

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей

Директор: проф. Светлозара Петкова, доктор

Проф. Людмил Пенюв Кирацов, доктор

БИОХИМИЧНИ ОСНОВИ НА
АЛЦХАЙМЕРОВАТА БОЛЕСТ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
“Доктор на биологическите науки”

Научна специалност
01.06.10. “Биохимия”

София 2021

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по експериментална морфология, патология и
антропология с музей

Директор: проф. Светлозара Петкова, доктор

Проф. Людмил Пенюв Кирацов, доктор

БИОХИМИЧНИ ОСНОВИ НА
АЛЦХАЙМЕРОВАТА БОЛЕСТ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
“Доктор на биологическите науки”

Официални рецензенти:

Проф. д-р Димитър Кадийски, дмн
Проф. д-р Николай Лазаров, дмн
Проф. Румяна Миронова, дн

София
2021

Дисертационният труд съдържа 270 страници, онагледен е 86 фигури и 9 таблици. Библиографията включва 697 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита с решение на НС на ИЕМПАМ Протокол №8 от 18.03.2021 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 16 юни 2021 г. от 13:00 часа в Заседателната зала "Акад. Ксенофонт Иванов" на 2-ри етаж на ИЕМПАМ.

Материалите по защитата се намират на разположение на интересувашите се в секретариата на ИЕМПАМ, ул. „акад. Г. Бончев“ бл. 25.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АБ – Алцхаймерова болест

АВС – авидин-биотин комплекс

A β – амилоиден β -пептид

AChE – ацетилхолинестераза

ADAM – дизинтегрин и металопротеиназа

AMPA – алфа-амино-3-хидрокси-5-метил-изоксзол-4-пропионова киселина

APP – амилоиден прекурсорен протеин

BACE – beta amyloid cleaving enzyme

BSA – говежди серумен албумин

BSJ – back-spliced junction

CBV – Coomassie Brilliant Blue

ChAT – холинацетилтрансфераза

circРНК – кръгова РНК

Clp – cleavage and polyadenylation factor, (разделящ и полиаденилиращ фактор)

CPM – бройки на милион картирани четения

CSF – цереброспинална течност

DAB – 3,3'-диаминобензидин

DE – диференцирано експресирани

DEGs – диференцирано експресирани гени

DiI – 1,1'-диоктодецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – диметил сулфоксид

EDTA – етилендиаминтетраоцетна киселина

EGTA – етилен гликол тетраоцетна киселина

ELISA – ензимно-свързан имуносорбентен анализ

EMSA – тест за изместване на електрофоретичната мобилност

FPKM – фрагменти на килобаза от екзон за 1 милион картирани четения

GABA – гама аминомаслена киселина

GO – генна онтология

IL-1 β – интерлевкин-1 β

IP3 – инозитол трифосфат

LDH – лактат дехидрогеназа

lincРНК – дълги интервениращи некодирани РНК

lncРНК – дълги некодиращи РНК

LPS – липополюзахарид

LTP – дългосрочно потенциране

mAChR – мускаринови ацетилхолинови рецептори

MAPK – митоген-активирана протеин киназа

mAPP – мембранно-свързания APP

MEA – чип с микроелектроди

MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид

NGF – невронален растежен фактор

NMDA – N-метил-D-аспартат рецептор

PAGE – полиакриламидна гел електрофореза

PBS – фосфат-буфериран солен разтвор

PKC – протеин киназа C

PMA – фоболмиристат ацетат

PMSF – фенилметилсулфонил флуорид

PrP – прион протеин

PSD – постсинаптично уплътнение

PVDF – поливинилиденфлуорид

ROS – реактивни кислородни видове

SAP – сапорин

sAPP – секреторен амилоиден прекурсорен протеин

SDS – натриев додецилсулфат

SDS-PAGE – натриев додецилсулфат-полиакриламидна гел-електрофореза

SEM – стандартна грешка на средната аритметична

Sham – привидно

TBS – Tris-буфериран солен разтвор

TBST – TBS + 0,1% Tween 20

TLCK – тозил-L-лизил-хлорометанхидрохлорид

TPM – транскрипти на милион

VEGF – васкуларен ендотелен растежен фактор

WT – див тип

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Алцхаймеровата болест е най-честото дегенеративно заболяване на човешкия мозък и е преобладаващият тип деменция. Според статистиката през 2019 г. заболялите в световен мащаб са били над 50 милиона, като се предполага, че са диагностицирани по-малко от 25% от заболялите. Според очакванията за 2020 г. само в САЩ заболялите ще бъдат около 5,8 милиона. Отнесено спрямо населението, по-възрастно от 65 г., това представлява около 10%. В САЩ Алцхаймеровата болест се нарежда на 6-то място като причина за смъртта, а при възрастовата група над 65 г. – на 5-то място. Докато смъртността от други заболявания в последните две десетилетия намалява, при Алцхаймеровата болест тя се увеличава. Това се дължи на факта, че основен рисков фактор при тази болест е възрастта, като честотата на заболяването достига до 50% при хората над 80 години. При постоянната промяна на демографската структура на обществото в полза на по-възрастната група хора, броят и процентът на заболялите непрекъснато се увеличава и Алцхаймеровата болест се превръща в сериозен социален и икономически проблем.

Предполагаемите разходи за медицинско и социално обслужване на Алцхаймеровите пациенти в световен мащаб се преценяват на над 1 трилион долара с тенденция за постоянно увеличаване, тъй като причините за болестта не са достатъчно добре изяснени, за да може да бъде открита ефективна терапия.

Въпреки че Алоис Алцхаймер наблюдава случай на нетипична форма на деменция още от 1901 г. и през 1907 г. публикува наблюденията си, което води до наименоване на болестта с неговото име, за начало на задълбочените изследвания на етиологията на Алцхаймеровата болест може да се смятат 90-те години на миналия век. Оттогава има лавинообразно увеличение на изследванията и хипотезите за причините на болестта, които обхващат многобройни системи в мозъка и дори периферни органи. Според статистиката на National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, само през 2018 г. са публикувани 12 547 статии с изследвания, в които има ключова дума “Алцхаймер“.

Досегашните резултати показват, че Алцхаймеровата болест е мултифункционална и въпреки натрупаната огромна информация откриването на ефективна терапевтична стратегия ще бъде много трудно.

Тези предизвикателства мотивираха нашите изследвания върху биохимичните основи на Алцхаймеровата болест, които представяме обобщено тук.

2. ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Целта на представените изследвания е да допринесат за изясняване на етиологията на Алцхаймеровата болест и да се създадат експериментални модели, които да помогнат за това.

Подходът и задачите, които си поставяхме за постигане на тази цел, се определяха в зависимост от постигнатите резултати, които ни даваха насока за по-нататъшните изследвания. Огромна роля за определяне на предстоящите задачи имаше информацията за напредъка на изследванията в тази област, получавана от публикациите в специализираните издания. Също така решаващо за избор и подготовка на следващо проучване беше развитието на техниките за научни изследвания и нашият достъп до тях.

Представените изследвания са проведени в дълъг период от време и е ясно, че не беше възможно да предвидим в началото точния път, по който ще се осъществява постигането на поставената цел.

3. КРАТКА ИСТОРИЯ

Историята на Алцхаймеровата болест (АБ) започва през 1901 година, когато в „Институцията за луди и епилептици” във Фракфурт на Майн е приета пациентката Аугусте Детер, която страда от загуба на памет и халюцинации. Протоколът, попълнен от приемащия психиатър, остава в историята на науката:

- Как се казвате?
- Аугусте.
- Фамилия?
- Аугусте.
- Как се казва съпругът Ви?
- Мисля, че Аугусте...



Аугусте Детер

От тук започва изследването на болестта, която впоследствие получава името на психиатъра – Алоис Алцхаймер. Той бързо разбира, че при пациентката не става дума за възрастова деменция, тъй като тя е само на 51 години. Първоначалната диагноза е пресенилна лудост.



Алоис Алцхаймер

По времето, когато Алцхаймер се премества в Мюнхен (1903 г.), все още няма единна класификация на психическите заболявания. Дори органичният им произход се поставя под съмнение. Алцхаймер продължава да се интересува от състоянието на тази пациентка, което се влошава значително и стига до „пълно оглупяване” (по неговите записки) при нейната смърт през 1906 г. При изучаване на мозъка ѝ под микроскоп той първи описва морфологичните изменения, характерни за този тип деменция. През 1910

г. проф. Крепелин, при когото Алцхаймер е асистент, в книгата си „Учебник по психиатрия” дава на този тип деменция името „Алцхаймерова болест”.

Наблюдаваните от Алцхаймер изменения са: дегенерация на кортикални неврони, извънклетъчни сенилни плаки и вътреклетъчни отлагания на неврофибриларни клъбца. По-късно е установено, че неврофибриларните клъбца се състоят от нетипично фосфорилиран τ -протеин, който в нормалната си форма участва в изграждането на вътрешния скелет на клетките. Сенилните плаки се състоят от ядро от амилоид, което често е обградено от фрагменти от дегенерирали неврони, както и от микроглия и астроцити. За Алцхаймер тези наблюдения потвърждават теорията му, че психическите заболявания имат органична причина, което в тези години не е било общоприето.

Едва 80 години по-късно Glenner and Wong (1984) публикуват свои изследвания, според които ядрото на сенилните плаки се състои от агрегирал пептид, наречен амилоиден β -пептид ($A\beta$), който е и първият заподозрян като причинител на увреждането на нервните клетки, наблюдавано при АБ. Три години по-късно групата на Beyreuter и Masters правят огромна крачка напред, като установяват, че $A\beta$ е част от по-голям прекурсорен протеин – амилоидния прекурсорен протеин (APP). Те установяват и аминокиселинната му последователност и локализацията на гена, който го кодира. Това дава огромно поле за изследвания на биохимичните основи на АБ.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Определяне на белтък

4.2. Обработка на тъканите за разделяне на фракции, съдържащи мембранни и разтворими белтъци

4.3. Натриев додецил сулфат - полиакриламидна гелелектрофореза и имуноблот

4.4. Изследване на секрецията на APP от срезове от мозъчната кора на плъх

4.4.1. Материали

4.4.2. Животни и обработка на тъканите

4.4.3. Изследване на трансмитер-стимулираната секрецията на APP

4.4.4. Имунопреципитация

4.5. Методи, използвани при изследване на влиянието на васкуларния ендотелен растежен фактор върху метаболизма на APP

4.5.1. Трансгенни животни

4.5.2. Препариране, култивиране и третиране на мозъчните срезове

4.5.3. VEGF ензимно-свързан имуносорбентен анализ

4.5.4. Имунохистохимия на VEGF

4.5.5. Анализ на съдържанието на фибриларен и разтворим $A\beta$ -пептид

4.5.6. Определяне на активността на α - и β -секретазите

4.5.7. LDH тест

4.5.8. Тест за свързване на тиофлавин-Т

- 4.5.8.1. Аβ препарации, използвани за теста за свързване на тιοфлавин-Т
- 4.6. Експериментални процедури за изследване влиянието на интерлевкин-1β върху сигналната каскада на мускаринови ацетилхолинови рецептори
 - 4.6.1. Клетъчна култура
 - 4.6.2. Стимулационни експерименти
 - 4.6.3. Преживяемост на клетките
 - 4.6.4. Хидролиза на [³H]фосфоинозитид
 - 4.6.5. Радиохимично определяне на активността на AChE
 - 4.6.6. Тест за изместване на електрофоретичната мобилност
- 4. 7. Методи, използвани при изследване на ефектите на частична холинергична денервация в мозъка на плъх върху секрецията на APP
 - 4.7.1. Холинергична имунолезия
 - 4.7.2. Трансплантация на фибробласти
 - 4.7.3. Подготовка на тъканта
 - 4.7.4. Хистохимия
 - 4.7.5. Биохимия
- 4. 8. Методи, използвани при изследване на ефектите на частична холинергична денервация в мозъка на Tg2576 мишки върху метаболизма на APP
 - 4.8.1. Опитни животни и третиране
 - 4.8.2. Измерване на нивата на разтворим и фибриларен β-амилоиден пептид
 - 4.8.3. Имуноблот
 - 4.8.4. Fluoro-Jade B
 - 4.8.5. Имунофлуоресценция
 - 4.8.6. In situ хибридизация
 - 4.8.7. МТТ-тест за преживяемост на клетките
- 4.9. Стимулиране на синаптозоми за изследване на секрецията на APP
- 4.10. Методи използвани за изследване на онтогенетичните промени в експресията на APP
 - 4.10.1. Опитни животни и обработка на тъканите
 - 4.10.2. Изолиране на растежни конуси и синаптозоми
 - 4.10.3. In situ хибридизация
- 4.11. Третиране на експериментални животни с олово
- 4.12. Метод за изследване на електричната активност на невронални клетки, култивирани върху мрежа от микроелектроди
- 4.13. Методи, използвани за изследване на транскриптома в синаптозоми от мозъка на мишки
 - 4.13.1. Опитни животни и обработка на тъканите
 - 4.13.2. Изолиране на РНК
 - 4.13.3. Секвениране на РНК
 - 4.13.4. Картиране на последователността чрез четене, сглобяване на транскриптите и диференциално квантифициране
 - 4.13.5. Класифициране на предполагаеми lincРНК и антисенс транскрипти
 - 4.13.6. Анализ на метаболитните пътища
 - 4.13.7. RT-PCR и RT-qPCR потвърждаване на Clp1 генната експресия
 - 4.13.8. Имуноблот
 - 4.13.9. Имунохистохимия
- 4.14. Методи, използвани за изследване на транскриптома в синаптозоми от мозъка на мишки
 - 4.14.1. Биоинформативна идентификация на кръгови circРНК
 - 4.14.2. Биоинформативна идентификация на линейни РНК

- 4.14.3. Биоинформативно определяне на диференциална експресия на *circ*РНК
- 4.14.4. Определяне на дължините на *circ*РНК
- 4.14.5. Анализ на биологичния път на *circ*РНК
- 4.14.6. Корелационен анализ
- 4.14.7. Щамове мишки и изолиране на мозъчната тъкан
 - 4.14.7.1. Изолиране на синаптозоми
- 4.15. Статистически анализ

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Характеризиране и сравняване на методите за определяне на белтък на Lowry и на Bradford

Коректното определяне на количеството белтък в биологични проби, състоящи се от смес на различни видове протеини и множество други макромолекули, е изключително важно при нашите изследвания. Методът на Lowry et al. (1951) е най-широко използваният при измерване на белтъчното съдържание. Впоследствие широко приложение получи методът на Bradford (1976). Предимство при него е бързината, както и че не се наблюдават смущения от редица вещества, които пречат при метода на Lowry. Отбелязват се обаче проблеми, като липса на линейност между развитието на цветната реакция и общото съдържание на белтък. Както и значителното подценяване на белтъчното съдържание на фракции, съдържащи биологични мембрани.

Ние рутинно използваме метода за определяне на белтък на Lowry. При нашите изследвания често се налага да измерваме белтъка в голям брой проби, което ни изкуши да използваме бързия метод на Bradford. Тъй като повечето изследвани фракции съдържат значително количество биологични мембрани, проведохме серия от експерименти, за да характеризираме двата метода и да проверим дали употребата на разрушаващи биологичните мембрани агенти може да коригира несъответствието между тях, както и да проверим дали е възможно да се изчисли фактор, който да позволи директното сравняване на двата метода.

При характеризирането на метода на Lowry проследихме развитието на цветната реакция след добавянето на реагента на Folin-Ciocalteu, за да изберем най-подходящия времеви интервал за отчитане на стандартите и пробите. Установихме, че цветната реакция е достигнала своя максимум след 80 min и остава стабилна още 2 часа, което дава възможност за коректното измерване на голям брой проби. В съответствие с публикацията на Lowry повечето изследователи използват 30 min време за реакция. Това обаче може да доведе до грешки от повече от 20% при

сравняването на резултати, получени в началото и в края на измерването на голяма серия от проби. Също така установихме, че предварителна обработка на съдържащи мембрани фракции с 0,1 до 1 N NaOH или 0,5% SDS не увеличава измерената стойност на белтъка. Концентрации от 1 N NaOH и 0,5% SDS обаче повлияват стабилността на цветната реакция, като интензитетът ѝ започва да намалява веднага след достигане на максимума.

При метода на Bradford също проследихме развитието на цветната реакция. Установихме, че времето, необходимо за развитие на максимална цветна реакция, както и времевият интервал, през който тя остава стабилна, е в обратно пропорционална зависимост от белтъчното съдържание на пробата. Интензитетът на цветната реакция на стандартните проби, съдържащи между 5 и 60 μg белтък, оставаше стабилен между 10-тата и 20-тата минута след началото, докато при стандарта, съдържащ 80 μg белтък, интензитетът започва значително да намалява още след 10-тата минута.

За да характеризираме някои модификации на метода на Bradford, изследвахме ефекта на NaOH и детергентите Triton X-100, SDS и SDCh върху развитието на цвета, неговата стабилност и количеството определен белтък. Основавайки се на получените резултати за по-нататъшната си работа, използвахме детергентите в концентрации които не повлияват цветната реакция. Добавяне на SDCh дори в най-ниска концентрация, водеше до силна преципитация, което не позволява използването му. Наличието на 1 M NaOH не влияе на развитието на цвета. При пробите, които бяха обработени с детергент или 1 M NaOH, също се наблюдаваше обратнопропорционална зависимост между съдържанието на белтък и развитието и стабилността на цвета.

За да сравним резултатите, получени при използване на двата метода за определяне на белтъка в хомогенат (H), фракция, съдържаща мембранно-свързани белтъци (P), и фракция, съдържаща разтворими белтъци (S), изравнихме съдържанието на белтък в тях, взимайки за критерий определянето по метода на Lowry. След това определихме съдържанието на белтък в тези фракции с метода на Bradford.

Получените резултати показват, че предварителната обработка с разрушаващи мембраната реактиви повишава стойностите на определяния белтък в съдържащите биологични мембрани фракции P и H (**Табл. 1**). При сравняването на резултатите установихме, че с метода на Bradford се получават по-ниски стойности,

което не може да бъде коригирано с предварителната обработка на пробите. Очаквано разликите са най-големи при фракцията, съдържаща биологични мембрани Р.

Табл. 1. Сравняване на стойностите, получени при определянето на белтък по метода на Lowry и по оригиналния метод на Bradford и негови модификации

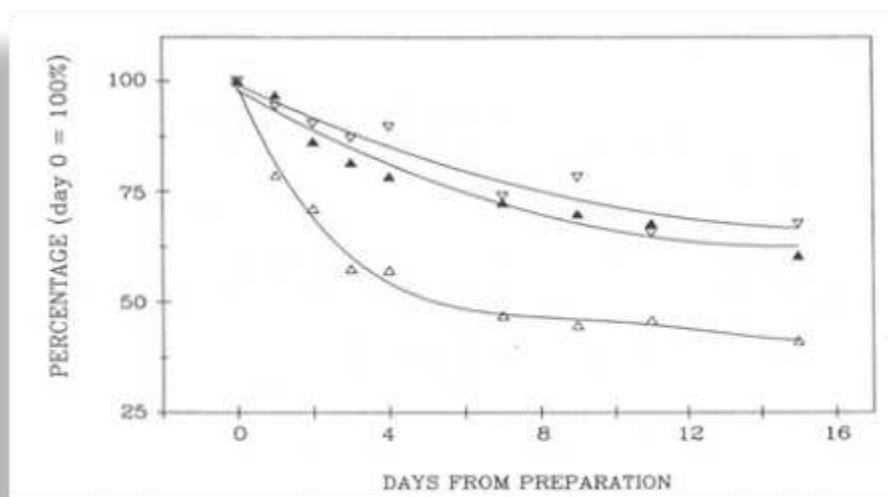
Обработка	Н	Р	С
Lowry	100,0	100,0	100,0
Bradford	51,8	42,1	89,3
NaOH-Br	84,5	78,9	86,4
SDS-Br	83,6	80,6	85,4
Triton X-100-Br	80,7	78,9	82,8

Легенда: Н – хомогенат; Р – фракция, съдържаща мембранно-свързани белтъци; С – фракция, съдържаща разтворими белтъци; Lowry – метод на Lowry; Bradford – метод на Bradford; NaOH-Br, SDS-Br, Triton X-100-Br – модификации на метода на Bradford, включващи предварителна обработка на пробите със съответния реагент. Стойностите, получени по метода на Lowry, са взети за 100%.

По време на изследванията установихме, че при определянето на белтък по метода на Bradford във фракции, съхранявани при -20°C, се получават по-ниски стойности, което не се наблюдава при метода на Lowry. Намалената способност на цветния реагент да се свързва с белтъците след съхраняване на пробите при -20°C, което нарекохме „стареене“, е най-изявена при мембранната фракция (Фиг. 1). Наблюдаваното при фракцията, съдържаща разтворими белтъци „стареене“, може да се обясни с наличието в нея на известни количества мембранно-свързани белтъци, съдържащи се в малки микrozоми.

Обработката на съхраняваните при -20°C проби с NaOH или детергенти води до известно повишаване на стойностите. Интересно е, че при сравняване на техния ефект се оказва, че по време на изследвания период на „стареене“ те предизвикват винаги едно и също увеличение (Табл. 2).

Тези резултати ни насочват към заключението, че в биологичните мембрани съществуват места за свързване, които не са повлияни от факторите, предизвикващи „стареене“. Те стават достъпни само след разрушаване на мембраната. Това означава, че свързващите места, които се променят в процеса на „стареене“, са лесно достъпни за взаимодействие с околната среда.



Фиг. 1. Загуба на способност на цветния реагент за свързване с белтъците след съхраняване на пробите при -20°C (метод на Bradford). Стойността на определения белтък, измерена в деня на получаване на фракциите (day 0), е взета за 100%. Измерванията в следващите дни са проведени с прясно размразени аликвоти. Отворени триъгълници – фракция, съдържаща мембранни белтъци; попълнени триъгълници – хомогенат; обърнати триъгълници – фракция, съдържаща разтворими белтъци.

Табл. 2. Увеличение на определения по метода на Bradford белтък (в μg), в проби, съхранявани при -20°C , получено след предварителна обработка на пробите

Обработка	Н	Р
NaOH-Br	$15,12 \pm 2,58$	$23,59 \pm 1,45$
SDS-Br	$15,97 \pm 1,86$	$24,30 \pm 0,95$
Triton X-100-Br	$14,81 \pm 1,66$	$24,39 \pm 1,17$

Забележка: Стойностите са изчислени в μg белтък, като от стойностите, получени след предварителна обработка с NaOH или детергенти, са извадени стойностите, получени с оригиналния метод на Bradford. Определянията на белтък бяха извършени в деня на получаване и 1, 3, 5, 9, 11 и 15 дни след замразяване на пробите при -20°C . Резултатите са показани като средна стойност $\pm$ SD. За още информация виж Табл. 1.

Chiappelli et al. (1979) предлагат да се въведе коефициент за преизчисление, с който да се компенсира разликата между двата метода. Наблюдаваните промени при съхранение на пробите при -20°C поставя ограничения за използването на такъв коефициент. Поради променящата се в зависимост от продължителността на съхранение свързваща способност, коригиращият коефициент също трябва да се променя във времето. Освен това различните фракции имат специфичен профил на „стареене“ и коефициентът би трябвало да е съобразен и с това.

