронов в том числе и после воздействия нейротоксичных форм Аβ, а полиморфизм в гене этого белка ассоциирован с повышенным риском развития БА [30]. Экспрессия S100A8 (провоспалительного медиатора) повышена в образцах сыворотки пациентов с диагнозом БА [31]. Более того, накоплены данные, подтверждающие наличие корреляции между экспрессией S100A8 и уровнем Аβ.

4. Заключение

Таким образом, нами были сформированы панели лигандов ЧСА, потенциально способных модулировать образование его комплекса с Аβ. На основе данных молекулярного докинга были выбраны наиболее перспективные кандидаты для дальнейшей экспериментальной проверки их влияния на взаимодействие ЧСА-Аβ. Для ряда веществ из сформированных панелей изучено влияние на равновесные и кинетические параметры взаимодействия ЧСА с мономерной формой Аβ40/Аβ42, а также исследована кинетика реакции фибриллообразования Аβ в присутствии ЧСА и его лигандов. Исследуемые вещества могут стать основой для дальнейшей разработки первых в своем классе препаратов для профилактики развития БА.

5. Благодарности

Исследование финансировалось РФФ, грант № 20-74-10072 (Литус Е.А.)

6. Список литературы

1. Liu J., Chang L., Song Y., Li H., Wu Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2019. V. 13. doi: [10.3389/fnins.2019.00043](https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043)
2. Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K. *et al.* The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol. Psychiatry.* 2021. V. 26. P. 5481–5503. doi: [10.1038/s41380-021-01249-0](https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0)
3. Algamil M., Milojevic J., Jafari N., Zhang W., Melacini G. Mapping the interactions between the Alzheimer's A β -peptide and human serum albumin beyond domain resolution. *Biophys. J.* 2013. V. 105. P. 1700–1709. doi: [10.1016/j.bpj.2013.08.025](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.08.025)
4. Menendez-Gonzalez M., Gasparovic C. Albumin Exchange in Alzheimer's Disease: Might CSF Be an Alternative Route to Plasma? *Front Neurol.* 2019. V. 10. doi: [10.3389/fneur.2019.01036](https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01036)
5. Boada M., López O., Núñez L., Szczepiorkowski Z.M., Torres M., Grifols C., et al. Plasma exchange for Alzheimer's disease Management by Albumin Replacement (AMBAR) trial: Study design and progress. *Alzheimers Dement (N Y).* 2019. V. 5. P. 61–69. doi: [10.1016/j.trci.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.01.001)
6. Litus E.A., Kazakov A.S., Sokolov A.S., Nemashkalova E.L., Galushko E.I., Dzhus U.F., et al. The binding of monomeric amyloid β peptide to serum albumin is affected by major plasma unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 510. P. 248–253. doi: [10.1016/j.bbrc.2019.01.081](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.081)
7. Cirrito J.R., Disabato B.M., Restivo J.L., Verges D.K., Goebel W.D., Sathyan A., Hayreh D., D'Angelo G., Benzinger T., Yoon H., et al. Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 14968–14973. doi: [10.1073/pnas.1107411108](https://doi.org/10.1073/pnas.1107411108)
8. Vlad S.C., Miller D.R., Kowall N.W., Felson D.T. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology.* 2008. V. 70. P. 1672–1677. doi: [10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63)
9. *DrugBank* URL: <https://go.drugbank.com/> (accessed 19.09.2022).
10. *BioGRID* URL: <https://thebiogrid.org/> (accessed 19.09.2022).
11. *IntAct* URL: <https://www.ebi.ac.uk/intact/home> (accessed 19.09.2022).
12. *Alzforum* URL: <https://www.alzforum.org/> (accessed 19.09.2022).
13. *DisGeNET* URL: <http://www.disgenet.org/home/> (accessed 19.09.2022).
14. *Open Targets Genetics* URL: <https://genetics.opentargets.org/> (accessed 19.09.2022).
15. *DisProt* URL: <https://disprot.org/> (accessed 19.09.2022).
16. *SCOP* URL: <https://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/> (accessed 19.09.2022).
17. *ProtParam tool* URL: <https://web.expasy.org/protparam/> (accessed 09.08.2011).
18. *Protein Data Bank* URL: <https://www.rcsb.org/> (accessed 19.09.2022).
19. *PubChem* URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 19.09.2022).
20. *PyMOL v.1.6.9.0.* URL: <https://pymol.org/2/> (accessed 09.08.2011).
21. *ClusPro* URL: <https://cluspro.bu.edu/login.php> (accessed 19.09.2022).
22. *AutoDock Vina* URL: <https://vina.scripps.edu/> (accessed 09.08.2011).
23. *Python 3.6* URL: <https://www.python.org/> (accessed 19.09.2022).
24. *PLIP* URL: <https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de> (accessed 19.09.2022).
25. Litus E.A., Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Machulin A.V., et al. Ibuprofen Favors Binding of Amyloid- β Peptide to Its Depot, Serum Albumin. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. doi: [10.3390/ijms23116168](https://doi.org/10.3390/ijms23116168)
26. Litus E.A., Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Nazipova A.A., Permyakova M.E., Raznikova E.V., Uversky V.N., Permyakov S.E. Serotonin Promotes Serum Albumin Interaction with the Monomeric Amyloid β Peptide. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. doi: [10.3390/ijms22115896](https://doi.org/10.3390/ijms22115896)
27. Choi T.S., Lee H.J., Han J.Y., Lim M.H., Kim H.I. Molecular Insights into Human Serum Albumin as a Receptor of Amyloid- β in the Extracellular Region. *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. P. 15437–15445. doi: [10.1021/jacs.7b08584](https://doi.org/10.1021/jacs.7b08584)
28. Farfara D., Feierman E., Richards A., Revenko A.S., MacLeod R.A., Norris E.H., et al. Knockdown of circulating C1 inhibitor induces neurovascular impairment, glial cell activation, neuroinflammation, and behavioral deficits. *Glia.* 2019. V. 67. P. 1359–1373. doi: [10.1002/glia.23611](https://doi.org/10.1002/glia.23611)
29. Olanow C.W. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 1993. V. 16. P. 439–444. doi: [10.1016/0166-2236\(93\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90070-3)
30. Kaur G., Levy E. Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci.* 2012. V. 5. doi: [10.3389/fnmol.2012.00079](https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00079)
31. Shen L., Liao L., Chen C., et al. Proteomics Analysis of Blood Serums from Alzheimer's Disease Patients Using iTRAQ Labeling Technology. *J Alzheimers Dis.* 2017. V. 56. P. 361–378. doi: [10.3233/JAD-160913](https://doi.org/10.3233/JAD-160913)