В заключение може да се каже, че оригиналният метод на Bradford и изследваните от нас модификации не могат да се използват директно за коректно определяне на белтъчното съдържание на тъканни фракции, особено на съдържащи мембранно-свързани белтъци. Наблюдаваната промяна в свойствата на фракциите при съхраняване при -20°C е допълнително ограничение за използването на метода на Bradford и сама по себе си е феномен, който може да е от значение и при други методи.

5.2. Влияние на глутамат върху секрецията на APP от срезове от мозъчната кора на плъх

Повечето експерименти, при които се стимулират различни рецептори, са проведени с клетъчни култури. Клетъчните култури са опростен модел, който не винаги възпроизвежда точно процесите, протичащи в комплексната мозъчна тъкан. Моделът, при който се използват нативни мозъчни срезове, предоставя условия, много по-близки до тези в интактната мозъчна тъкан. Затова резултатите, получени при стимулиране на рецептори, проведени с нативни мозъчни срезове, по-убедително показват, че процесираването на APP се регулира от невроналната активност. Например Farber et al. (1995) показват, че активирането на мускаринови рецептори в мозъчни срезове показва комплексно взаимодействие между субтиповете мускаринови рецептори при повлияването на секрецията на APP. Холинергичният агонист карбахол повишава освобождаването на секретирания APP (sAPP) само в присъствието на антагонист на M2 рецептора, което подсказва, че активирането на M2 рецепторите води до потискане на образуването на sAPP.

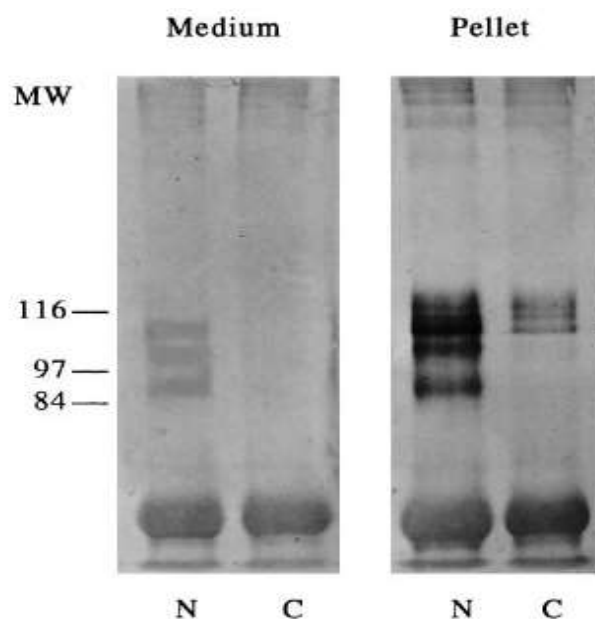
При болни от АБ се наблюдава нарушена функция на холинергичната трансмитерна система. Освен за промени при маркерите на холинергичната система, се съобщава и за промени при кортикалните глутаматни рецептори. От изследвания, проведени с клетъчни култури, са получени данни, че активирането на глутаматни рецептори може да повиши секрецията на APP. Все пак клетъчните линии не предоставят физиологични условия, а нямаше публикувани изследвания със стимулиране на субтипове на глутаматни рецептори в нативни мозъчни срезове. Затова целта на нашите експерименти беше да установим дали активирането на глутаматни рецептори може да повлияе освобождаването на sAPP от нативни срезове на мозъчната кора в стационарна инкубационна среда, както и дали различни субтипове глутаматни рецептори повлияват различно секретирания на

APP при този модела.

За да установим дали в инкубационния разтвор има само секретирани форми на APP или при тези експериментални условия има и неспецифично освобождаване на интактен APP, извършихме изследвания с имунопреципитация. Тя беше направена в инкубационната среда и в хомогенизираните срезове посредством 30 минутна инкубация с поликлонален антисерум, разпознаващ N-терминален епитоп в APP, и с друг разпознаващ епитоп в C-терминалната част. След разделянето посредством SDS-PAGE, APP-формите бяха доказани с антитялото 22C11, което разпознава епитоп в N-терминалната част на APP-молекулата и затова може да се използва за доказване както на N-терминални извънклетъчни разградни продукти на APP, така и на неразградения цял APP. Резултатите показват, че в инкубационната среда има само секреторни форми на APP, при които липсва C-терминалната част, докато в мозъчните срезове се разпознават и цели молекули APP (**Фиг. 2**).

Инкубацията на срезове от мозъчната кора за 30 min при 37°C (след 60 min преинкубация) без стимулиращи реагенти водеше до базална секреция на APP, която се приемаше за контролна стойност. Добавянето на глутамат в инкубационната среда повлияваше концентрационно зависимо количеството APP, секретирано в инкубационната среда. Ефектът беше бифазен, като секрецията се повишаваше максимално при 50 μ M глутамат и намаляваше при по-високи концентрации. Остойносттаването на имуноблота посредством денситометричен анализ показва, че секрецията на APP се повишава с $16\% \pm 7$ при 0,5 μ M L-глутамат, с $18\% \pm 6$ при 5 μ M, с $32\% \pm 10$ при 50 μ M, с $19\% \pm 8$ при 500 μ M и с $18\% \pm 6$ при 5 mM L-глутамат (**Фиг. 3**).

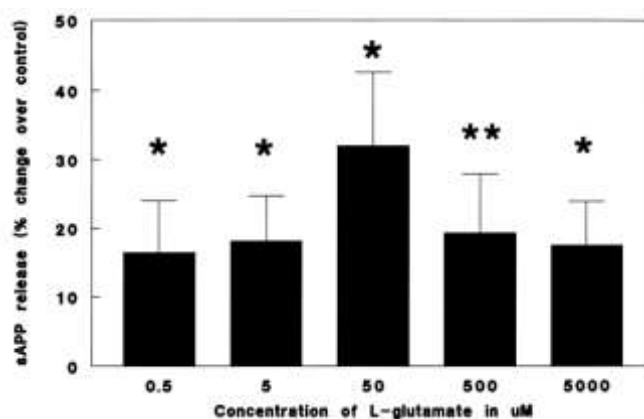
За да проучим дали ефектът на L-глутамат се осъществява чрез определени субтипове глутаматни рецептори, инкубирахме мозъчните срезове със специфични агонисти на различни рецептори. Използвахме L-CCG-I – potentен агонист на метаботропния глутаматен рецептор, (1R, 3R)-ACPD – специфичен агонист на NMDA рецептора и (RS)-бромохомоиботенова киселина – агонист на AMPA рецептора. Репрезентативни за тези експерименти имуноблотовете са представени на **фигура 4**.



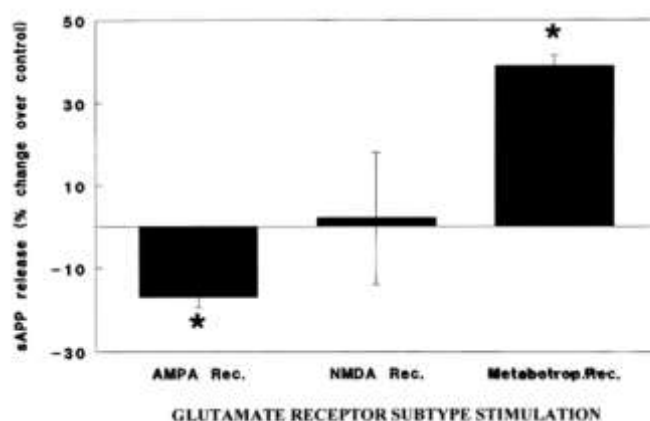
Фиг. 2. Репрезентативен имуноблот, получен след имунопреципитация в инкубационната среда (medium) и в мозъчните срезове (pellet). Използвани са антитела, специфично разпознаващи цитоплазмената (C) или извънклетъчната (N) част на APP (респективно antiA4CT и antiFdAPP). APP-формите бяха доказани с антитялото 22C11, което разпознава епитоп в N-терминалната част на APP-молекулата и доказва както N-терминални разградни продукти на APP, така и неразграден цял APP. Вижда се, че в инкубационната среда има само секреторни форми на APP (преципитирани с antiFdAPP), а antiA4CT не разпознава нищо. В срезове са преципитирани както C-, така и N-терминално интактни продукти. MW – молекулно тегло в килодалтон.

Добавянето на глутамат в инкубационната среда повлияваше концентрационно зависимо количеството APP, секретирано в инкубационната среда. Ефектът беше бифазен, като секрецията се повишаваше максимално при 50 μ M глутамат и намаляваше при по-високи концентрации. Остойносттаването на имуноблота посредством денситометричен анализ показва, че секрецията на APP се повишава с $16\% \pm 7$ при 0,5 μ M L-глутамат, с $18\% \pm 6$ при 5 μ M, с $32\% \pm 10$ при 50 μ M, с $19\% \pm 8$ при 500 μ M и с $18\% \pm 6$ при 5 mM L-глутамат (Фиг. 3).

За да проучим дали ефектът на L-глутамат се осъществява чрез определени субтипове глутаматни рецептори, инкубирахме мозъчните срезове със специфични агонисти на различни рецептори. Използвахме L-CCG-I – potentен агонист на метаботропния глутаматен рецептор, (1R, 3R)-ACPD – специфичен агонист на NMDA рецептора и (RS)-бромохомоиботенова киселина – агонист на AMPA рецептора. Остойносттаването на тези резултати е представено на **фигура 4**.



Фиг. 3. Остойностяване на ефекта на L-глутамат върху секрецията на APP. Имуноблотите бяха анализирани денситометрично. Данните представляват средна стойност, получена от 5 до 13 експеримента, и са представени като процентно увеличение спрямо базалната секреция на APP при отсъствието на L-глутамат. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ спрямо контролата, t -тест на Стьюдент.



Фиг. 4. Остойностяване на ефекта на агонисти на различни субтипове глутаматни рецептори върху секрецията на APP. Нативни срезове от мозъчната кора на плъх бяха инкубирани в присъствието на 50 nM концентрации на L-CCG-I – potentен агонист на метаботропния глутаматен рецептор, (1R, 3R)-ACPD – специфичен агонист на NMDA рецептора и (RS)-бромохомоиботенова киселина – агонист на AMPA рецептора. Показаните стойности са усреднени от четири експеримента и са представени като относителна промяна в проценти спрямо базовата секреция при отсъствие на стимулация (control = 0%). * $P < 0,001$ спрямо контролата, Стьюдент t -тест.

Представените данни показват, че L-глутамат повлиява процесирването на APP в срезове от мозъчната кора *in vitro*. Това означава, че глутаматергичната невротрансмисия участва в контролирането на метаболизма на APP в кората на главния мозък. Стимулирането на глутаматните рецептори с различни концентрации L-глутамат показва комплексен фармакологичен профил на ефекта върху освобождаването на sAPP: секрецията на APP се увеличава над базалното ниво при ниски концентрации L-глутамат, достигайки максимум при 50 μM , докато по-

високи концентрации L-глутамат понижават секрецията. Бифазният характер на ефекта подсказва, че различни субтипове глутаматни рецептори влияят различно на освобождаването на sAPP, като стимулирането на метаботропния глутаматен рецептор води до повишаване на секрецията на APP, докато стимулирането на AMPA рецептора намалява секрецията. Стимулирането на NMDA рецептора няма ефект върху освобождаването на sAPP. Следователно бифазният характер на ефекта може да се обясни така – при ниски концентрации на L-глутамат се активира предимно метаботропният рецептор, което води до увеличаване на секрецията на APP. При по-високи концентрации се активира и AMPA рецепторът и неговият ефект върху секрецията компенсира повишението, предизвикано от метаботропния рецептор.

Интересно е изследването на Rossner et al. (1995), което показва, че холинергична хипофункция в кората на главния мозък води до намалено свързване на NMDA и увеличено свързване на AMPA. Следователно зависимостта от глутамат процесиране на APP може да се контролира от кортикалната холинергична активност, което показва колко комплексно може да е регулирането на секрецията на APP.

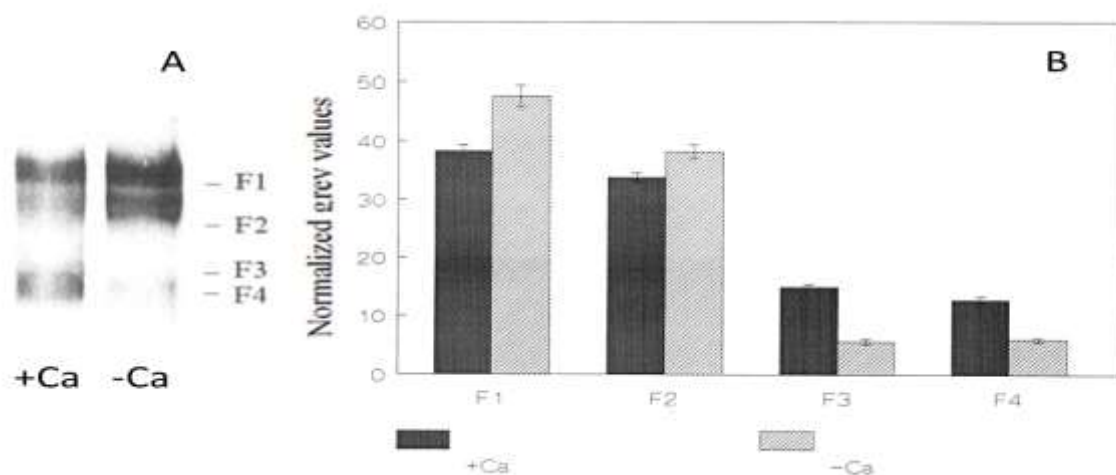
5.3. Характеризиране на фактори, повлияващи секрецията на APP от нативни мозъчни срезове

5.3.1. Влияние на Ca^{2+} върху секрецията на APP

Вземайки предвид, че Ca^{2+} е важен вторичен посредник в междуклетъчната сигнализация, както и ролята му в редица физиологични процеси, използвахме моделната система с нативни мозъчни срезове, за да изследваме ефекта на Ca^{2+} върху секрецията на APP (Фиг. 5А, В).

При отсъствието на Ca^{2+} се наблюдава увеличение на двете черти с по-високо молекулно тегло и намаление на двете с по-ниско. Изместването на съотношението би могло да бъде обяснено с това, че при отсъствие на Ca^{2+} се инхибира секрецията на sAPP-изоформи, съответстващи на чертите F3 и F4. Ако има инхибиране на секрецията на sAPP-изоформи, то трябва да се очаква, че инкубирането на мозъчните срезове в среда без Ca^{2+} ще доведе до тяхното акумулиране в тъканта в сравнение със срезовете, инкубирани в присъствието на Ca^{2+} . За да проверим тази хипотеза, изследвахме и сравнихме спектъра на APP в

мозъчни срезове, инкубирани в присъствието и в отсъствието на Ca^{2+} . След инкубацията срезовете бяха хомогенизирани и от тях бяха разделени фракции, съдържащи мембранно-свързани и разтворими (секретирани) форми на APP. При сравняването на сбора на оптичната плътност на четирите основни sAPP-черти, както и съотношението между тях, не намерихме промяна, зависеща от присъствието или отсъствието на Ca^{2+} . Това доказва, че промяната в съотношението на sAPP-чертите при отсъствие на Ca^{2+} не се дължи на инхибиране на секрецията на определени изоформи. Тази промяна най-вероятно се дължи на допълнително Ca^{2+} -зависимо протеолитично процесирание на вече секретираните APP-форми. Допълнителната физиологична протеолиза на sAPP позволява предположението, че различните биологични активности може да се осъществяват от различни протеолитични продукти на sAPP.



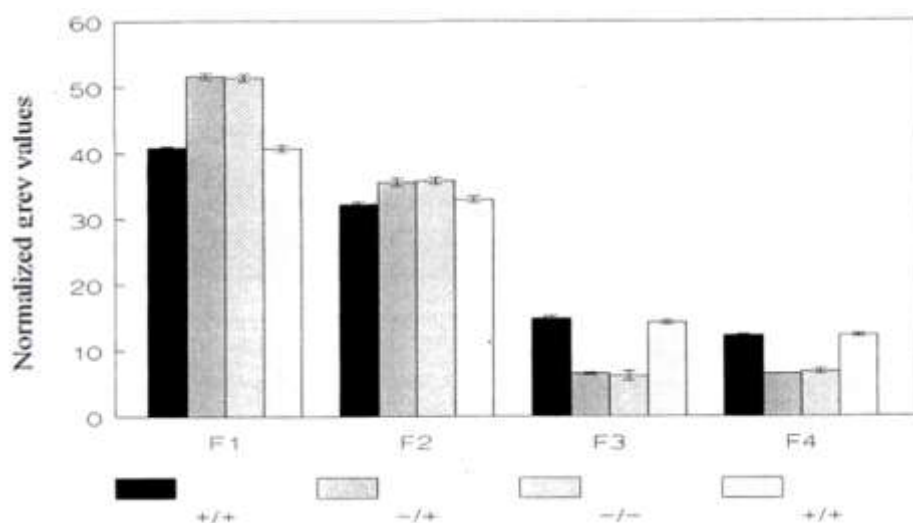
Фиг. 5 А: Репрезентативен имуноблот, показващ освобождаването на sAPP в присъствието (+Ca) и отсъствието (-Ca) на Ca^{2+} в инкубационната среда. В: Остойностяване на съотношението на четирите основни sAPP-черти, освободени в присъствието (+Ca) и отсъствието (-Ca) на Ca^{2+} .

За да изключим възможността наблюдаваната протеолиза на sAPP да се дължи на неспецифично изтичане на Ca^{2+} -зависими протеази от мозъчните срезове в инкубационната среда, направихме поредица от експерименти. Първо инкубирахме срезовете 30 min, едните в присъствието (1,25 mM Ca^{2+}), а другите в отсъствието на Ca^{2+} (Инкубация 1). След това разделихме срезовете и инкубационната среда чрез центрофугация. Към отделената инкубационна среда добавихме Ca^{2+} или същия обем H_2O и отново инкубирахме 30 min (Инкубация 2).

Схемата беше както следва:

Инкубация 1	Инкубация 2	Обозначение
+Ca ²⁺	+Ca ²⁺	+/+
-Ca ²⁺	+Ca ²⁺	-/+
-Ca ²⁺	+H ₂ O	-/-
+Ca ²⁺	+H ₂ O	+/-

Остойносттаването на четирите основни секретирани APP-форми след втората инкубация е показано на **фигура 6**. Вижда се, че добавянето на Ca²⁺ в инкубационната среда (след първата инкубация) не води до промяна в спектъра на sAPP-фракциите.

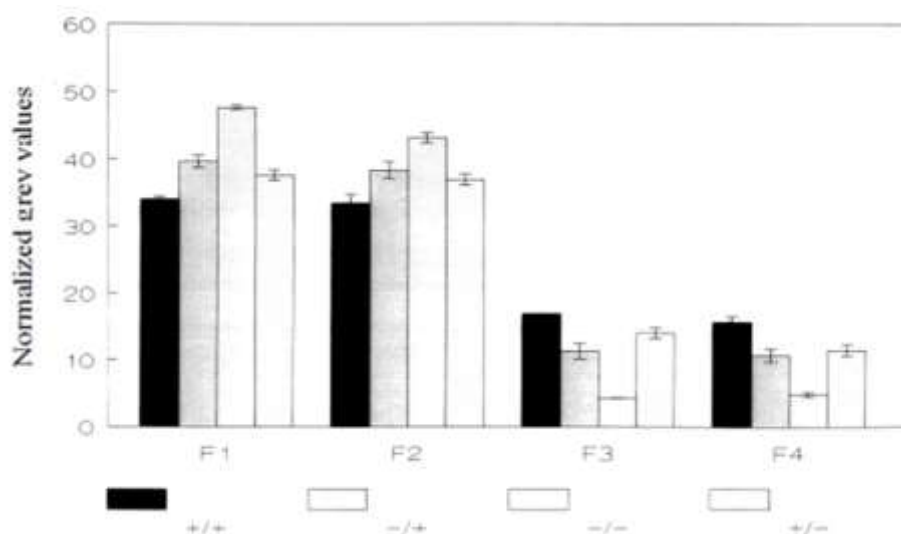


Фиг. 6. Ефект на Ca²⁺ върху процесирането на sAPP. Обозначението на поредността на добавяне на средата с или без Ca²⁺ е представено в таблицата по-горе. Стойностите за четирите основни sAPP-черти са изразени като процент от сбора на оптичните плътности на всички черти и са усреднени от пет независими експеримента.

Отделените след първата инкубация мозъчни срезове бяха ресуспендирани в същата инкубационна среда, в която ще се проведе втората инкубация, и преинкубирани в нея за един час. След това бяха преместени в прясна инкубационна среда и инкубирани 30 min, след което се изследваше спектърът на отделените в средата sAPP-форми. Схемата беше както следва:

Инкубация 1	Инкубация 2	Обозначение
+Ca ²⁺	+Ca ²⁺	+/+
-Ca ²⁺	+Ca ²⁺	-/+
-Ca ²⁺	-Ca ²⁺	-/-
+Ca ²⁺	-Ca ²⁺	+/-

След повторна инкубация на мозъчните срезове в среда като първата (с $\text{Ca}^{2+} = +/+$ или без $\text{Ca}^{2+} = -/-$) очаквано не се наблюдава промяна с спектъра на sAPP-формите. Промяната на инкубационната среда за втората инкубация (+/- или -/+) предизвиква ясно изместване в съотношението между двете фракции с по-високо молекулно тегло и двете с по-ниско (Фиг. 7). Това ясно показва, че допълнителното Ca^{2+} -зависимо процесирание на sAPP се извършва физиологично в мозъчната тъкан, най-вероятно от мембранно-асоциирани фактори.

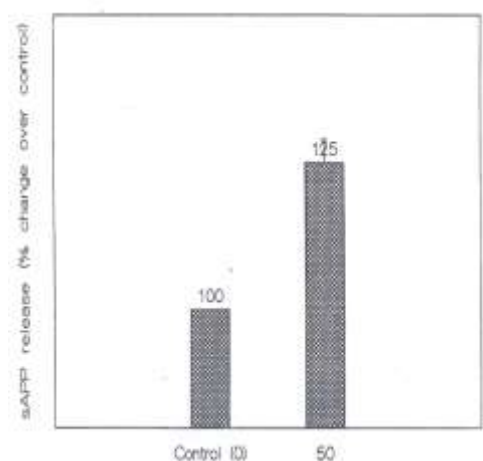


Фиг. 7. Ефект на Ca^{2+} върху процесирането на sAPP. Обозначението на поредността на присъствие или отсъствие на Ca^{2+} е представено в таблицата по-горе. Стойностите за четирите основни sAPP-черти са изразени като процент от сбора на оптичните плътности на всички черти и са усреднени от пет независими експеримента.

5.3.2. Глутамат стимулира секрецията на APP – има ли обратна връзка между секретираният sAPP-форми и секрецията?

Използвайки модела на нативни срезове от кората на главния мозък на плъх, ние показахме, че глутамат модулира секрецията на APP. При този модел срезовете се инкубират в дефиниран обем буфер и след това се изследват освободените в него sAPP-форми. В литературата нямаше данни дали sAPP може да повлияе секретирането на APP. По време на инкубирането на срезовете в дефиниран постоянен обем буфер в средата се натрупват sAPP-форми. Ако секретираният APP има ефект върху секрецията, резултатите, получени с този модел, могат да бъдат подложени на съмнение.

За да изясним този въпрос, изследвахме секрецията на APP от нативни мозъчни срезове, използвайки модел, включващ суперфузия. При този модел срезовете се поставят в суперфузионна камера и инкубационният разтвор протича през камерата и отмива sAPP-формите, освободени в средата. Така се предотвратява възможна обратна връзка между секретираните форми и секрецията. Мозъчните срезове бяха стимулирани със суперфузионен буфер, съдържащ 50 μ M глутамат, и съдържанието на sAPP в суперфузата беше сравнено със съдържанието на sAPP в контролния суперфузат, който не съдържа глутамат. Остойносттаването на имуно дот-блотове посредством денситометричен анализ показва, че стимулирането с глутамат повишава секрецията на APP с 25% (Фиг. 8).



Фиг. 8. Количествено определяне на влиянието на глутамат върху секрецията на APP при използване на суперфузионната техника. Данните, представящи средната стойност от четири опита, са изразени като процент от базовата секреция, установена в отсъствието на глутамат (базова секреция = 100%).

Повишаването на секрецията, установено при използването на суперфузионната техника (25%), е сравнимо с това, установено при използването на модела с дефинирани „стационарни“ обеми инкубационен разтвор (32%). Това ни позволява да заключим, че sAPP не повлиява секрецията на APP.

5.4. Участие на васкуларния ендотелиален растежен фактор (VEGF) в метаболизма на APP

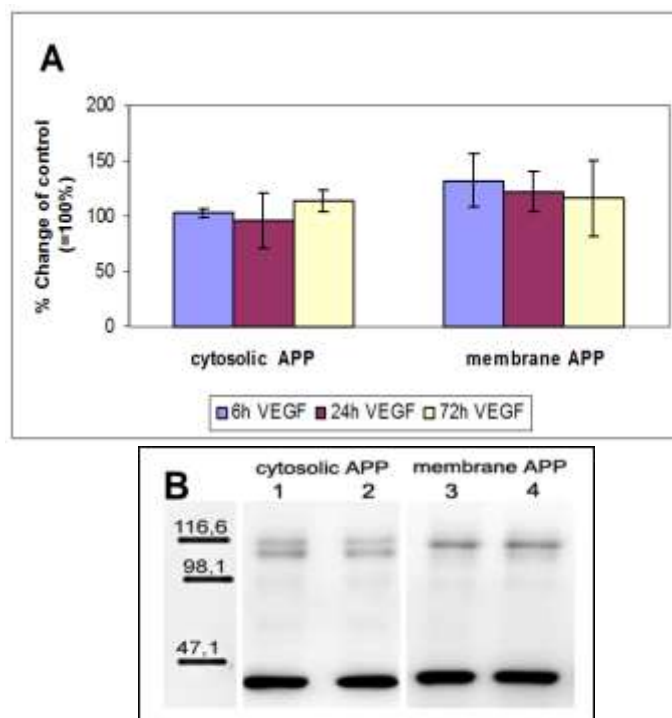
VEGF е един от най-потентните ангиогенни фактори. Той първоначално е открит във васкуларни ендотелиални клетки и провокира тяхната диференциация, миграция и вазопропускливост в много видове тъкани. VEGF участва в

неврогенезата, невропротекцията и растежа на глиални клетки. В мозъка на пациенти с АБ VEGF е коагрегиран в амилоидните отлагания, което може да води до регионален дефицит на VEGF и нарушена невропротекция. Данните, представени от различни изследователски групи за взаимовръзката между метаболизма на VEGF и А β , са противоречиви. При пациенти с АБ се наблюдават намалени нива на VEGF в серума и повишени нива в мозъка и цереброспиналната течност, което насочва към заключението, че индукцията на VEGF може да допринася за компенсиране на хипоперфузията и исхемията.

Има данни, че исхемията и хипоперфузията могат да предизвикат промяна в процесирането на APP в посока генериране на А β , и образуване на амилоидни отлагания в мозъка, но няма яснота за механизма, по който това се осъществява. Повишаването на експресията на VEGF в отговор на хипоксичен, исхемичен и хипогликемичен стрес в мозъка на пациенти с АБ насочва към предполагаема връзка между активността на VEGF и процесирането на APP. Ние си поставихме за цел да проверим дали VEGF повлиява метаболизма на APP.

За да изследваме възможната роля на VEGF в процесирането на APP и при формирането на А β , използвахме култивирани срезове от кората на главния мозък на Tg2576 мишки, които бяха стимулирани за периоди с различна продължителност с VEGF, след което беше изследвана секрецията на APP, формирането и фибрилогенезата на А β и активността на α - и β -секретазите.

За да проверим дали VEGF може да влияе на образуването и отлагането на васкуларни и паренхимални А β пептиди, третирахме с VEGF култивирани мозъчни срезове, получени от Tg2576 мишки, за периоди с продължителност между 6 и 72 h. След това изследвахме нивата на ключови компоненти от процесирането на APP и β -амилоидогенезата. Стимулирането на кортикалните срезове с VEGF не повлия нивата на мембранно-свързания APP и на APP в цитозола, независимо от продължителността на третирането (**Фиг. 9**).

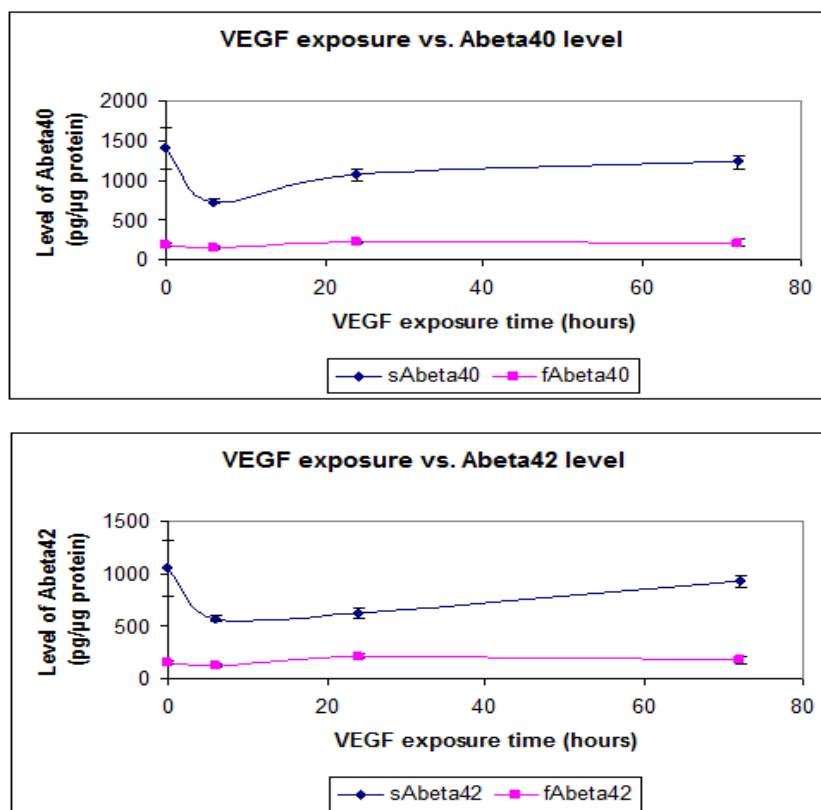


Фиг. 9. А. Ефект от третирането с VEGF на култивирани мозъчни срезове, получени от Tg2576 мишки на възраст 17 месеца, за периоди с продължителност между 6 и 72 h, върху нивото на експресиране на APP във фракцията, съдържаща мембранно-свързаните белтъци и цитозолната фракция. Остойностяването е извършено посредством денситометричен анализ на имуноблотите. Представените данни са средна стойност $\pm$ SEM.

В. Репрезентативен имуноблот за доказване на APP (горните две черти) в цитозолната и мембранната фракции, получени от хомогенат на мозъчните срезове, които са били третиран с VEGF (линии 2 и 4) или нетретиран контроли (линии 1 и 3). За нормализиране на остойностяването на имуноблотите беше използвано количеството β -актин (долната черта), измерено във всяка проба.

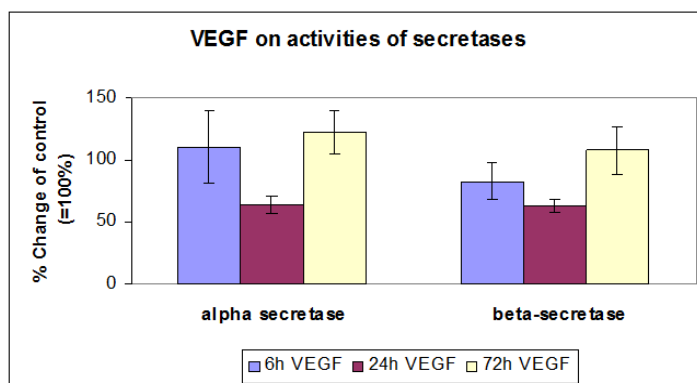
За разлика от липсата на ефект върху нивата на APP, третирането с VEGF за 6 h значително намали образуването на разтворими, поддаващи се на екстрахиране със SDS, A β от двата изследвани типа – A β 1-40 и A β 1-42. Намалението беше с около 50% в сравнение с нетретиран мозъчни срезове (Фиг. 10). Това показва, че VEGF има инхибиращо въздействие върху синтеза и/или секрецията на разтворими A β пептиди. Този инхибиращ беше по-слабо изразен след третиране с VEGF за 24 h и не се наблюдаваше след третиране за 72 h. Това говори за адаптивни процеси, протичащи при продължително третиране с VEGF. Резултатите, получени за фибриларни форми на A β 1-40 и A β 1-42, се различаваха. Нивото на фибриларния A β 1-40 в култивирани мозъчни срезове не се променяше след третиране с VEGF, независимо от продължителността. За разлика от това, след третиране с VEGF за 24 h нивото на фибриларния A β 42 се повишаваше с около 38% в сравнение с

контролите. Този ефект не се наблюдаваше след третиране на мозъчните срезове за 72 h.



Фиг. 10. Ефект от третирането с 1 ng/ml VEGF на култивирани мозъчни срезове, получени от Tg2576 мишки на възраст 17 месеца, за периоди с продължителност между 6 и 72 h, върху нивото на разтворими (SDS-екстракт, sAbeta) и фибриларни (екстракт с мравчена киселина, fAbeta) A β 1-40 и A β 1-42 пептиди. Остойностяването е извършено с ELISA техника. Данните са в pg/ μ g белтък и представляват средна стойност $\pm$ SEM. * p < 0,01 спрямо контролната стойност; ** p < 0,05 спрямо контролната стойност (ANOVA с post hoc множествен сравнителен тест на Dunnett).

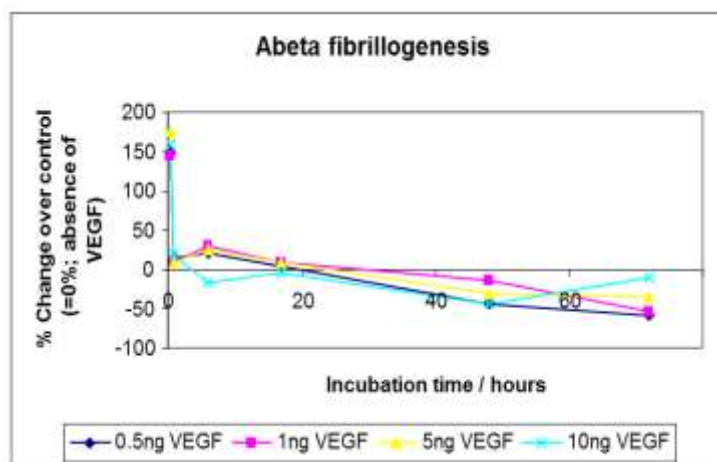
Изследвахме и активността на α - и β -секретазите. Третирането на мозъчните срезове с VEGF за 6 h доведе до леко намаляване на активността на β -секретазата, обаче третирането за 24 h доведе до сигнификантно намаляване на активността с 38% в сравнение с контролата. Инхибиращият ефект на VEGF върху активността на β -секретазата не се наблюдаваше след хронично третиране на мозъчните срезове в продължение на 72 h. При α -секретазата сигнификатен инхибиращ ефект се наблюдаваше само след 24-часово третиране с VEGF (Фиг. 11).



Фиг. 11. Ефект от третирането с 1 ng/ml VEGF на култивирани мозъчни срезове, получени от Tg2576 мишки на възраст 17 месеца, за периоди с продължителност между 6 и 72 h, върху активността на α - и β -секретазите. Активността е измерена с комерсиален фотометричен тест. Данните са представени като процентна промяна спрямо контролата (= 100%) и са средна стойност $\pm$ SEM. * $p < 0,01$ спрямо контролната стойност (ANOVA с post hoc множествен сравнителен тест на Dunnett).

Проверихме и дали VEGF има директно въздействие върху фибрилогенезата на А β . За целта синтетичен хуманен А β 1-42 и извлечен от кората на главния мозък на Tg2576 мишки разтворим А β бяха инкубирани за различни периоди от време с различни концентрации VEGF. След това с помощта на анализа, основан на свързването с тιοфлавин-Т, беше измерен статусът на фибриларност на А β . Инкубацията на ендегенния А β с VEGF, предизвиква постепенно леко намаляване на съдържанието на фибрили, продължаващо до 72-рия час. Това се наблюдава още при най-ниската концентрация на VEGF (Фиг. 12). Подобен ефект на VEGF, но с по-нисък процент, се наблюдава и при използването на синтетичен хуманен А β 1-42. Получените резултати показват, че VEGF противодейства на естествената склонност на А β пептидите да образуват фибрили. Силното повишаване на флуоресценцията на тιοфлавин-Т при добавянето на VEGF ($t = 0$) вероятно се дължи на краткотрайно повлияване на флуоресценцията от VEGF по неизвестен механизъм

Повишени нива на VEGF се наблюдават в мозъците на пациенти с АБ, в сравнение със здрави индивиди на същата възраст. Те съответстват на тежестта на заболяването. Значението на повишените нива на VEGF в патогенезата и развитието на АБ е дискуссионно. Докато при АБ се наблюдава увеличение на VEGF и други ангиогенни фактори, няма данни за неоваскуларизация в мозъка на пациенти с АБ, но се наблюдават значителни цереброваскуларни отклонения и дегенерации.



Фиг. 12. Ефект на VEGF върху А β -фибрилогенезата. Извлечен от кората на главния мозък на Tg2576 мишки разтворим А β беше инкубиран за различни периоди от време с различни концентрации VEGF (0 до 10 ng/ml). След това с помощта на анализа, основан на свързването с тιοфлавин-Т, беше измерен статусът на фибриларност на А β . Времето на въздействие на VEGF и предизвиканите концентрационно зависими промени във флуоресцентната интензивност на тιοфлавин-Т свързването се съотнасят към флуоресценцията, измерена във време „нула“ и концентрация 0 на VEGF. Промените са изразени като процентна промяна спрямо контролата (контрола = 0%, представлява базовата линия на фибриларния статус на А β).

Преходният инхибиращ ефект на VEGF върху синтеза на А β ни кара да предположим, че е възможно да му противодействат адаптивни отговори, като постепенно повишаване на експресията на APP и/или на β -секретазата. Нивата на APP в цитозола и във фракцията, съдържаща мембрани, почти не бяха променени, независимо от продължителността на стимулирането. В същото време нивата на α - и β -секретазите се понижаваха в срезове, стимулирани с VEGF, но постепенно се възстановяваха до контролните стойности. Все пак не можем да твърдим, че VEGF директно инхибира и двете секретози. Трябва да вземем предвид комплексността на мозъчната тъкан и това, че VEGF може да има различно въздействие върху различните клетъчни видове, представени в мозъчните срезове. Първоначалното потискане на активността на BACE 1 от VEGF в един тип клетки може да се балансира от повишаване на активността в друг вид клетки. Това предположение се подкрепя от наблюдението, че инхибирането на секретазната активност от VEGF се случва след инхибирането на синтеза на А β . Това подсказва за наслагване на различни процеси, протичащи в клетките.

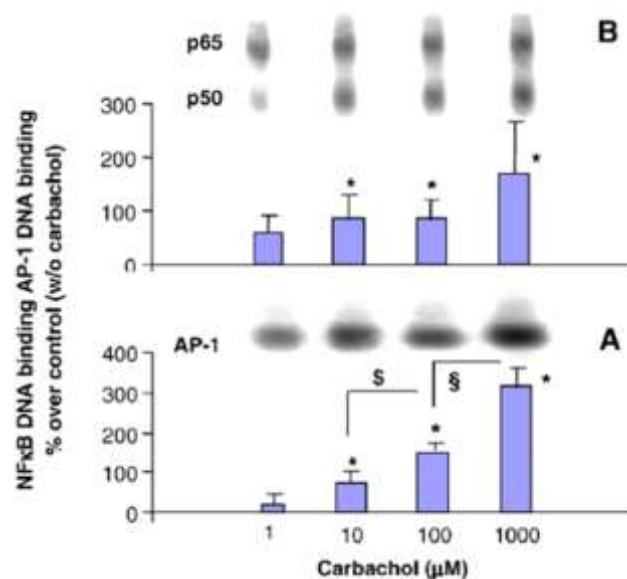
5.5. Влияние на интерлевкин-1 β върху сигналната каскада на мускаринови ацетилхолинови рецептори

Интерлевкин (IL)-1 е мултифункционален интерлевкин, който играе ключова роля при медирането на възпалителните процеси. В мозъка на болни от АБ той е свръхекспресиран от активирани микроглиялни клетки, които са асоциирани с β -амилоидните плаки. IL-1 β предизвиква повишаване на експресията на APP, стимулира амилоидогенния път на разграждане на APP, предизвиква фосфорилиране на τ -протеина и допринася за дисфункция на холинергичната невротрансмисия.

Ние си поставихме за цел да проучим механизмите, по които IL-1 β би могъл да повлиява холинергичната невротрансмисия. IL-1 β упражнява своя ефект посредством свързването с мембранный IL-1 β -рецептор от тип I и така се задейства вътреклетъчна сигнална каскада, която води до активирането на транскрипционния фактор NF κ B. Стимулацията на мускариновите ацетилхолинови рецептори също може да предизвика активиране на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1. Повишената експресия на IL-1 β в заболялия мозък може да наруши холинергичната невротрансмисия посредством повлияване на сигналната каскада на мускариновите рецептори, най-вероятно на ниво на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1. За да проверим тази хипотеза, използвахме холинергично диференцирани SH-SY5Y клетки и ги третирахме с нарастващи концентрации IL-1 β за различни периоди от време. За да видим дали IL-1 β засяга свързаната с мускариновите ацетилхолинови рецептори вътреклетъчна сигнална каскада, първо третирахме клетките с IL-1 β , след което ги стимулирахме с холинергичния агонист карбахол. След това изследвахме промените на ключови молекули от холинергичната сигнална каскада, като хидролизата на фосфоинозитид, ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1 (показана с тест за изместване на електрофоретичната мобилност), както и активността на AChE.

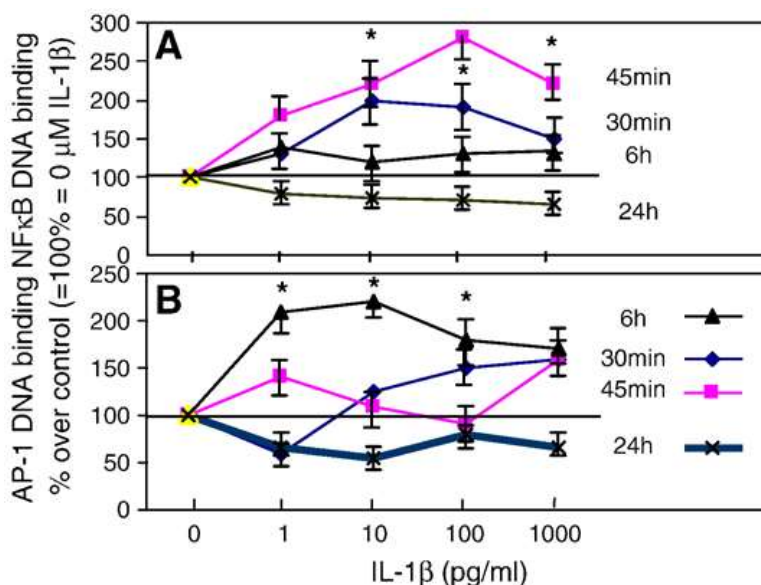
Третирането на SH-SY5Y клетки с карбахол повиши способността за свързване на NF κ B и AP-1. AP-1 се визуализираше като единична черта (Фиг. 13А), докато NF κ B беше с две черти, представляващи субединиците p50 и p65 (Фиг. 13В). Третирането с карбахол доведе до концентрационно-зависимо повишаване на ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1. Максималното повишение при AP-1 беше с $320 \pm 20\%$ спрямо контролата и се наблюдаваше след третиране с 1 000 μ M

карбахол за 1 h. За NFκB максималното повишение беше с около 170±70% спрямо контролата също при концентрация от 1 000 μM карбахол и третиране за 1 h.



Фиг. 13. Концентрационно-зависимо активиране на AP-1 (A) и NFκB (B) при третиране с карбахол. SH-SY5Y клетките бяха третирани с 1 до 1 000 μM карбахол за 1 h. От клетките беше извлечен нуклеарен екстракт и в него беше измерена ДНК-свързващата способност на NFκB и AP-1. Стойностите са дадени като процент спрямо нетретирани контроли (0 μM карбахол = 0%). Данните са средна стойност ± SEM от пет отделни опита. * $p < 0,05$ в сравнение с контролата; § $p < 0,05$ в сравнение със 100 μM карбахол; § $p < 0,05$ в сравнение с 10 μM карбахол (ANOVA с post hoc многопосочен сравнителен тест на Dunnett).

За да проверим дали IL-1β също допринася за активирането на NFκB и AP-1, SH-SY5Y клетките бяха инкубирани с цитокина и след това беше измерена активността на транскрипционните фактори. Третирането с нарастващи концентрации IL-1β за периоди между 30 min и 24 h предизвика концентрационно-зависима и зависима от продължителността на третирането промяна на ДНК-свързващата способност на NFκB и AP-1 (Фиг. 14). Максималното повишение за NFκB беше с 280±75% при третиране със 100 pg/ml IL-1β за 45 min. При третиране с по-висока концентрация IL-1β следваше спадане до 220±50%. По-продължителното третиране на SH-SY5Y клетките не водеше до стимулиране на NFκB, независимо от използваната концентрация (Фиг. 14A). При третиране на клетките с IL-1β за 45 min AP-1 се стимулираше незначително. При третиране с IL-1β за 6 h се наблюдаваше концентрационно-зависима промяна на ДНК-свързващата способност на AP-1 с максимум от 220±60% при 10 pg/ml IL-1β, следвано от намаление при 100 pg/ml и минимум от 170±35% при 1 000 pg/ml IL-1β (Фиг. 14B).



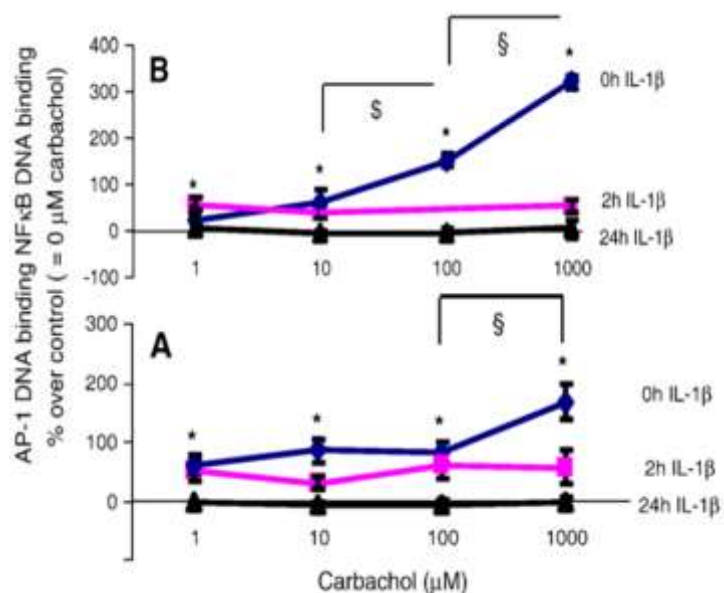
Фиг. 14. Ефект на третирането с IL-1 β върху ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1. Третирането на SH-SY5Y клетки с нарастващи концентрации IL-1 β (до 1 000 pg/ml) за периоди с различна продължителност (от 30 min до 24 h) предизвиква концентрационно- и времево-зависима промяна в ДНК-свързващата способност на NF κ B (A) и AP-1 (B). Стойностите са представени като процентна промяна спрямо нетретираните клетки (= 100%). Данните са средна стойност $\pm$ SEM от 4 – 8 отделни опита. * $p < 0,05$ в сравнение с контролата (ANOVA с post hoc многопосочен сравнителен тест на Dunnett).

За да проверим дали IL-1 β може директно да повлиява отговора, предизвикан от холинергична стимулация, SH-SY5Y клетките бяха третирани първо с IL-1 β за различни периоди от време. След това бяха стимулирани с карбахол и се проследи ефектът от стимулирането на мускариновите ацетилхолинови рецептори върху ДНК-свързващата способност на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1.

Въпреки че карбахол и IL-1 β поотделно стимулират ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1, предварителното третиране на SH-SY5Y клетките с 1 ng/ml IL-1 β инхибира стимулираното от карбахол свързване на NF κ B и на AP-1. Това се наблюдава още след предварително третиране за 2 h. По-продължителното предварително третиране с IL-1 β (до 24 h) води до по-нататъшно намаляване на ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1 и до пълно елиминиране на ефекта на карбахол. Този инхибиторен ефект на IL-1 β е представен на **Фиг. 15A и B**.

За IL-1 β е показано, че повлиява експресията и активността на AChE в първични невронални клетъчни култури. Затова изследвахме ефекта на IL-1 β върху предизвиканите в SH-SY5Y клетки промени на активността на AChE след стимулиране на мускариновите рецептори. Активността на AChE се увеличаваше след стимулиране на клетките за 1 h с карбахол, като беше най-висока ($62 \pm 27\%$

спрямо контролата) при концентрация от 100 μM (Фиг. 16А). Предварителното третиране на клетките с 1 ng/ml IL-1 β за 1, 6 и 24 h възпрепятства предизвикваното от карбахол активиране на AChE. Това се наблюдава още при предварително третиране за 1 h (Фиг. 16В).

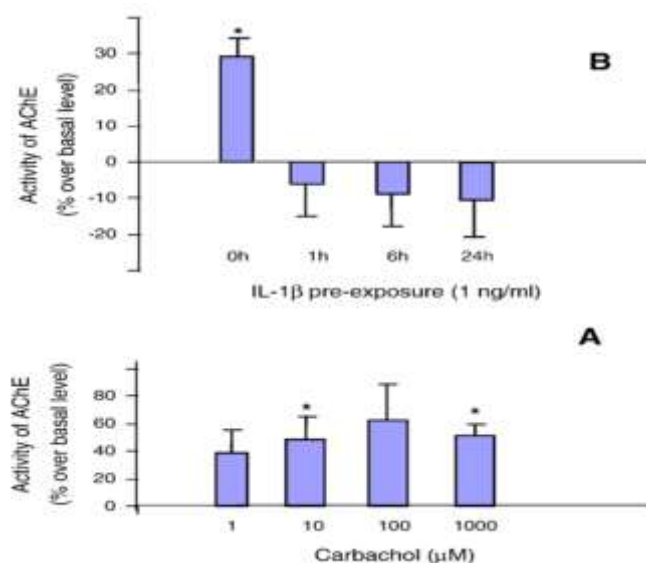


Фиг. 15. Ефект на предварително третиране с IL-1 β върху стимулираното от карбахол свързване на NF κ B (A) и AP-1(B) с ДНК. SH-SY5Y клетките бяха третирани с 1 ng/ml IL-1 β за 2 или 24 h. След това мускариновите ацетилхолинови рецептори бяха стимулирани 1 h с различни концентрации карбахол (1 до 1000 μM) и беше измерена ДНК-свързващата способност на NF κ B и AP-1. Стойностите са дадени като процент от контролите, които не са третирани с IL-1 β , и са средна стойност $\pm$ SEM от 4 – 8 отделни опита. * $p < 0,05$ в сравнение със стойностите на контролата; $^{\$}p \leq 0,05$ в сравнение със 100 μM карбахол; $^{\$}p \leq 0,05$ в сравнение с 10 μM карбахол (ANOVA с post hoc многопосочен сравнителен тест на Dunnett).

Основното заключение от представените резултати е, че хроничното третиране с IL-1 β потиска медирания от мускариновите холинергични ацетилхолинови рецептори сигналния път, най-вероятно чрез повлияване на активирането на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1.

NF κ B е индуцируем транскрипционен фактор. Той е свързан със специфичния си инхибитор I κ B. При различни стимули, включително от IL-1 β , NF κ B се освобождава от I κ B и се транслоцира от цитоплазмата в ядрото. Както NF κ B, така и неговият прекурсор p105, и неговият инхибитор I κ B са активирани и са повишени нива при болни от Алцхаймер. В същото време около отлаганията на β -амилоид се наблюдава драстично намаляване на NF κ B-имунореактивността. Според Kaltschmid et al. (1999) инхибирането на NF κ B потенцира медираната от β -амилоид

невронална апоптоза и затова загубата на активност на NFκB около сенилните плаки е в основата на невродегенерацията в мозъка на болни от Алцхаймер.



Фиг. 16. Концентрационно-зависимо повишаване на активността на AChE след стимулиране с карбахол (A) и ефект на предварителното третиране с 1 ng/ml IL-1β за 1, 6 и 24 h върху предизвикания от карбахол отговор (B).

(A) SH-SY5Y клетките бяха третирани с концентрации между 1 и 1 000 μM карбахол за 1 h, след което в клетъчен хомогенат беше измерена активността на AChE.

(B) SH-SY5Y клетките бяха предварително третирани с 1 ng/ml IL-1β за 1, 6 и 24 h, и след това бяха стимулирани за 1 h със 100 μM карбахол, след което беше измерена активността на AChE. Данните са представени като процент от стойностите, измерени при нетретирани клетки (= 0%), и са средна стойност ± SEM от 3 отделни опита. Стойност при контролата: 72±6 pmol/mg белтък/h. *p < 0,05 в сравнение с контролата (ANOVA с posthoc многопосочен сравнителен тест на Dunnett).

Получените резултати подкрепят хипотезата, че IL-1β участва в патогенните механизми, водещи до холинергичните дефицити, наблюдавани при АБ. Обосновано може да се предположи, че ефектът от третирането с IL-1β се осъществява чрез нарушаване на активирането на транскрипционните фактори NFκB и AP-1.

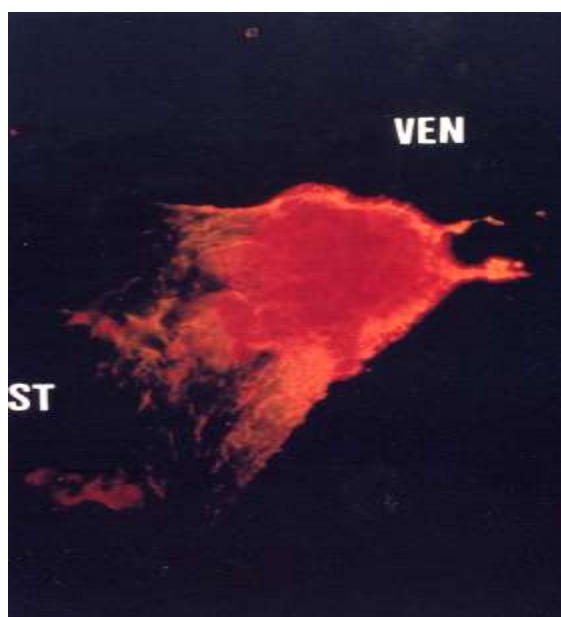
5.6. Изследване на влиянието на холинергичната невротрансмисия върху регулирането на секрецията на APP *in vivo*

5.6.1. Ефекти на частична холинергична денервация в мозъка на плъх върху секрецията на APP

За да проверим дали секрецията на APP в мозъчни области, които получават холинергична инервация отвън, се контролира от холинергичната активност *in vivo*, предизвикахме частична холинергична дегенерация в базални ядра на предния мозък на плъхове. За целта използвахме имунотоксина 192IgG-сапорин, който беше инжектиран интрацеребровентрикуларно. Той се състои от моноклонално антителио (192IgG), получено срещу ниско-афинитетния рецептор за невроналния растежен фактор (NGF), което е свързано посредством дисулфидна връзка с инактивиращия рибозомите белтък – сапорин. Специфичната локализация на ниско-афинитетния NGF рецептор върху клетъчни тела и терминали на холинергични неврони в базални ядра на предния мозък прави възможно селективно свързване на 192IgG-сапорин с тази холинергична популация. При това холинергичните неврони в други мозъчни области и не-холинергичните неврони в базалните ядра на предния мозък, които не експресират ниско-афинитетни NGF рецептори, остават незасегнати от лезията. Впоследствие в мозъка на плъховете, при които е предизвикана имунолезия, се трансплантираха произвеждащи NGF фибробласти, за да възстановят холинергичната функция. За да изследваме връзката между холинергичната активност и секрецията на APP, измерихме нивата на холинергичните маркери ChAT и M1 мускаринов рецептор, както и пропорцията на sAPP спрямо мембранно-свързания APP (mAPP) в кората на главния мозък на изследваните животни. Експерименталните животни бяха разделени в пет групи. Една група беше третирана и служеше за контрола. При четири групи беше извършена частична холинергична имунолезия, като животните от една група бяха оставени да преживеят две седмици, а от друга група – 10 седмици. При останалите две групи, две седмици след имунолезията, бяха присадени фибробласти – в едната група произвеждащи NGF (3T3^{NGF+}), а в другата непроизвеждащи NGF (3T3^{NGF-}).

За да характеризираме трансплантираните фибробласти, присадените 3T3^{NGF+}/3T3^{NGF-} клетки бяха визуализирани 8 седмици след трансплантацията посредством флуоресцентна микроскопия. В повечето случаи групата клетки беше прикрепена към медиалната страна на стриатума и се простираше от 0,8 mm до 2,4

mm от Bregma (**Фиг. 17**).



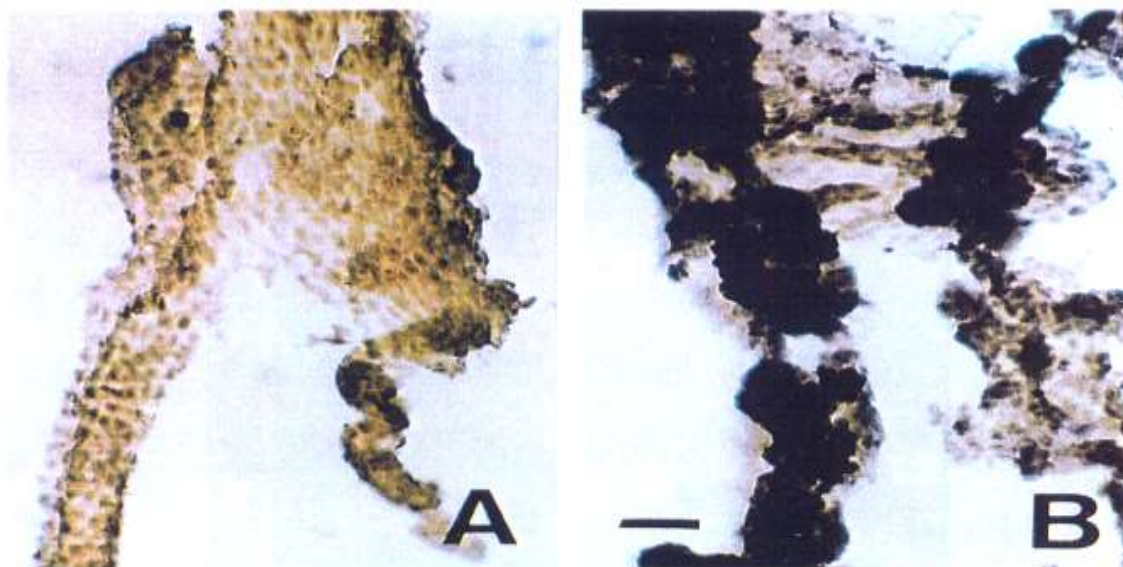
Фиг. 17. Фотомикрография на предварително белязани с флуоресцентния маркер DiI трансплантат на фибробласти в латералния вентрикул (VEN). Повечето клетки от трансплантата (в червено) са прикрепени към стриатума (ST) на латералната страна на вентрикула.

Произвежданият от $3T3^{NGF+}$ -клетките NGF беше демонстриран имуноцитохимично. Както е показано на **фигура 18**, повече от 80% от присадените $3T3^{NGF+}$ -клетки бяха силно имунореактивни (**Фиг. 18B**), докато оцветяването на контролния трансплантат не надвишаваше фоновото ниво (**Фиг. 18A**).

Синтезът и секрецията на NGF от трансплантатите на $3T3^{NGF+}$ -клетки бе демонстриран посредством NGF-имуноесе на цереброспинална течност (CSF) от животни от всички експериментални групи. Нивата на NGF варираха от ~ 30 pg/ml CSF при контролните, ледираните и получилите трансплантати от $3T3^{NGF-}$ -фибробласти животни, до 2 818 pg/ml CSF при животните с присадени $3T3^{NGF+}$ -фибробласти.

За да се покаже частичната холинергична деинервация на париеалния кортекс, след имунолезията в тази мозъчна област беше измерена ензимната активност на ChAT. Две седмици след имунолезията активността на ChAT беше намалена до $\sim 27\%$ от контролните стойности. Този дефицит се запазва до края на изследвания период (34% от контролата след 10 седмици). Присаждането на $3T3^{NGF-}$ -фибробласти не противодейства на това намаление (41% от контролата), докато присаждането на $3T3^{NGF+}$ -фибробласти води до възстановяване на активността на

ChAT до 82% от контролните стойности.

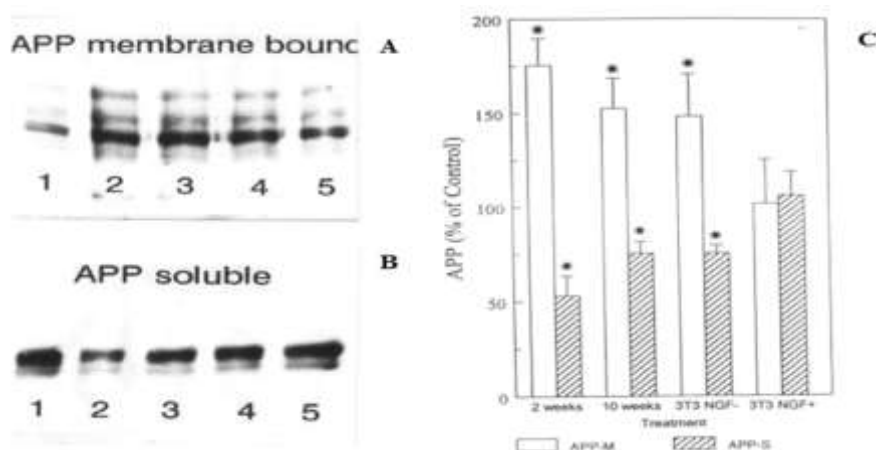


Фиг. 18. Репрезентативни примери на разрезии през трансплантатите, обработени за показване на NGF-имунореактивност в плъхове с трансплантати на $3T3^{NGF-}$ (A) и $3T3^{NGF+}$ (B). Вижда се силната NGF-имунореактивност в $3T3^{NGF+}$ -трансплантатите (B), докато оцветяването на $3T3^{NGF-}$ -трансплантатите не надвишава фоновото ниво (A). Линията представя 120 μm .

Кинетичните параметри K_d и B_{max} за M1 мускариновите ацетилхолинови рецептори бяха изчислени с помощта на есе за свързване с рецептора. Използвани бяха мембранни фракции от кортекса и [3H]пирензепин като радиолиганд. K_d стойностите не бяха повлияни нито от имунолезията, нито от третирането с NGF. Максималният брой рецептори (B_{max}) обаче беше леко, но сигнификантно намален след частичната имунолезия (-19%). Това намаляване беше преходно и стойностите се връщаха във времето към контролните. От друга страна, третирането на ледирани животни с NGF повишаваше B_{max} стойностите на M1 рецептора до 38,7% над контролните.

За да се изследва ефектът на холинергичната активност върху секрецията на APP в кората на главния мозък, sAPP и mAPP бяха измерени с помощта на имуноблот в съответните фракции, получени от хомогенат от мозъците на същите животни, които бяха използвани за измерване на активността на ChAT и на M1 рецептора. На **фигура 19 (A и B)** са представени репрезентативни имуноблотове на sAPP и mAPP. Беше установено, че две седмици след имунолезията mAPP се увеличава със 75% в сравнение с контролата (**Фиг. 19C**). Това увеличение е по-слабо изразено 10 седмици след лезията (+52%). Контролното присаждане на

3T3^{NGF}-фибробласти не променя тази стойност (48,4%). Третирането на животни 8 седмици след имунолезията с NGF посредством присаждането на 3T3^{NGF+}-фибробласти води до връщане на стойностите на mAPP към контролните (+1,6%; Фиг. 20С).



Фиг. 19. Репрезентативни имуноблотове на mAPP (А) и sAPP (В) в контролни животни (линия 1), 2 седмици след холинергичната имунолезия (линия 2), 10 седмици след лезията (линия 3), 8 седмици след трансплантацията на контролни 3T3^{NGF}-фибробласти в ледирани животни (линия 4) и 8 седмици след трансплантацията на NGF-секретиращи 3T3^{NGF+}-фибробласти в ледирани животни (линия 5). На С е показано средното съдържание $\pm$ SEM на mAPP и sAPP в експерименталните групи, изразено като процент от стойността в контролната група (контрола = 100%). ($n = 4$; $*p < 0,05$ спрямо нетретирана контрола, еднопосочен ANOVA с LSD post hoc тест на Фишер.

При нивата на sAPP частичната имунолезия и третирането с NGF имат противоположен ефект: двуседмичната лезия намалява sAPP (-47%) значително по-силно от 10-седмичната (-24,8%), докато при третираните с NGF животни нивата на sAPP са равни на тези на контролите (Фиг. 19С).

При АБ холинергичната система в базалните ядра на предния мозък претърпява тежка дегенерация, което води до намаляване на холинергичната активност в кората на главния мозък и съответно до намалено стимулиране на постсинаптичните мускаринови рецептори. Това от своя страна може да води до нарушаване на физиологичното процесиране на APP. Понеже нямаше изследвания относно невротрансмитерно стимулирано секретирание на APP *in vivo*, ние приложихме модела, при който се използва холинергична имунолезия.

Получените резултати ясно показват, че холинергичната хипофункция в кората на главния мозък води до увеличаване на мембранно-свързания APP и намаляване на неговата секреция. Тези промени в метаболизма на APP добре корелират с промените при холинергичните маркери – намалена активност на ChAT

и намален брой M1 мускаринови ацетилхолинови рецептори. Освен това показахме, че третирането на ледираните животни с NGF води до възстановяване на активността на ChAT, повишаване на броя на кортикалните M1 рецептори и нормализиране на нивата на sAPP и mAPP. Тези резултати силно подкрепят хипотезата, че в процесизирането на APP в кортикалните неврони, които получават холинергична инервация, участва холинергична регулация. Този контрол се осъществява най-вероятно посредством активирането на M1 мускариновите ацетилхолинови рецептори. Всичко това показва, че наблюдаваните холинергични дефицити в мозъците на пациенти с АБ може да имат пряка връзка с амилоидната патология.

5.6.2. Ефекти на частична холинергична денервация в мозъка на Tg2576 мишки върху метаболизма на APP

Холинергичните клетки в базалните ядра на предния мозък са особено уязвими в патологията на АБ. Атрофията на тези неврони води до тежка загуба на инервация в кората на главния мозък и в хипокампуса, където те модулират процеси, свързани с паметта и познавателните способности.

Холинергичната дисфункция при АБ е съпроводена от образуването на сенилни плаки и неврофибриларни кълбца. Все още не е изяснено кое е първопричина в патогенезата на АБ – холинергичната дисфункция, амилоидната- и τ -патологии или взаимодействието между тях.

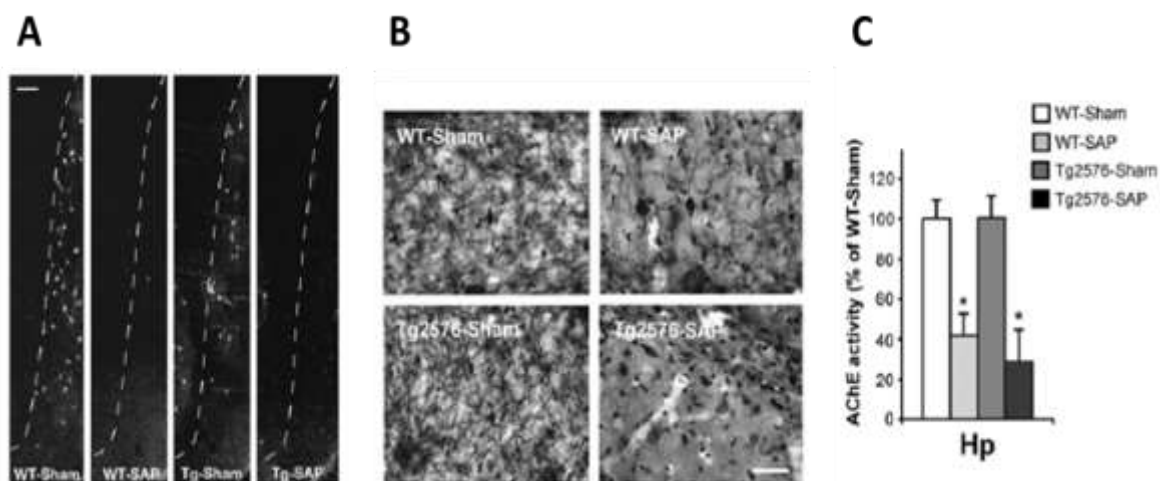
Целта на проведените изследвания беше да извършим холинергична денервация при наличието на амилоидна патология, за да проверим дали холинергичната система може да допринася за влошаването на патологията на АБ. За целта трансгенни Tg2576 мишки, които имат свръхекспресия на шведската мутация на хуманен APP, бяха инжектирани интравентрикуларно с холинергичния имунотоксин m1 p75-сапорин. Четири седмици след лезията животните показваха намалена холинергична инервация на хипокампуса, засилена амилоидна патология, невродегенерация и атрофия в хипокампуса. Това са патологични характеристики, които не се наблюдават при редица други трансгенни животински модели на АБ (Gotz et al., 2004). В крайна сметка се получава модел, при който освен амилоидната патология, характерна за мишките с шведска мутация на APP, има и холинергична дисфункция и атрофия на хипокампуса, което прави този животински модел по-добър за изследване на патологията на АБ.

В предварителни изследвания на мишките бяха инжектирани две различни дози имунотоксин – 2 и 4 μg . По-високата доза на токсина предизвика по-голямо намаление на активността на AChE в хипокампуса ($24,9 \pm 3,6\%$) в сравнение с контролите (Sham – с инжектиране на физиологичен разтвор, = 100%), но предизвика 60% смъртност. По-ниската доза от 2 μg също предизвика значително намаление на холинергичните маркери в хипокампуса ($47,44 \pm 7,25\%$), но без да причинява смърт.

Основавайки се на тези предварителни данни, избрахме дозата от 2 μg . За да се характеризира напълно въздействието на имунотоксина върху холинергичните неврони в базалните ядра на предния мозък, беше извършено ChAT-имунооцветяване в медиалния септум и беше измерена активността на AChE в хипокампуса (**Фиг. 20**). 2 μg имунотоксин предизвикаха драстично намаляване на броя на ChAT-позитивните неврони в медиалния септум на мишки от див тип (WT) и Tg2576 мишки. Оценяването на холинергичната денервация на хипокампуса беше извършена посредством хистохимичен и биохимичен анализ на AChE. Както WT-SAP (див тип мишки, инжектирани със сапорин), така и Tg2576-SAP (трансгенни мишки, инжектирани със сапорин), показаха намаление на AChE-позитивните влакна в хипокампуса (**Фиг. 20B**) и намалена активност на AChE (съответно $42,41 \pm 13,93\%$ и $30,27 \pm 18,31$; **Фиг. 20C**).

Холинергичната имунолезия сигнификантно увеличи SDS-разтворимия A β 1-40, A β 1-42 и съотношението A β 1-42/A β 1-40 в Tg2576 мишките (**Фиг. 21A**). Фибриларните форми и на двата изследвани вида A β останаха непроменени (**Фиг. 21B**).

Оцветяването с тιοфлавин-S не показва наличието на амилоидни отлагания след холинергичната имунолезия. Това е в съгласие с изследванията, които доказват, че образуването на плаки започва в деветия месец. Имунохистохимия с антитялото 4G8, което разпознава амилоидни пептиди, показва високо съдържание на вътреклетъчен A β в CA1 слоя от пирамидални клетки в Tg2576-SAP мишките (**Фиг. 21B**).



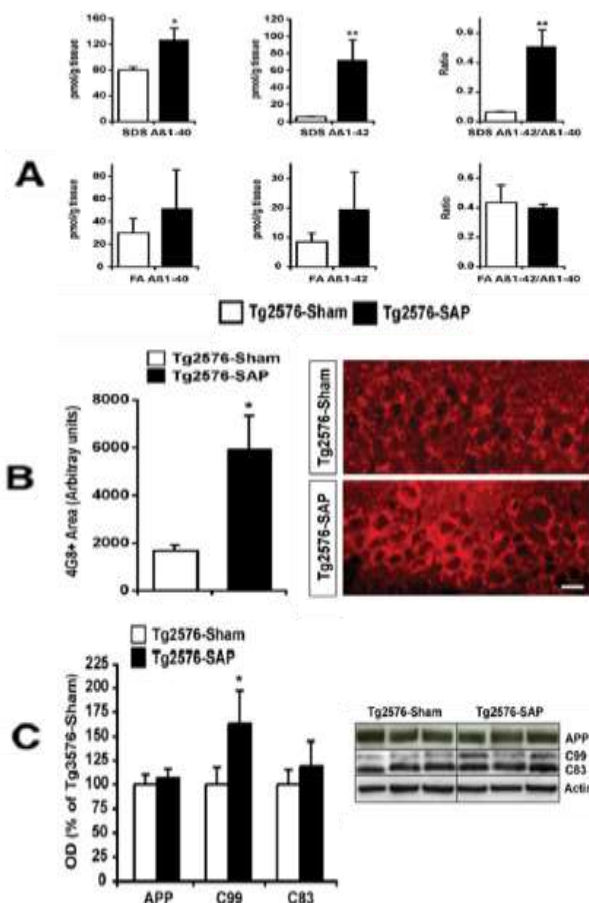
Фиг. 20. Характеризиране на холинергичната денервация.

А. Холинергичният имунотоксин *mu* р75-сапорин намалява броя на ChAT-позитивните неврони в медиалния септум на WT и Tg2576 мишки. Пунктираната линия обозначава медиалния септум. Мащабна черта = 100 μ m. WT-Sham – див тип мишки, инжектирани с физиологичен разтвор; WT-SAP – див тип мишки, инжектирани със сапорин; Tg-Sham – трансгенни Tg2576 мишки, инжектирани с физиологичен разтвор; Tg-SAP – трансгенни Tg2576 мишки, инжектирани със сапорин. **В.** Извадка от AChE-оцветяването в хипокампуса показваща намаляването на броя на AChE-позитивните влакна, предизвикано от холинергичният имунотоксин както в WT, така и в Tg2576 мишките. Hp – хипокампус; FrCx – фронтален кортекс. Мащабна черта = 100 μ m. **С.** Имунотоксинът намалява активността на AChE както в WT, така и в Tg2576 мишките. (Двупосочен ANOVA, $F_{(2,1)} = 70,98$, $*p < 0,01$).

Причината за повишеното ниво на разтворим A β може да е в повлияване на процесирването на APP. Посредством имуноблот с различни антитела изследвахме различни продукти от процесирването на APP. Докато за цялата молекула на APP и C-терминалната част C83 не се наблюдава промяна на нивото, нивото на C99 беше повишено в Tg2576-SAP мишките, в сравнение с Tg2576-Sham мишките (Фиг. 21C).

Холинергичната денервация предизвика тежка атрофия в хипокампуса на Tg2576 мишките (Фиг. 22A). Остойността на клетъчните слоеве след оцветяването с крезил виолетово показва, че пирамидалните слоеве CA1-2 и CA3 са намалени в Tg2576-SAP мишките, в сравнение с Tg2576-Sham мишките, докато DG грануларният слой остава без промяна (Фиг. 22E). Tg2576-SAP мишките показват много по-големи области, засегнати от астроглиоза в целия хипокампус, както е показано с маркера, глиален фибриларен кисел протеин (Фиг. 22C и F). За да установим дали хипокампалната атрофия в Tg2576-SAP мишките е свързана с клетъчна смърт, използвахме FluoroJade B-оцветяване (специфичен маркер за невродегенерация). При мишките с имунолезия в CA1-2 пирамидалните клетъчни

слоеве се наблюдават FluoroJade B-позитивни клетки, но такива липсват в СА3 и DG. Експресията на маркера на синаптичната плътност синаптофизин-мРНК беше сигнификантно намалена в клетъчните слоеве СА1-2 и СА3 след холинергична имунолезия при Tg2576-SAP мишките. Това не се наблюдаваше след имунолезия при мишки от див тип (Фиг. 22Н).

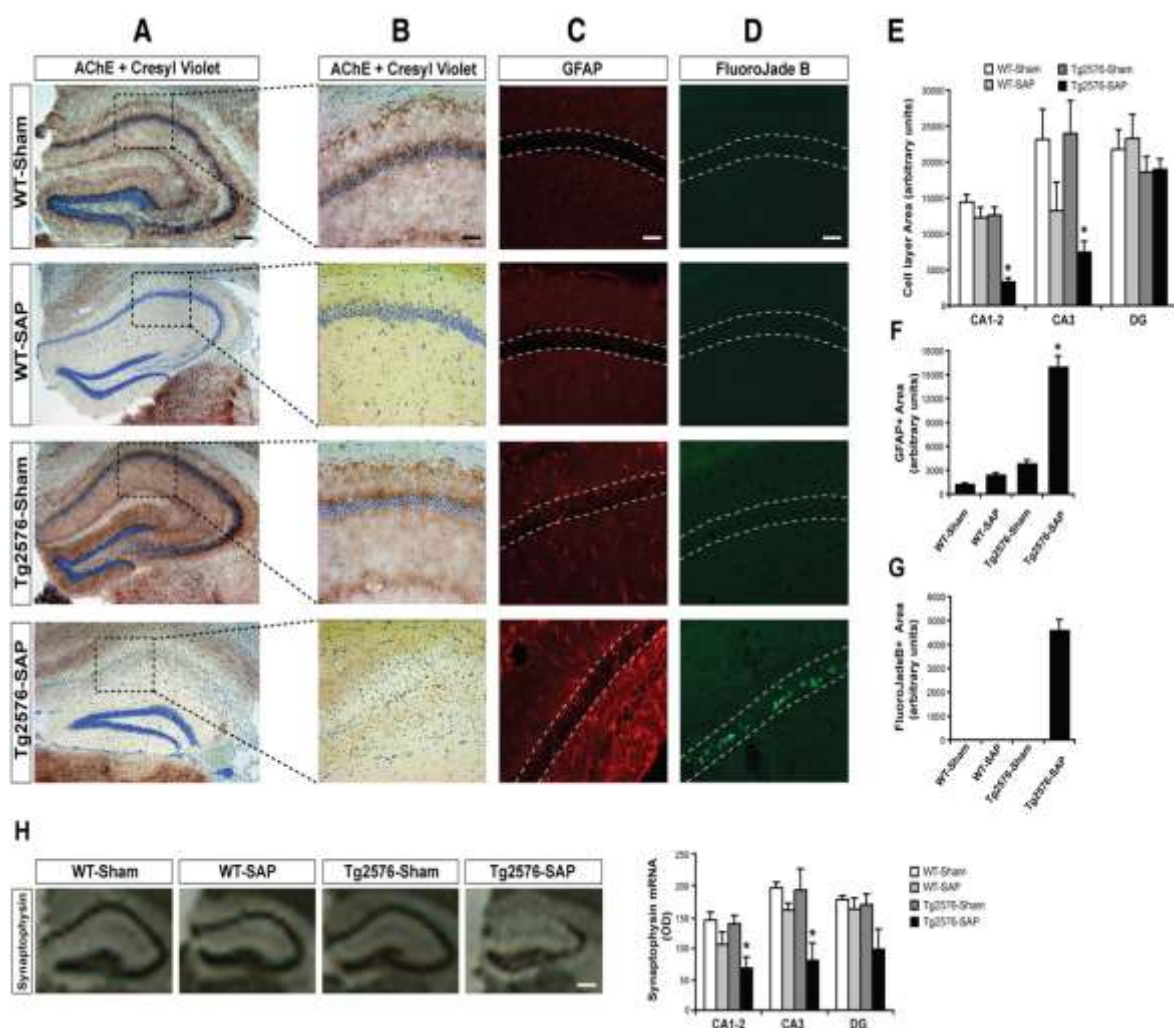


Фиг. 21. Холинергичната имунолезия засилва амилоидната патология в Tg2576-мишките.

A. Нивата на SDS-разтворими Aβ1-40 и Aβ1-42 се повишават след холинергична денервация (измерени с комерсиални китове). При фибриларните Aβ-форми (разтворими в мравчена киселина) не се наблюдава промяна. *t*-тест на Student, $t_{(10)} = 2,64$, $*p < 0,05$ за разтворим Aβ1-40; $t_{(10)} = -3,9$, $**p < 0,01$ за разтворим Aβ1-42; $**t_{(10)} = -4,19$, $p < 0,01$ за съотношението Aβ1-42/Aβ1-40.

B. Имунохистохимичното оцветяване с антитялото 4G8 показва сигнификантно увеличаване на вътреклетъчния Aβ в Tg2576-SAP мишките (*t*-тест на Student, $t_{(6)} = 1,97$, $p < 0,05$). Мащабна черта = 10 μm.

C. След холинергична денервация нивата на C99 бяха увеличени в хипокампуса на Tg2576-SAP мишките (*t*-тест на Student, $t_{(8)} = 2,08$, $*p < 0,05$), докато нивата на интактния APP и C99 оставаха непроменени.



Фиг. 22. Ефект на холинергичната имунолезия върху хипокампуса.

А, В. Крезил виолетово оцветяване показва атрофия на хипокампуса след холинергична имунолезия в Tg2576-SAP мишките.

С, D. Холинергичната имунолезия предизвиква повишаване на GFAP-имунореактивната астроглиоза в целия хипокампус и дегенерация на FluoroJade-оцветени неврони в CA1-2 пирамидалните слоеве, но не и в CA3 и грануларния DG слоеве.

Е. Остойността на крезил виолетовото оцветяване в слоевете CA1-2 (двупосочен ANOVA следван от тест на Dunnet, $F_{(1,14)} = 11,87$, $*p < 0,01$ в сравнение с Tg2576-Sham-мишките), CA3 ($F_{(1,14)} = 9,45$, $*p < 0,01$ спрямо Tg2576-Sham), както и в DG грануларния слой.

Ф. Остойността на GFAP-имунореактивната област в хипокампуса ($F_{(1,16)} = 78,5$, $*p < 0,01$ спрямо Tg2576-Sham).

Г. Остойността на FluoroJade-оцветяването в областта на CA1-2.

Н. *In situ* хибридикация показва, че холинергичната имунолезия в Tg2576 мишките намалява експресията на мРНК на синаптофизин в слоевете CA1-2 и CA3 ($F_{(1,18)} = 7,24$, $*p < 0,05$ спрямо Tg2576-Sham).

Хистограмите показват остойността на оптичната плътност (OD в Н) и на оцветената област (относителни единици в Е, F и G). Машабна черта в А = 200 μm ; в В, С и D = 50 μm ; в Н = 150 μm .

Изследване с имуноблот показа, че белтъчните нива на ADAM17 също са намалени в хипокампуса на Tg2576-SAP. ADAM17 е металопротеидаза, за която се приема, че има важна роля в неамилоидогенния път на разграждане на APP. Тя взаимодейства също с редица трофични фактори, важни за жизнеспособността на клетките. Може да се предположи, че дефицити в активността на ADAM17 ще доведат до намаляване на освобождаването на тези фактори, което от своя страна ще направи невроните по-податливи на токсични въздействия. За да проверим тази хипотеза, третирахме първични култури от хипокампадни неврони с TAPI-2, който е инхибитор на ADAM17, след което извършихме МТТ-теста за преживяемост на клетките.

Преживяемостта на култивираните неврони от хипокампуса на Tg2576 мишки намаляваше след третиране с TAPI-2 ($71,1 \pm 4,2\%$ спрямо контролата), което беше обратимо след третиране с карбахол ($93,9 \pm 4,4\%$ спрямо контролата). Третирането на култивираните неврони от WT-мишки с TAPI-2 при същите условия не доведе до промени в преживяемостта на клетките. При Tg2576 мишките TAPI-2 също така намали активността на два ключови елемента от сигналните пътища, участващи в запазване на жизнеспособността на невроните – phospho-ERK1/2 и phospho-Akt ($46,8 \pm 4,2\%$ и $68,3 \pm 3,5\%$ спрямо контролата). Намалението на phospho-Akt можеше отчасти да бъде компенсирано след третиране с карбахол ($84,5 \pm 2\%$ спрямо контролата).

Резултатите показват, че холинергичната дисфункция, предизвикана чрез имунолезия на холинергичните неврони в базалните ядра на предния мозък, води до влошаване на амилоидната патология и нарушава целостта на хипокампуса в трансгенните мишки Tg2576. При представения модел, освен класическите характеристики на АБ, експресирани при Tg2576 мишките, са налични и други важни патологични белези на болестта, като атрофия на хипокампуса и загуба на синапси.

5.7. Синаптозомална фракция като моделна система за изследване на секрецията на APP

За изследване на секрецията на APP се използват различни експериментални модели – клетъчни култури, нативни мозъчни срезове, животински модели. Всички тези модели имат своите предимства и недостатъци. Най-използваният модел за

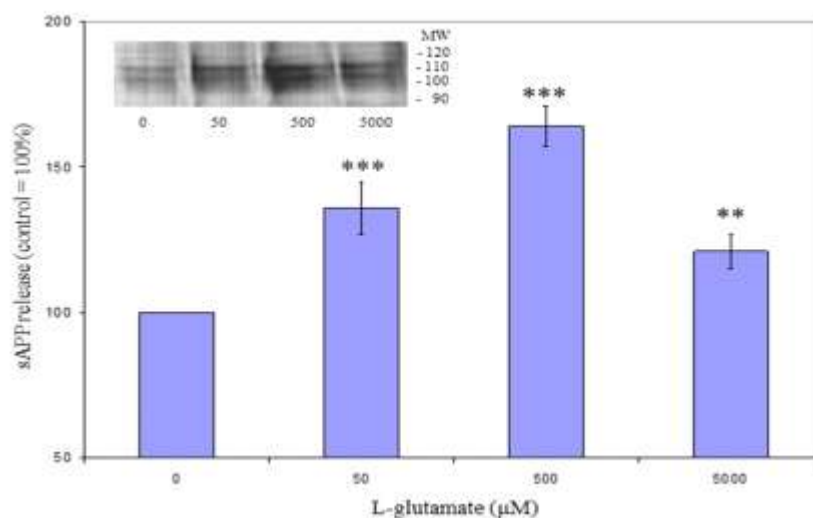
изучаване на метаболизма на APP са клетъчните култури, често трансфектирани с гени на APP или определен рецептор. Трансфектирането на клетките допринася за по-лесното идентифициране на APP-метаболитите, но увеличената продукция на APP може да доведе до нефизиологичното му процесиране.

Редица изследвания показват, че секрецията на APP е под невротрансмитерен контрол. Вземайки предвид, че синапсите са специфично място, където действат невротрансмитерните рецептори, решихме да използваме синаптозоми като моделна система за изучаване на секрецията на APP. За да проверим приложимостта на предложената моделна система, използвахме невротрансмитера глутамат, за който вече показахме, че повлиява секрецията на APP.

Синаптозомалната фракция беше изолирана от предните мозъци на плъхове по метода на Harrison et al. (1988) и беше стимулирана с глутамат. Количественото определяне на оптичната плътност на sAPP след имуноблот показва, че секрецията на APP е увеличена с 36% при 50 μ M глутамат, с 58% при 500 μ M и с 21% при 5 000 μ M (Фиг. 23). При по-нататъшни експерименти с 500 μ M глутамат установихме средно увеличение на секрецията с 64%. В сравнение със степента на увеличение на секрецията на APP, наблюдавана при стимулиране на нативни мозъчни срезове с глутамат (са. 32%), увеличението при стимулирането на синаптозоми е двойно по-голямо. Характерният бифазен характер на ефекта от стимулацията с глутамат върху секрецията на APP, наблюдаван при модела на мозъчни срезове (стимулиране на секрецията посредством метаботропния рецептор при ниски концентрации глутамат и потискане на секрецията посредством AMPA-рецептора при по-високи концентрации), се наблюдава и при стимулирането на синаптозоми.

По-слабият ефект на глутамат при модела с мозъчни срезове може да се дължи на комплексното взаимодействие между различните клетъчни популации, изграждащи мозъчната тъкан. Друга причина може да е затрудненото проникване на глутамат в срезовете. Освен това идентификацията на APP-метаболитите може да е затруднена поради тяхната интернализация в определени клетъчни популации, свързване с компоненти на извънклетъчния матрикс и/или разграждане от извънклетъчни протеази.

Метаботропният глутаматен рецептор използва в сигналния си път РКС. Известно е, че и редица други невротрансмитерни рецептори използват РКС като посредник. Затова решихме да активираме директно РКС с нейния ефективен стимулатор форбол миристат ацетат (РМА).

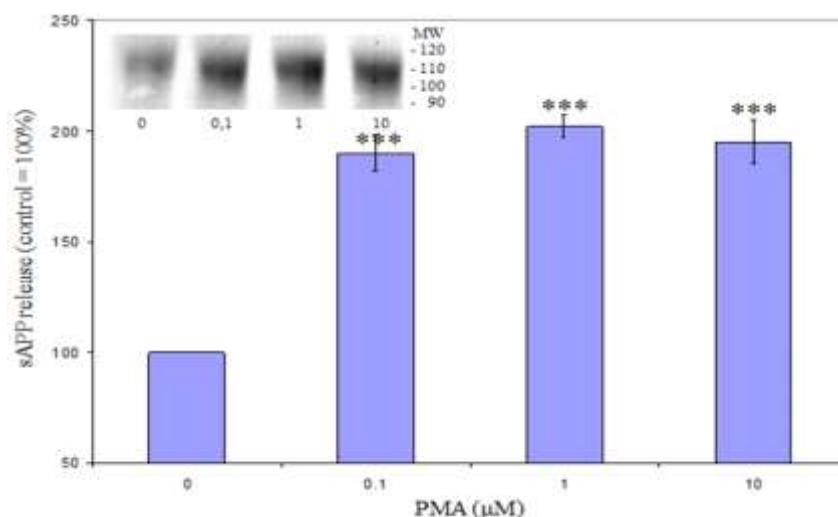


Фиг. 23. Остойностяване на ефекта на различни концентрации глутамат върху освобождаването на sAPP от синаптозоми. Показан е репрезентативен имуноблот. Контролата е приета за 100%. MW – молекулно тегло в kD. На абсцисата е обозначена концентрацията на глутамат. Дадена е средна стойност $\pm$ SD, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,002$ спрямо контролата (несдвоен двупосочен t -тест на Стьюдент), $n = 5$.

Третирането на синаптозоми с различни концентрации РМА предизвиква значително повишаване на секрецията на APP: с 90% при 0,1 μ M РМА; 102% при 1 μ M и 95% при 10 μ M, в сравнение с базалната секреция (Фиг. 24). Резултатите показват, че директното стимулиране на РКС с РМА има по-силен ефект върху секретирането на APP от синаптозоми, отколкото стимулирането с невротрансмитера глутамат.

Синаптозомалната фракция съдържа нервни окончания от различни невронални типове, участващи в различни невротрансмитерни системи. Само част от изолираните синапси имат глутаматни рецептори и могат да отговорят на стимулирането с глутамат. От друга страна стимулирането на рецептори, в чиято сигнална верига участва РКС или директно на РКС, също води до повишаване на секрецията на APP.

Получените резултати показват, че синаптозоми представляват подходяща моделна система за изучаване на процесирането на APP и в частност в субклетъчни компартменти.



Фиг. 24. Остойностяване на ефекта на различни концентрации PMA върху освобождаването на sAPP от синаптозоми. Показан е репрезентативен имуноблот. Контролата е приета за 100%. MW – молекулно тегло в kD. На абсцисата е обозначена концентрацията на глутамат. Дадена е средна стойност $\pm$ SD, *** $p < 0,001$ спрямо контролата (несдвоен двупосочен t -тест на Стюдънт), $n = 5$.

5.8. Онтогенетични промени в експресията на APP

5.8.1. Промени в съдържанието на APP в хомогенат, растежни конуси и синаптозоми, получени от мозък на плъх по време на онтогенезата

Въпреки интензивните изследвания, поради участието на APP в патологията на АБ, неговата физиологична роля остава неизяснена. Много изследвания сочат за роля на APP при междуклетъчните взаимодействия, взаимодействията на клетката с извънклетъчното обкръжение, при регулирането на вътреклетъчната концентрация на Ca^{2+} и при растежа на неврити.

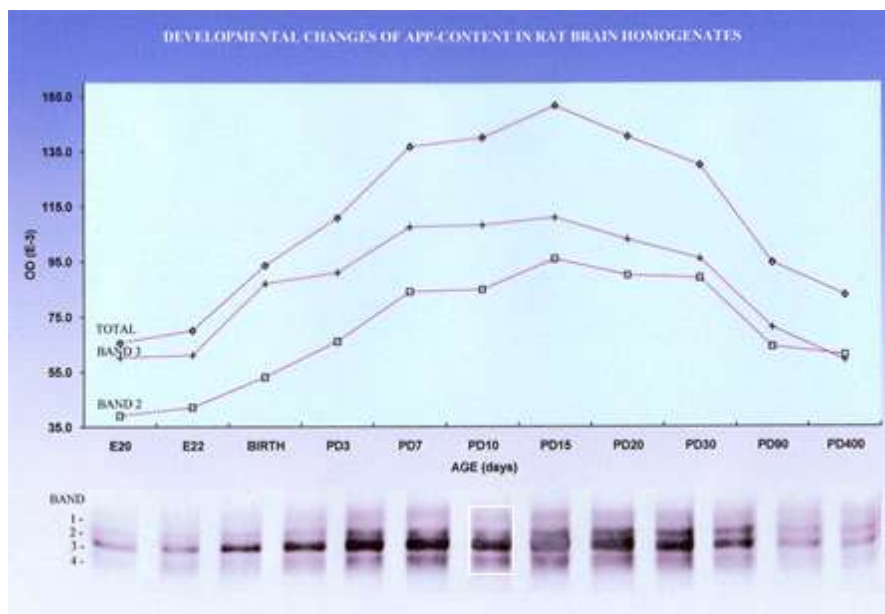
APP се синтезира в невроните и се насочва към синапсите с бързия аксонален транспорт. Наличието на APP в синапсите и растежните конуси е показано имунохистохимично. Показано е и наличието на APP в изолирани синаптозомални фракции. Експресията на APP в мозъка се променя в хода на развитието, като се повишава постнатално и достига най-високи стойности по време на синаптогенезата. Изследванията на различни работни групи показват, че при растежа на невритите и при образуването на синаптични контакти е възможно да участват различни форми на APP (различни изоформи и техни метаболити). Описано е, че докато експресията на APP се повишава постнатално и достига максимални стойности по време на синаптогенезата, до началото на формирането на

синаптични контакти не се наблюдава повишаване на секрецията на APP. Повишаване на секрецията на APP се наблюдава едва по време на синаптогенезата. Редица автори съобщават за повишаване на секрецията на APP чрез активирането на невротрансмитерни рецептори. Тези данни дават основание да се изкаже хипотезата, че създаването на синаптични контакти и синаптичната активност водят до повишаване на секрецията на APP. При АБ се нарушава нормалното функциониране на редица невротрансмитерни системи, което би могло да бъде причината за нефизиологично метаболизиране на APP и отлагането на амилоид. За експресията на APP след завършване на синаптогенезата има противоречиви наблюдения. Оскъдни са и данните за онтогенетичните промени на APP в други органи.

Ние изследвахме промените на APP, протичащи в хомогенат, растежни конуси и синаптозоми, изолирани от мозъка на плъх в процеса на развитие. В литературата нямаше данни за директно изследване, проведено с изолирани растежни конуси, което да проследява количествените и качествени промени на APP експресията по време на онтогенезата. Нямаше и сравнения на спектъра на APP, наблюдаван в растежни конуси, с този в изградени синаптични контакти, с използването на синаптозоми като моделна система.

Изолирането на растежни конуси беше направено по метода на Gordon-Weeks and Lockerbie (1984). Използвани бяха предни мозъци от 20- и 22-дневни ембриони, новородени и 3-, 7- и 10-дневни плъхове Wistar. Синаптозоми бяха изолирани от предни мозъци на 7-, 10-, 15-, 20-, 30-, 90- и 400-дневни плъхове по метода на Harrison et al. (1988). За доказване на APP използвахме моноклоналното антитяло 22C11. Наблюдаваните промени в четирите основни APP-черти следваха един и същ профил. Поради това за онагледяване на резултатите използвахме оптичната плътност на двете най-интензивни черти (2 и 3) и сбора от оптичната плътност на всички APP-черти.

Концентрацията на APP в хомогената е най-ниска в ембрионалните стадии на развитие (**Фиг. 25**), повишава се след раждане и достига максимални стойности между 7-ми и 20-ти постнатален ден. След 30-ти до постанатален ден 400 концентрацията на APP в хомогената намалява. Нивото на APP на постанатален ден 400 е по-високо от това в ембрионалния мозък и е сравнимо с това, установено при раждане.

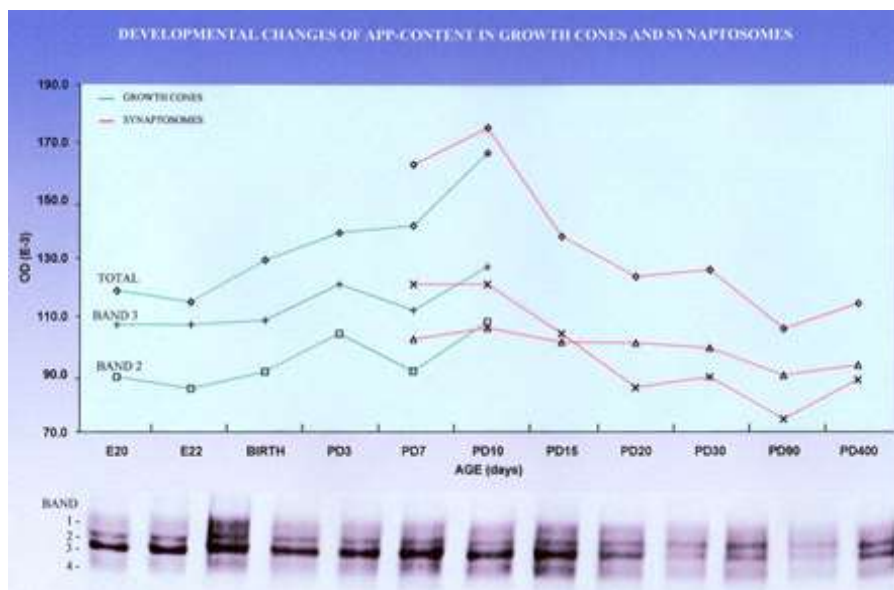


Фиг. 25. Промени на нивата на APP в хомогенат от преден мозък на плъх по време на онтогенезата.

Показан е репрезентативен имуноблот. Възрастите на ембрионален ден 20 (ED20) и постнатален ден 400 (PD400) са показани в дубликат. Товарът белтък за всяка възраст е 20 µg. Сборът от оптичната плътност на всички APP-черти беше измерван, както е показано с бялата рамка под PD10. Представените данни са от два експеримента, като от всеки от тях бяха направени и остойностени два имуноблота. Стандартното отклонение не надхвърляше 15%.

Промените на нивата на APP в растежни конуси и синаптозоми имаха профил, много близък до тези в хомогената (Фиг. 26). Най-изразеното покачване на нивото в растежните конуси се наблюдаваше между 3-ти и 10-ти постнатален ден. Най-високата концентрация на APP в синаптозоми беше измерена на 7-ми и 10-ти постнатален ден. След максимума на 10-ти постнатален ден се наблюдава намаляване до периода на завършване на синаптогенезата. Следва лек спад до постнатален ден 400, където нивата на APP в синаптозомите са сравними с нивата, установени в растежните конуси.

Подчертаното повишаване на концентрацията на APP във всички изследвани фракции съвпада с периода на усилена синаптогенеза, което говори за активна роля на APP в процесите на създаване на специализирани контакти между нервните клетки. Почти еднаквото съдържание на APP в растежните конуси от ембрионален мозък и в синаптозомите от възрастно животно подсказва, че APP участва както в прорастването и намирането на пътя на невритите в ранни стадии на развитието, така и в поддържането на нормалните синаптични функции при възрастното животно.



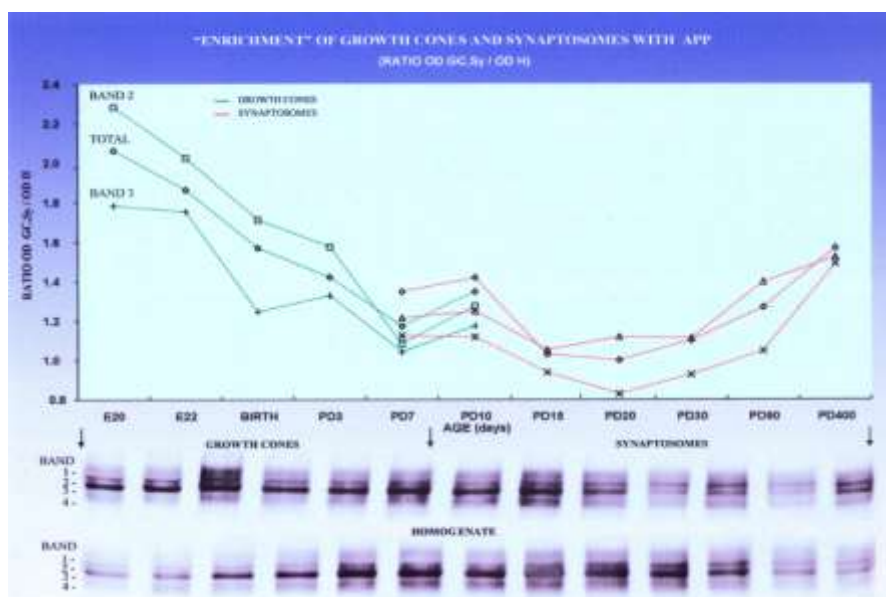
Фиг. 26. Промени на нивата на APP в растежни конуси и синаптозоми, изолирани от преден мозък на плъх по време на онтогенезата.

Показан е репрезентативен имуноблот. Възрастите ембрионален ден 20 (ED20) и постнатален ден 400 (PD400) са показани в дубликат. Товарът белтък за всяка възраст е 20 µg. Представените данни са от два експеримента, като от всеки от тях бяха направени и остойностени два имуноблота. Стандартното отклонение беше под 15%.

За да изследваме дали растежните конуси и синаптозомите са „обогатени“ с APP, сравнихме съдържанието на APP в тях с това в хомогенатите, от които са изолирани. Обогащаването с APP спрямо съдържанието му в хомогенат за определена възраст изразихме като коефициент, получен при разделянето на оптичната плътност, измерена в растежните конуси и синаптозомите на тази, измерена в съответните хомогенати. При това коефициент 1 ще означава еднакво съдържание, а по-голям – обогащаване с APP. Полученият резултат е представен на **фигура 27**.

Най-силно обогащаване се наблюдава в растежните конуси по време на ембрионалното развитие с постепенно намаляване към 7-ми постнатален ден. Това показва роля на APP в процесите на прорастване на невритите и насочването им към прицелните клетки преди сключването на синаптични контакти. В периода на максимална синаптогенеза концентрацията на APP в растежните конуси, синаптозомите и хомогената се изравнява. Това показва по-равномерно разпределяне на APP в клетъчните компартменти, което може би е в услуга на взаимодействието между различните клетъчни популации при създаването на контакти. В периода на съзряване на синапсите синаптозомите отново се обогащават

с APP, което показва неговата роля при поддържането на нормалната функция на синапсите.



Фиг. 27. „Обогатяване“ с APP в растежни конуси и синаптозоми, изолирани от преден мозък на плъх по време на онтогенезата, представено като съотношение към съдържанието на APP в хомогената, от която са изолирани. Показано е съотношението на сбора от оптичните плътности на четирите APP черти и на чертите 2 и 3. За подробности вижте текста и фигури 25 и 26.

5.8.2. Промени в експресията и локализирането на мРНК изоформи на APP в ембрион и мозък на плъх по време на развитието

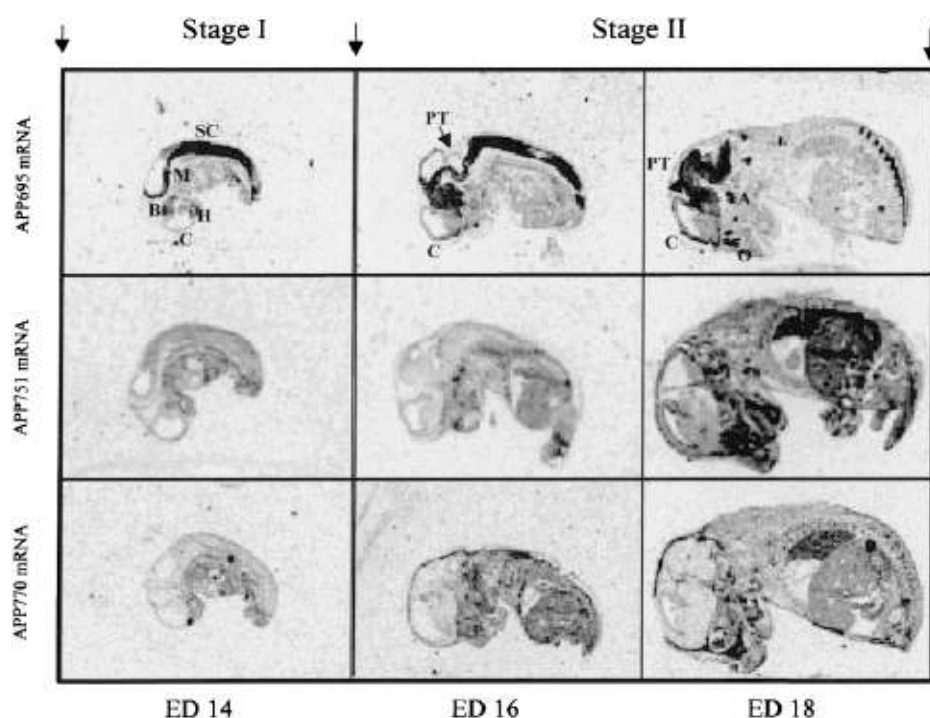
Многобройните процеси, в които APP изглежда има важна роля, ни карат да предположим, че е много вероятно в различните процеси да участват различни форми на APP. Има три основни изоформи на APP, които са изградени съответно от 695, 751 и 770 аминокиселини. Антитялото 22C11, което използвахме за имуноблот анализа на нивата на APP на ниво белтък, не може да разграничи различните изоформи. Затова ние използвахме радиоактивна *in situ* хибридизация, за да изследваме онтогенетичните промени на APP-изоформите на ниво мРНК.

За да проследим промените в нивата на APP-изоформите по време на развитието, използвахме цели ембриони на плъхове Wistar от 14-ти, 16-ти и 18-ти ембрионален ден, цели глави от ембриони на 20-ти и 22-ри постнатален ден и от новородено животно (1-ви постнатален ден) и мозъци от възрастни животни (PD90). Те бяха съхранявани при -70°C и за опитите бяха правени серийни срезове (16 μM). APP мРНК-изоформите бяха идентифицирани с мРНК сонди, белязани със $[^{35}\text{S}]$.

Резултатите се визуализираха посредством експозиция на срезове върху филм (3 – 4 седмици).

Морфологичните промени в ембрионалния мозък на плъх, ставащи между 11-ти и 22-ри ембрионален ден, могат да се разделят на три стадия. Стадий I започва на 11-ти и свършва на 14-ти ембрионален ден. Стадий II е между 15-ти и 18-ти ембрионален ден. Стадий III е между 20-ти и 22-ри ембрионален ден.

Репрезентативният спектър на експресия на APP мРНК-изоформите на различните пре- и постнатални възрасти е представен на **фигура 28** и **фигура 29**. За да се провери специфичността на хибридизационния сигнал на всяка възраст, съседни срезове бяха хибридизирани с белязан олигомер със същата дължина, но съдържащ произволна последователност от нуклеотиди (wobble сонда).



Фиг. 28. Експресия на APP695 мРНК, APP751 мРНК и APP770 мРНК в ембрионалното развитие на плъх. Показани са репрезентативни автордиограми от сагитални срезове на цял ембрион на 14-ти, 16-ти и 18-ти ембрионален ден. А – аудиторна система, В – базални ганглии, С – кора на главния мозък, Н – хипоталамус, М – медула, О – олфакторна луковица, РТ – претектум, SC – гръбначен мозък.

На 14-ти ембрионален ден, в края на стадий I, най-високото ниво на APP695 мРНК се наблюдава в гръбначния мозък, след това в медулата, базалните ганглии, хипоталамуса и, с по-ниска интензивност, в кортекса (**Фиг. 28**). На този стадий на развитие APP695 мРНК не се открива в периферни органи. На 14-ти ембрионален

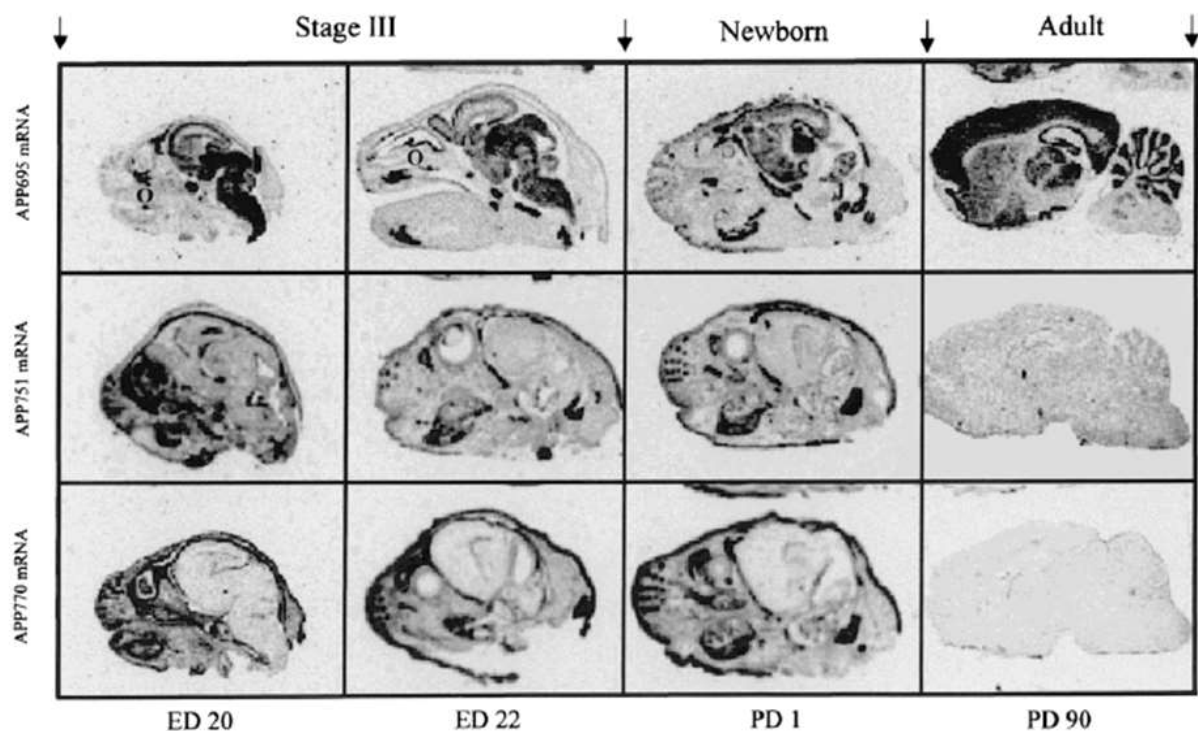
ден не се установява експресия на APP751- и APP770 мРНК.

В междинния стадий (стадий II) експресията на APP695 мРНК е най-силна в диференциращите се вентрални структури (**Фиг. 28**). На 16-ти ембрионален ден, в началото на диференциацията, в кората на главния мозък и претектума, експресията на APP695 мРНК в дорзалните структури е сравнително ниска. На 18-ти ембрионален ден, когато процесът на диференциация се е разпространил в целия кортекс и претектум, нивото на експресия на APP695 мРНК в тези структури е много по-високо. На 18-ти ембрионален ден се наблюдава експресия на APP695 мРНК и в олфакторната луковица, и в аудиторната система, където има диференциращи се нервни влакна. Както и в стадий I, APP695 мРНК се експресира предимно в диференциращи се структури на нервната система и не се наблюдава в периферни органи. Сега се вижда експресия на APP751- и APP770 мРНК в периферни органи, като бял дроб, черен дроб, кости и кожа.

В последния стадий на пренатално развитие (стадий III) се наблюдава увеличена експресия на APP695 мРНК във всички мозъчни структури, която е по-висока в сравнение с тази при новородени животни (**Фиг. 29**). Както в стадий II и сега експресия на APP751- и APP770 мРНК се наблюдава предимно в периферни органи и тъкани.

Стадий I на пренаталното развитие на мозъка при плъхове (11-ти до 14-ти ембрионален ден) се характеризира с бързо нарастване на невроепитела. Морфологично е установено, че на този стадий на развитие гръбначният мозък, медулата, базалните ганглии и хипоталамусът съдържат постмитотични неврони в начален стадий на диференциация, докато кората на главния мозък се състои предимно от делящи се клетки. Представените резултати показват, че в структурите, съдържащи диференциращи се клетки, се наблюдава най-висока експресия на APP695 мРНК.

По време на втория стадий от пренаталното развитие на мозъка (15-ти до 18-ти ембрионален ден) има още по-голямо натрупване на диференциращи се неврони в мозъчния паренхим. На 18-ти ембрионален ден повечето мозъчни структури могат да бъдат разпознати. Тук отново експресията на APP695 мРНК е най-висока в диференциращите се централни мозъчни области. Въз основа на локализацията на APP695 мРНК по време на първите два стадия на пренатално развитие на мозъка може да се заключи, че APP695 е тясно свързан с процесите на невронална диференциация.



Фиг. 29. Експресия на APP695 мРНК, APP751 мРНК и APP770 мРНК в ембрионалното развитие на плъх, новородено и възрастно животно. Показани са репрезентативни автордиограми от сагитални срезове на цяла глава на 20-ти, 22-ри ембрионален ден на новородени животни и на мозък от възрастно животно.

Последният стадий на пренатално развитие на мозъка (20-ти до 22-ри ембрионален ден) се характеризира с разпадането на невроепитела и активния растеж на мозъчния паренхим. На края на този период повечето от основните мозъчни структури са оформени и са в процес на активна диференциация. Това се отразява със засилена експресия на APP695 мРНК във всички мозъчни структури. В този период експресия на APP695 мРНК се наблюдава и в олфакторния епител, както и в мускулите и кожата, което е отражение на инервацията на тези структури от диференциращи се неврони.

Въз основа на резултатите, получени за експресията на трите основни APP мРНК-изоформи, стигнахме до следните заключения:

- по време на пренаталното развитие APP695 е тясно свързан с процесите на диференциране на нервните клетки не само в централната, но и в периферната нервна система;

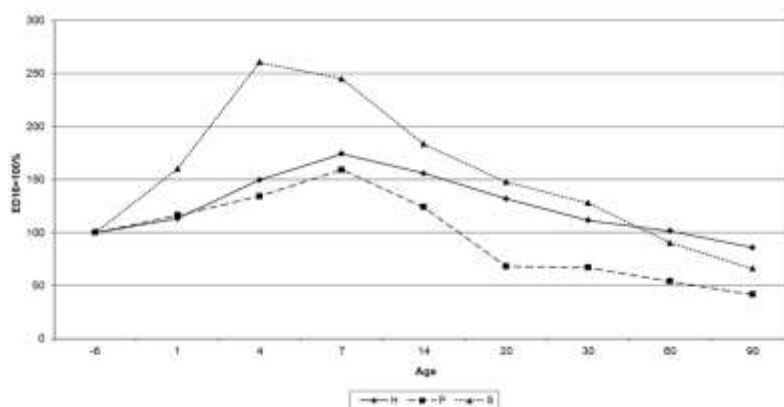
- на всички стадии от пренаталното развитие концентрацията на APP751 и APP770 мРНК е по-ниска в мозъка в сравнение с периферните тъкани и органи. Нямаше мозъчни структури със забележима концентрация на тези изоформи.

5.8.3. Промени в съдържанието на APP в хомогенат и фракциите, съдържащи мембранни и разтворими белтъци, получени от мозъка на плъх, скелетен мускул, бъбрек и черен дроб по време на развитието

APP се експресира освен в мозъка, и в периферни тъкани и органи, но отлагането на A β в сенилни плаки е характерно за мозъка. Много малко е известно за промените на APP по време на развитие и ролята на неговите производни в периферните органи. Интересно е наблюдението на Maarouf et al. (2018), че при пациенти с АБ има абнормално разграждане на APP в черния дроб. Той предлага хипотезата, че това може да допринесе за развитието на болестта.

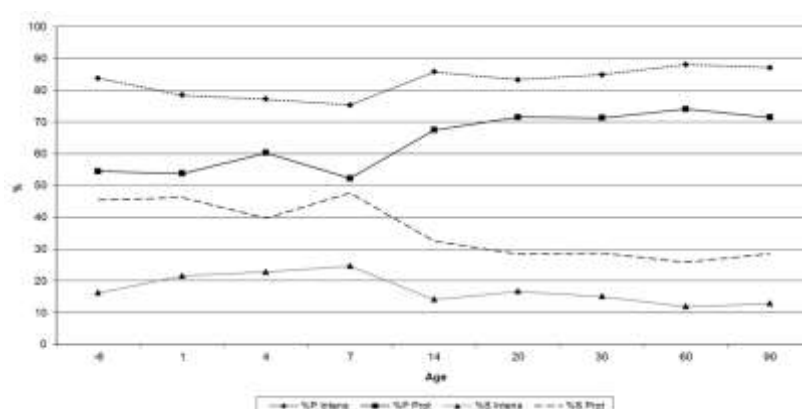
Ние си поставихме за цел да проследим на ниво белтък промените в нивата на APP в хомогенат и фракциите, съдържащи мембранни и разтворими белтъци, получени от мозъка на плъх, скелетен мускул, бъбрек и черен дроб в периода от 16-ти ембрионален до 90-ти постнатален ден.

Промените в нивата на APP в хомогената, мембранната и разтворимата фракции, получени от мозъка на плъх, са представени на **фигура 30**. При всички фракции се наблюдава ясно изразен максимум в периода на най-активна синаптогенеза (между 1-ви и 14-ти постнатален ден), което показва съществена роля на APP и неговите метаболити по време на намиране и създаване на контакти между нервните клетки. Това се съпровожда от засилено секретирание на APP по време на възбуждане на синаптичната активност.



Фиг. 30. Онтогенетични промени в нивата на APP в хомогенат (H) и фракциите, съдържащи мембранни (P) и разтворими (S) белтъци, получени от мозъка на плъх. Данните са представени като оптична плътност на μg белтък и стойностите от 16-ти ембрионален ден са взети за 100%. Дадени са стойностите от два експеримента, всеки от които е остойностен в дубликат. Стандартното отклонение не надвишаваше 15%.

На **фигура 31** е представено съдържанието на общ белтък и разпределението на APP метаболитите по време на развитието във фракциите, съдържащи мембранни и разтворими белтъци. След периода на активна синаптогенеза общото съдържание на белтък в мембранната фракция нараства от около 53% до 72%, докато концентрацията на APP остава почти непроменена. Това показва, че в този период съдържанието на APP в мембранната фракция намалява като процент от общия белтък.



Фиг. 31. Процентно разпределяне на общото съдържание на белтък и на APP във фракциите, съдържащи мембранни (P) и разтворими белтъци (S) от мозъка на плъх по време на развитието. Сборът от съдържанието в двете фракции е равен на 100%. Дадени са стойностите от два експеримента, всеки от които е остойностен в дубликат. Стандартното отклонение не надвишаваше 15%.

%P Intens – процентно съдържание на APP в мембранната фракция

%S Intens – процентно съдържание на APP в разтворимата фракция

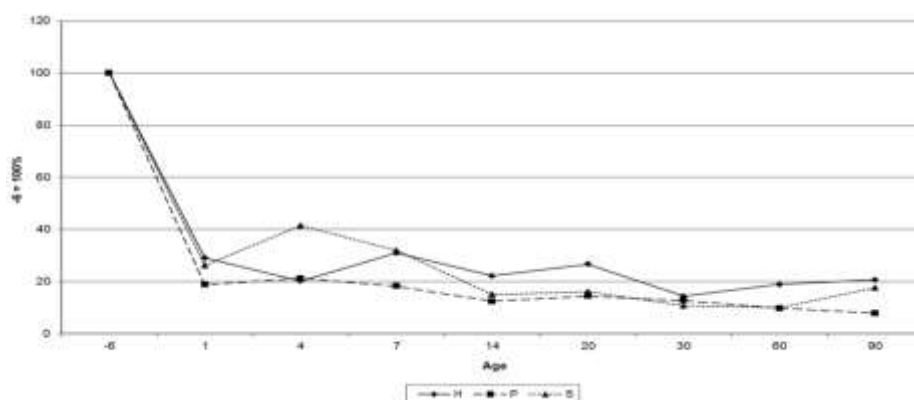
%P Prot – процентно съдържание на общ белтък в мембранната фракция

%S Prot – процентно съдържание на общ белтък в разтворимата фракция

От друга страна, общото съдържание на белтък във фракцията, съдържаща разтворими белтъци, намалява от около 47% до 38%, докато нивото на APP остава без значителна промяна. Това означава, че след синаптогенезата съдържанието на APP като процент от разтворимия белтък се увеличава. Това увеличение, което се случва, след като синапсите започват да функционират, още веднъж ни насочва към заключението, че секрецията на APP е под невротрансмитерен контрол.

Ясно изразена промяна в нивото на APP се наблюдава при фракциите, получени от скелетен мускул. След високи нива в ембрионалната възраст следва силен спад при новородено животно (**Фиг. 32**). Тази промяна най-вероятно отразява участие на APP в процесите на създаване и консолидиране на невромускулните

синапси. Това предположение се подкрепя от хистохимичните изследвания, показващи изобилието от APP в цитоплазмата на миотубули на 16-ти постнатален ден и последващото му прогресивно концентриране в невромускулните синапси. Намалението на нивото от 1-ви до 14-ти постнатален ден вероятно се дължи на процеса на елиминиране на синапси. Към раждането почти всички мускулни влакна са инервирани полиневронално. В следващите две седмици множествената инервация намалява, докато накрая всяко мускулно влакно се инервира от един аксон.



Фиг. 32. Онтогенетични промени в нивата на APP в хомогенат (H) и фракциите, съдържащи мембранни (P) и разтворими (S) белтъци, получени от скелетен мускул на плъх. Данните са изчислени, като оптична плътност на μg белтък и стойностите от 16-ти ембрионален ден са взети за 100%. Дадени са стойностите от два експеримента, всеки от които е остойностен в дубликат. Стандартното отклонение не надвишаваше 15%.

При изследването на нивата на APP в хомогенати от бъбрек и черен дроб не намерихме изразени промени по време на онтогенезата. Промените в нивата на APP във фракциите от тези органи, съдържащи мембранни и разтворими белтъци, следваха профила, наблюдаван при хомогенатите. От получените данните се вижда, че APP има много по-силна експресия в мозъка, отколкото в бъбрека и черния дроб.

Въз основа на получените резултати можем да заключим, че: а) експресията и процесирането/секрецията на APP в мозъка има специфични за този орган характеристики; б) секрецията на APP е специфичен за мозъка/нервната тъкан процес; в) APP се експресира предимно в мозъка, където неговата концентрация е в пъти по-висока от тази в другите изследвани органи.

5.9. Влияние на амилоидния β -пептид върху електричната активност на невронални клетки, култивирани върху мрежа от микроелектроди

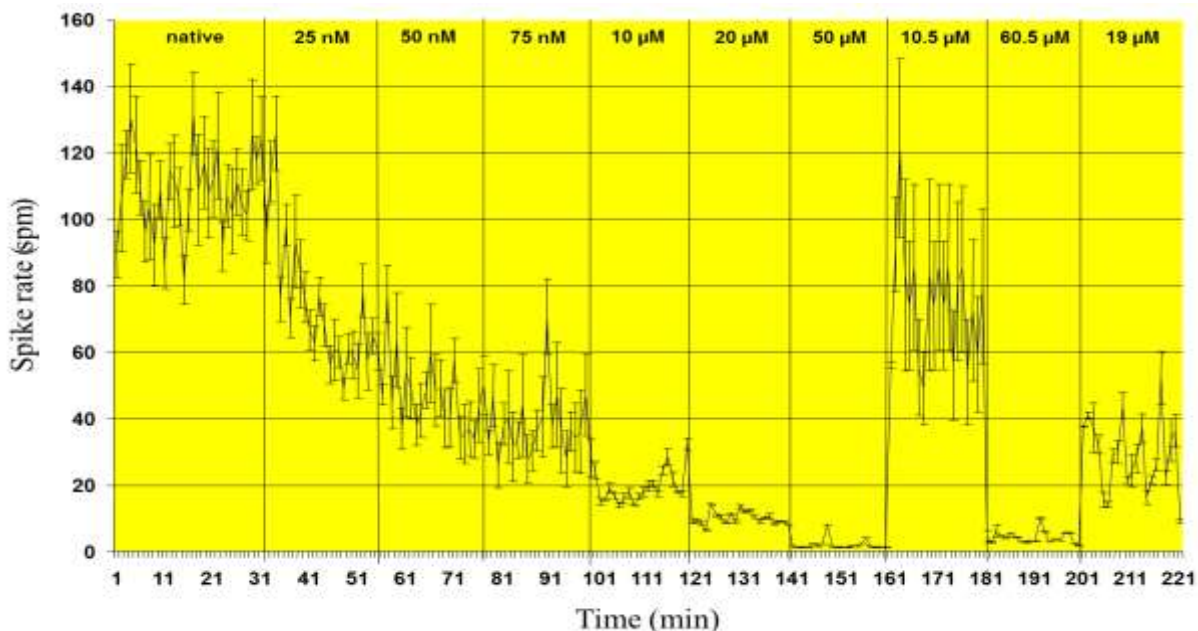
5.9.1. Влияние на биологично активния фрагмент $A\beta_{25-35}$ от амилоидния пептид върху електричната активност на невронални клетки

В литературата се натрупаха данни за повлияване на електрофизиологията на нервните клетки от протофибриларни разтворими $A\beta$ форми. В този период се запознахме с моделната система, развита от Gross (1979), която използва невронални клетки, култивирани върху микроелектроди, и позволява да се регистрира електричната активност на създалите контакти помежду си неврони. Имахме достъп до тази техника в Института по клетъчна биология и биосистемна техника, Университет Рощок и решихме да я използваме, за да изследваме директно влиянието на разтворим $A\beta$ върху електричната активност на неврони, свързани в мрежа, каквито изследвания не бяха правени до тогава.

Whitson et al. (1990) показаха, че секвенцията $A\beta_{25-35}$ от амилоидния пептид е биологично активната част, отговорна както за невротоксичните, така и за невротрофичните ефекти. Затова ние използвахме първо синтетичен $A\beta_{25-35}$, за да изследваме ефекта на разтворим $A\beta$ върху невронални мрежи, получени от фронталния кортекс и от гръбначния мозък на мишки. За да получим мономерен $A\beta$ в разтвора, който добавяме към невроналните мрежи, използвахме модификация, основана на методите, описани от Zagorski et al. (1999) и Butterfield et al. (1999).

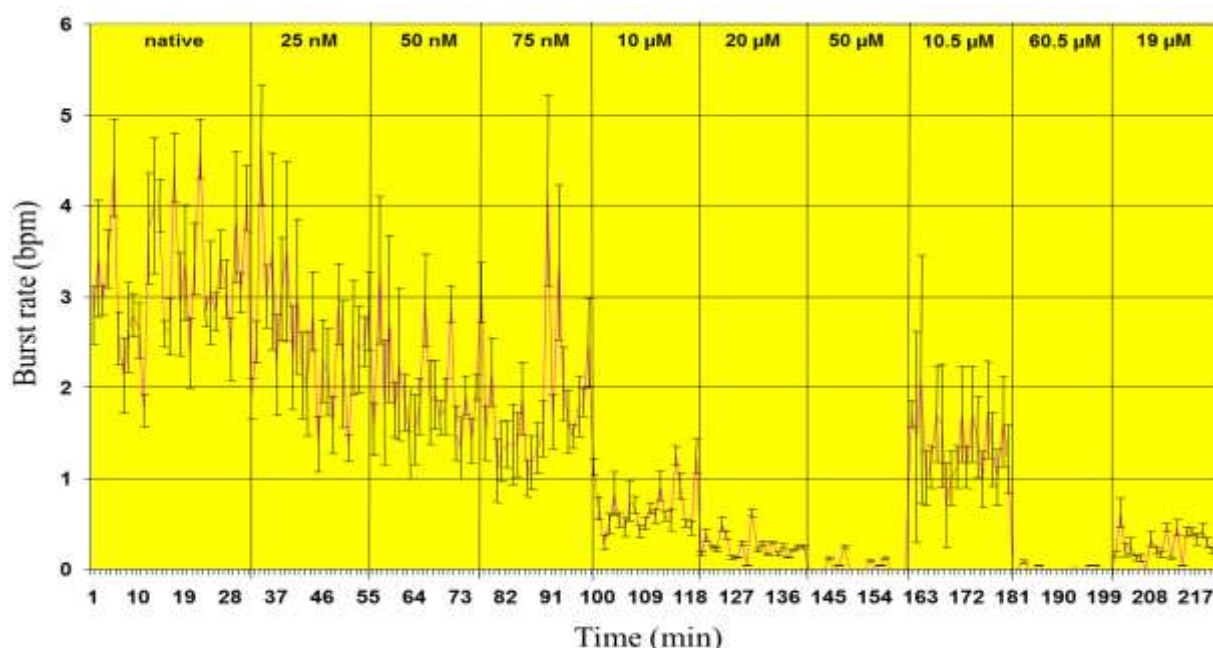
Установихме, че разтворимият $A\beta_{25-35}$ намалява концентрационно зависимо и обратимо електричната активност на невронални мрежи, получени от гръбначния мозък. При това се намалява честотата на спайковете и на бърстовете. Ефектът се наблюдава още при крайна концентрация от 25 nM $A\beta$ и е бърз – в рамките на първите 3 минути след добавянето към невроналните мрежи (първите измервания можем да правим 3 минути след добавянето). Почти пълно спиране на електричната активност се наблюдава при концентрация 50 μ M $A\beta$. Намаляването на концентрацията на $A\beta$ чрез смяна на инкубационната среда с такава, която не съдържа $A\beta$, води до възвръщане на електричната активност (**Фиг. 33; Фиг. 34**). Изследван беше и ефектът на $A\beta$ върху електричната активност на невронални мрежи, получени от фронталния кортекс на същата възраст. Сравнявайки ефекта върху невроналните мрежи, получени от тези тъкани, установихме, че кортикалната култура е засегната значително по-слабо. Различието в ефекта на $A\beta$ върху

невроналните мрежи от фронталния кортекс и от гръбначния мозък показва специфично въздействие в различни региони на централната нервна система, което може да се дължи на наличието/преобладаването на различни трансмитерни системи в тези области.



Фиг. 33. Ефект на различни концентрации Аβ върху честотата на спайковете (спайк/минута) на представителна невронална мрежа, получена от гръбначния мозък на мишка. Представени са средната стойност и стандартното отклонение за сигналите, регистрирани от 24-те активни канала (електрода).

Интересно е, че след първоначалното намаляване на електричната активност при концентрация на Аβ от 25 nM до 75 nM следва активиране между 100 nM и 1 μM Аβ и отново намаляване при по-високи концентрации. Това междинно стимулиране, респективно разлика в ефекта при ниски и високи концентрации, се наблюдава и при други биологични ефекти на Аβ, изследвани с други моделни системи. Наблюдаваното активиране на електричната активност на невроналните мрежи при тези междинни концентрации на Аβ може да отразява биологичен контролен механизъм, осъществяван посредством увеличаване на концентрацията на Аβ във физиологични рамки. Това може да се регулира от невроните чрез контролирано протеолитично разграждане на APP, а дефект в механизма на регулиране може да води до нефизиологично увеличаване на концентрацията на Аβ и да участва в патологията на АБ.



Фиг. 34. Ефект на различни концентрации Аβ върху честотата на бърстовете (бърст/минута) на представителна невронална мрежа, получена от гръбначния мозък на мишка. Представена е средната стойност и стандартното отклонение за сигналите, регистрирани от 24-те активни канала (електрода).

Бързината на реакция на невроналните мрежи след добавяне на Аβ, както и след отстраняването му чрез смяна на инкубационната среда, ни дава основание да предположим, че Аβ осъществява ефекта си директно в синаптичната област и най-вероятно чрез въздействието на рецептори.

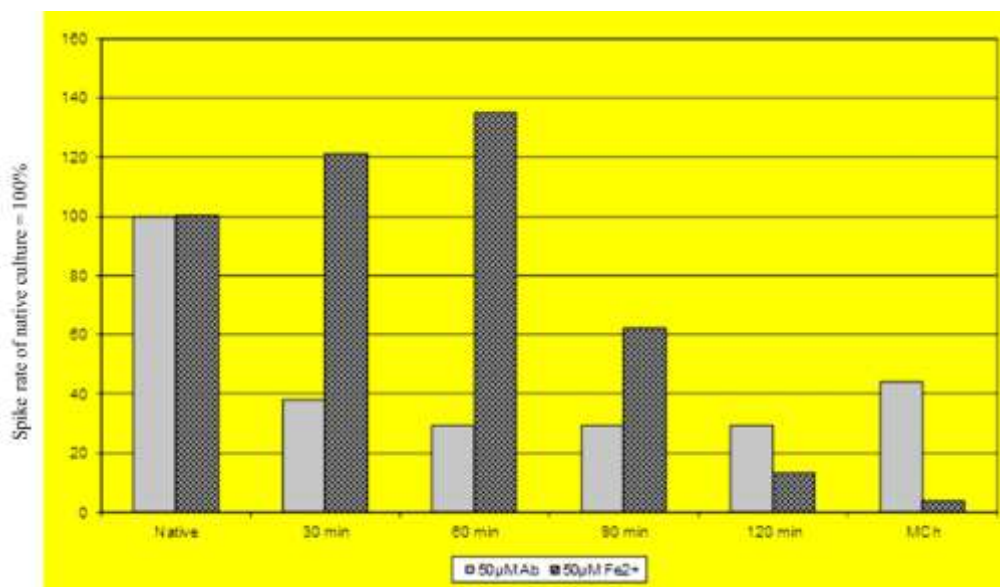
На базата на тези резултати изградихме хипотезата, че предизвиканото от разтворим Аβ намаляване на електричната активност на невроните води до нарушаване на комуникацията между нервните клетки, е ключов елемент в патологията на АБ.

5.9.2. Сравнение на ефекта на Аβ и на железни йони, предизвикващи оксидативен стрес, върху електричната активност на невронални клетки

В литературата имаше съобщения, че предизвикван от Аβ оксидативен стрес е важно звено в патологията на АБ. За да проверим дали ефектът на Аβ не се дължи на пероксидация на мембраните липиди, което да предизвиква чрез своята цитотоксичност общо, неспецифично повлияване на електричната активност на невроналните мрежи, сравнихме ефекта на Аβ₂₅₋₃₅ с този на Fe^{2+} йони, за които е добре известно, че предизвикват пероксидация на липидите. Получени от гръбначния мозък на мишка невронални мрежи бяха третирани с 50 μM Аβ или с 50

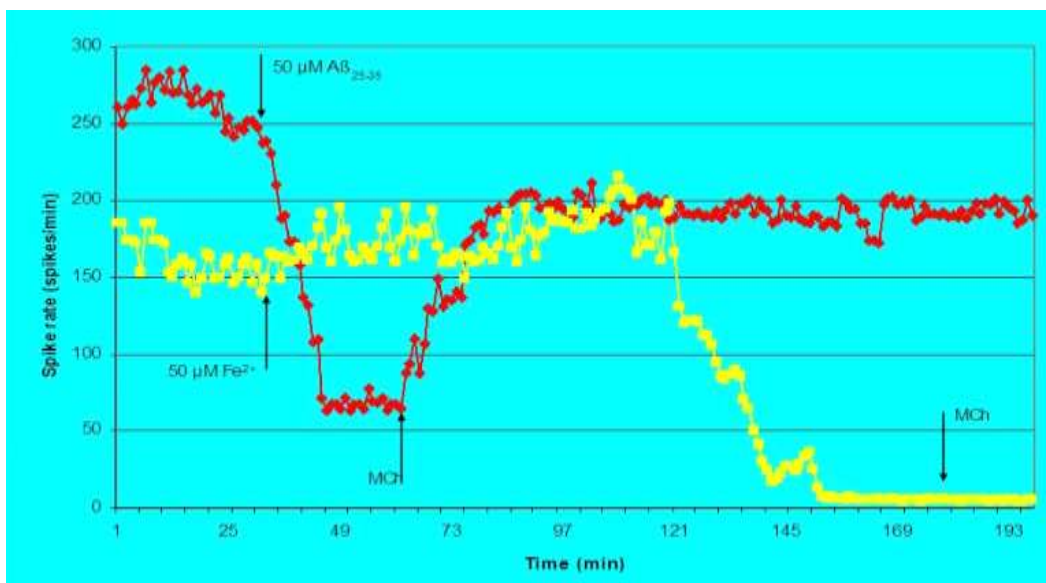
$\mu\text{M FeSO}_4$. Както вече показахме, $\text{A}\beta$ намалява честотата на спайковете (Фиг. 35; 36) веднага след добавянето и ефектът е обратим при намаляване на концентрацията на $\text{A}\beta$. При бърстовете се наблюдаваше същия профил.

FeSO_4 също намалява електричната активност на невроналните мрежи, но в сравнение с бързия ефект, предизвикан от $\text{A}\beta_{25-35}$, ефектът на FeSO_4 започва значително по-късно и не е обратим (Фиг. 36).



Фиг. 35. Ефект на $\text{A}\beta_{25-35}$ и FeSO_4 върху честотата на спайковете на невронални мрежи, получени от гръбначния мозък на мишка

Разликата в профила на ефекта на $\text{A}\beta$ и на FeSO_4 вероятно отразява разлика в механизма на въздействие на двата агента. Бързината на ефекта на $\text{A}\beta$ и неговата обратимост говорят за специфичност на въздействието, например посредством взаимодействие на $\text{A}\beta$ с рецептори и/или йонни канали. От друга страна, FeSO_4 се нуждае от по-дълго време, за да предизвика оксидативен стрес, който да се отрази необратимо на функциите на клетката и на електричната активност на невроните.



Фиг. 36. Сравнение на въздействието на A β 25-35 и FeSO $_4$ върху честотата на спайковете на невронални мрежи, получени от гръбначния мозък на мишка. Със стрелки са отбелязани времената на добавяне на агентите и на смяна на инкубационната среда (MCh).

За да затвърдим получените резултати при сравнението на въздействието на A β с това на агенти, предизвикващи оксидативен стрес, изследвахме и ефекта на H $_2$ O $_2$ (също известен оксидант) върху електричната активност на невроналните мрежи и установихме, че има същия профил на въздействие като FeSO $_4$.

Данните, сочещи, че ефектът на A β не се дължи на предизвикан оксидативен стрес, се потвърждават и от това, че предварителната обработка на невроналните мрежи с антиоксидантите витамин Е и пропил галат не намали ефекта на A β , но противодейства на ефекта на оксидантите FeSO $_4$ и H $_2$ O $_2$.

5.9.3. Сравнение на ефекта на A β и на агонисти на рецептори за инхибиторни невротрансмитери върху електричната активност на невронални клетки

Нашите изследвания показаха, че ефектът на A β 25-35 върху електричната активност на невроналните мрежи е много бърз, концентрационно зависим (с постигане на плато при всяка концентрация), обратим и специфичен за различни области на централната нервна система. Това ни накара да предполагаме, че A β упражнява въздействието си директно в синаптичната област и то е най-вероятно опосредствано от рецептори.

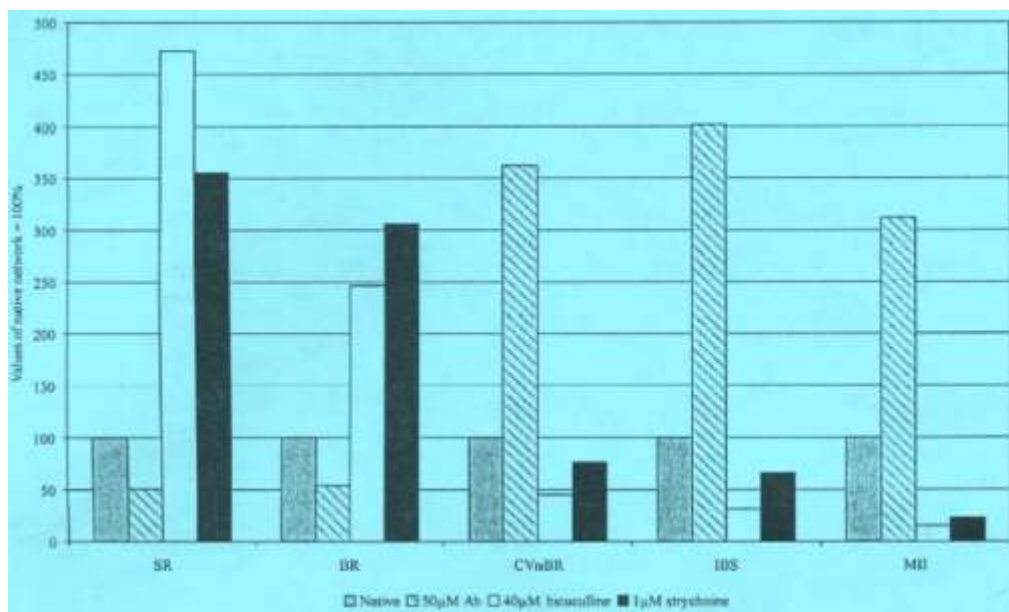
По време на нашите изследвания забелязахме, че почти всички канали, на които се регистрира електричната активност, уловена от мрежата микроелектроди,

показват веднага след добавянето на $A\beta$ намаляване на активността. Само при единици се наблюдаваше рязко активиране. Първоначално смятахме, че това се дължи на механично въздействие в резултат на добавянето на разтвора, съдържащ $A\beta$ – например отлепяне на невроналната мрежа от тези електроди и получаване на смущения. След като установихме, че такива канали се наблюдават при всички опити, стигнахме до заключението, че те реално регистрират активирането на инхибиторни рецептори, което води до намаляване на електричната активност на цялата невронална мрежа.

Следващата цел, която си поставихме, беше да потърсим типа рецептори, с които $A\beta$ взаимодейства. За целта проведохме серия от експерименти, при които третирахме невроналните мрежи с известни антагонисти на невротрансмитерни рецептори.

Започнахме със сравняване на ефекта на $A\beta$ с този на бикукулин и стрихнин (респективно антагонисти на рецепторите на инхибиторните невротрансмитери гама-аминомаслена киселина (GABA)-A и глицин). Ефектът на субстанциите върху електричната активност се описва посредством редица характеристики. Основните са честотата на спайковете, честотата на бърстовете, CVnBR (синхронизация на бърстовете), брой на спайковете между бърстовете и средният интервал между бърстовете. Честотата на спайковете е директно регистрираният сигнал, а другите се извеждат от него. CVnBR отразява синхронизацията на бърстовете, регистрирани на различните канали, като по-ниската стойност отразява по-висока степен на синхронизация. Броят на спайковете между бърстовете показва спайковете, които не са включени в бърстове.

Ефектът на $A\beta$ в присъствието на единия или другия антагонист е обратен на ефекта на самия антагонист (**Фиг. 37**). Блокирането на GABA-A рецептора с бикукулин или на глицин-рецептора със стрихнин води до висока синхронизация на бърстовете, почти пълно изчезване на междубърстовите спайкове и съществено намаляване на интервала между бърстовете. Добавянето на $A\beta$ предизвиква възвръщането на междубърстовите спайкове и намаляване на броя на спайковете в бърстовете, скъсяване на продължителността на бърстовете със съпътстващо увеличаване на интервала между бърстовете, и постепенно разпадане на бърстовете и тяхната синхронизация.



Фиг. 37. Сравняване на ефекта на Аβ25-35, бикукулин и стрихнин върху основните характеристики на електричната активност на невроналните мрежи. SR – честота на спайковете, BR – честота на бърстовете, CVnBR – синхронизация на бърстовете, IBS – % на спайковете между бърстовете, МИ – среден интервал между бърстовете

В заключение можем да предположим, че Аβ действа като агонист на тези инхибиторни рецептори. В по-нататъшни експерименти се опитахме по същата схема да изследваме взаимодействието на Аβ с AMPA и NMDA глутаматните рецептори. Получените резултати с антагониста на AMPA-рецептора NBQX и на NMDA-рецептора MK801 не можеха да бъдат интерпретирани поради изключително силния ефект, предизвикан от тях, който маскираше ефекта на Аβ.

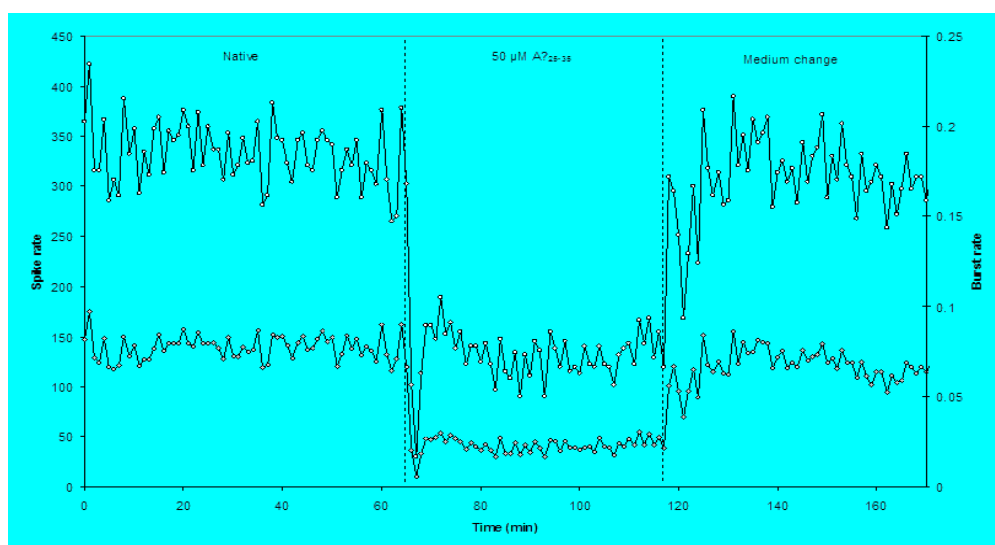
5.9.4. Сравнение на ефекта на фрагмента Аβ25-35 и ефектите на основните ендогенни форми на амилоидния пептид Аβ1-40 и Аβ1-42 върху електричната активност на невронални клетки

Двете основни ендогенни форми на Аβ се различават в дължината на техните аминокиселинни вериги. Основната форма е с дължина 40 аминокиселини (Аβ1-40). Освобождава се и Аβ пептид, съдържащ 42 аминокиселини (Аβ1-42), но в незаболелия мозък съотношението им е около 10:1 в полза на Аβ1-40. В заболялия от АБ мозък това съотношение се променя в полза на Аβ1-42, който има по-голяма склонност към образуване на фибрили и е основната форма, намираща се в ядрото на сенилните плаки.

Досега ние изследвахме ефекта на амилоидния протеин върху електричната активност на невроналните мрежи, използвайки секвенцията 25-35, която е носител

на биологичната активност. Въпреки че се съдържа в секвенцията и на двата основни ендегенни А β пептида, има данни, че А β 25-35 действа на различно място от А β 1-40. Показано е също, че А β 1-40 и А β 1-42 показват ясни фармакологични различия и следователно могат да имат различна роля в метаболизма на клетката и в АБ. Затова беше важно да установим какъв е ефектът на физиологично представените форми А β 1-40 и А β 1-42 и да го сравним с този на А β 25-3.

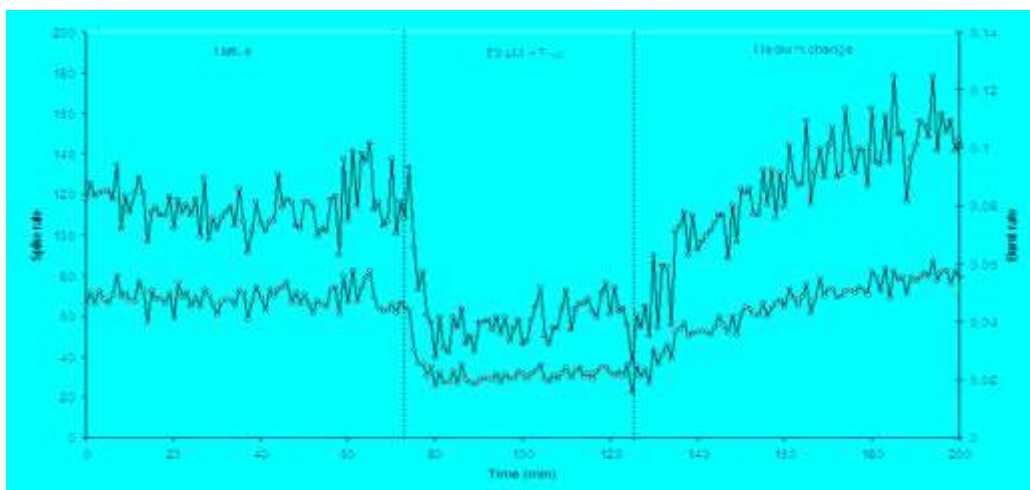
Отново проведохме опити с А β 25-35 в крайна концентрация от 50 μ М и наблюдавахме характерното бързо и обратимо потискане на електричната активност на невроналните мрежи (**Фиг. 38**).



Фиг. 38. Представителен експеримент, показващ ефекта на 50 μ М А β 25-35 върху честотата на спайковете и бърстовете на невронални мрежи, получени от фронталния кортекс на мишки. Честотата на спайковете е представена като спайкове на минута. Честотата на бърстовете е получена чрез аналогова интеграция на спайковете и е представена като бърстове на секунда.

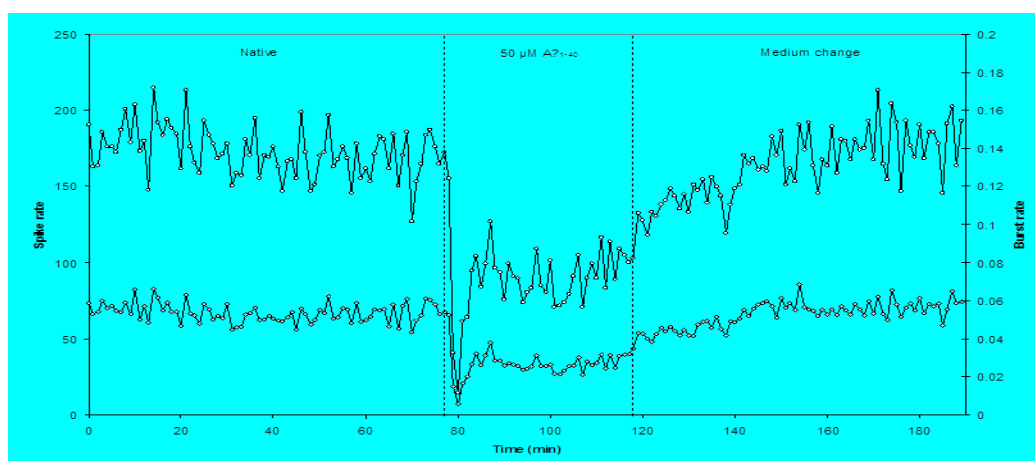
Правоъгълници – честота на спайковете; кръгове – честота на бърстовете; пунктирани линии – начало на третиране на невроналната мрежа; Native – нативна електрична активност на невроналната мрежа; Medium change – смяна на инкубационната среда с такава без А β .

Ефектът на 50 μ М А β 1-42 е представен на **фигура 39**. Вижда се, че той също е бърз и обратим, но е по-слабо изразен от ефекта на А β 25-35 (**Фиг. 41**).



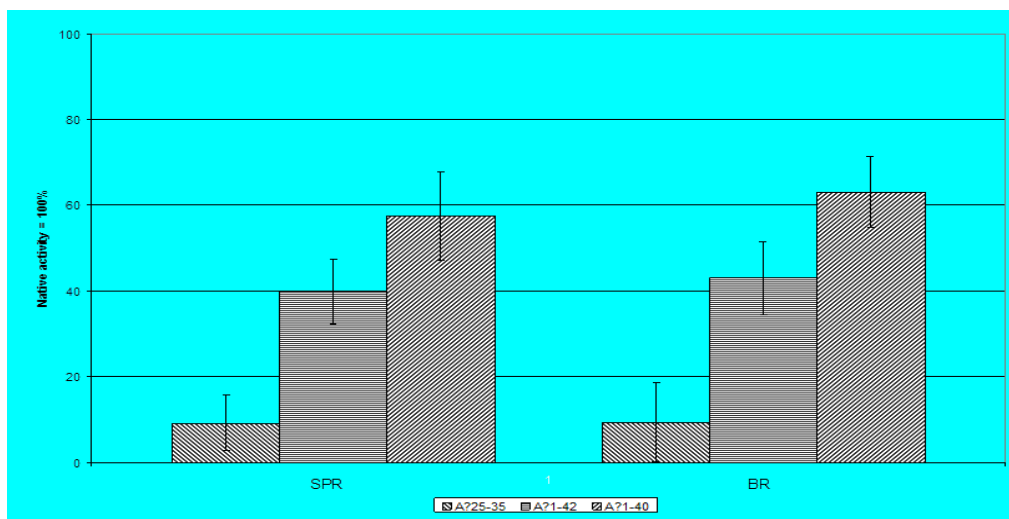
Фиг. 39. Представителен експеримент, показващ ефекта на 50 μM $\text{A}\beta 1\text{-}42$ върху честотата на спайковете и бърстовете на невронални мрежи, получени от фронталния кортекс на мишки. За подробности - фигура 38.

На **фигура 40** е представен ефектът на 50 μM $\text{A}\beta 1\text{-}40$. Той също е бърз, но е по-слаб от ефектите на $\text{A}\beta 25\text{-}35$ и $\text{A}\beta 1\text{-}42$.



Фиг. 40. Представителен експеримент, показващ ефекта на 50 μM $\text{A}\beta 1\text{-}40$ върху честотата на спайковете и бърстовете на невронални мрежи, получени от фронталния кортекс на мишки. За подробности - фигура 38.

На **фигура 41** е представено директно сравнение на инхибиторния ефект на трите пептида. Вижда се, че ефектът на $\text{A}\beta 25\text{-}35$ е най-силен, следван от тези на $\text{A}\beta 1\text{-}42$ и $\text{A}\beta 1\text{-}40$. Интересно е, че това подреждане на ендегенните пептиди отразява тяхното участие в образуването на амилоидни плаки.



Фиг. 41. Сравнение на инхибиторния ефект на двете основни ендогенни форми на амилоидния пептид и на биологично активния му фрагмент. Стойностите са нормализирани към нативната активност на невроналните мрежи = (100%) и са усреднени от 5 самостоятелни експеримента $\pm$ SEM. SPR – честота на спайковете; BR – честота на бърстовете.

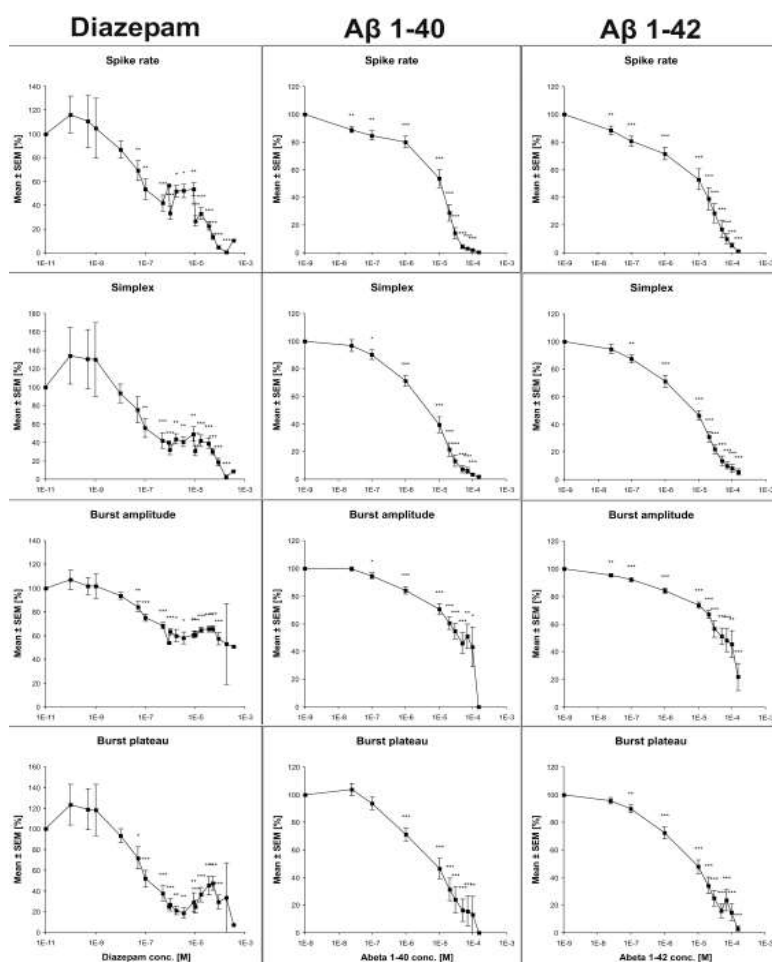
Разликата в ефекта на трите пептида поставя въпроса дали това се дължи на разликата в структурата им или въздействието им се осъществява посредством различни механизми. Ако действат чрез един и същ механизъм (място на въздействие), е възможно разликите в структурата да влияят на афинитета на свързване. Изясняването на този въпрос изисква по-нататъшни изследвания.

5.9.5. Търсене на сходство на ефекта на A β върху електричната активност на невронални клетки с ефекта на известни невроактивни вещества

Фирмата NeuroProff GmbH, Роцок, Германия, е оптимизирала технологията за изследване на ефекта на различни вещества върху електричната активност на невронални мрежи, култивирани върху микроелектроди. Проследявайки повече от 200 параметра, се установява, че всяко изследвано невроактивно вещество има своя неповторим ефект върху електричната активност на невроните, който е неговият, така да се каже, „пръстов отпечатък“. Създавайки база-данни от „пръстовите отпечатъци“ на невроактивни вещества, може, при регистриране на параметрите на неизвестно вещество, те да бъдат сравнени със съществуващата база-данни. При близко сходство на „пръстовия отпечатък“ на изследваното вещество с такъв или такива на регистрирани вещества, може да се предположи, че те имат сходен механизъм на въздействие. С помощта на колеги от фирмата, с които сме работили по-рано, получихме достъп до наличната база данни и решихме да проверим и по

този начин нашата хипотеза, че амилоидните пептиди взаимодействат с рецептори на инхибиторни невротрансмитери. За целта проведохме експерименти с основните ендогенни амилоидни пептиди A β 1-40 и A β 1-42 и сравнихме получените данни с тези на баклофен (специфичен агонист на GABA-B рецепторите), леветирацетам (модулира GABA- и глицин-зависимите йонни канали), фентанил (агонист на μ - и κ -опиоидните рецептори) и диазепам (агонист на GABA-A рецепторите).

Сравняването на „пръстовите отпечатыци“ показва най-голямо сходство на ефекта на амилоидните пептиди с този на диазепам (Фиг. 42), което е в потвърждение на нашата хипотеза, че A β взаимодейства с рецептори на инхибиторни невротрансмитери и ни насочва по-конкретно към GABA-A рецепторите.



Фиг. 42. Избрани параметри, характеризиращи ефекта на диазепам, A β 1-40 и A β 1-42 върху електричната активност на невронални мрежи. Нативна активност = 100%; за диазепам $n = 14$, за A β 1-40 $n = 10$, за A β 1-42 $n = 12$.

5.9.6. Сравняване на ефекта на мономерен А β и олигомери на А β върху електричната активност на невронални клетки

В резултат на процесията на APP А β се освобождава като мономер, който след това агрегира в димери, олигомери и фибрили. Има много и противоречиви данни за токсичността на А β в различните степени на агрегиране. За да получим яснота за този проблем, си поставихме за цел да изследваме и сравним ефекта на мономера на А β 1-42 и агрегирал А β 1-42. Избрахме А β 1-42 заради преобладаването му в амилоидните плаки и по-силния му ефект върху електричната активност на невроналните мрежи в сравнение с А β 1-40.

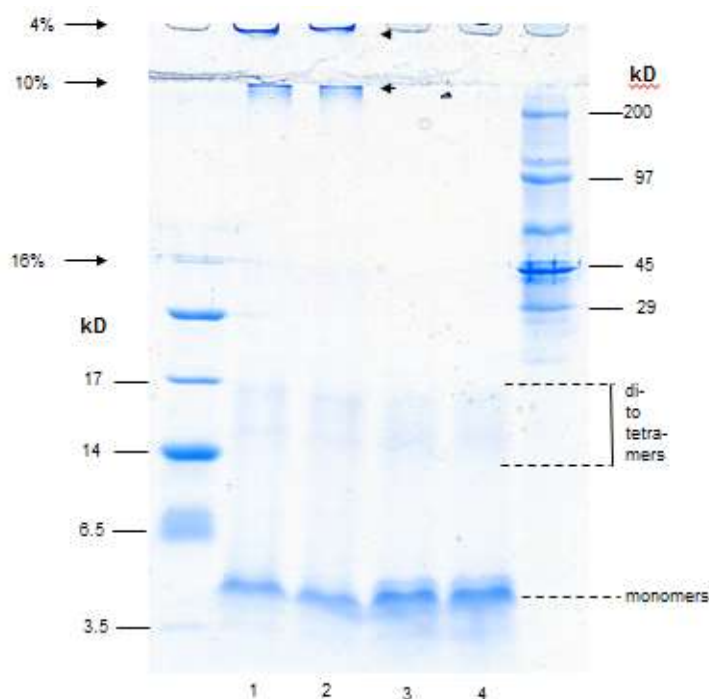
За получаването на два различни разтвора, единият съдържащ високи олигомери (над 200 KD), а другият съдържащ мономери и незначително количество ди- до тетрамери, използвахме следната процедура. Първо разтворихме А β 1-42 пептида директно в 50% DMSO/DMEM. Този разтвор съдържа високи А β олигомери (**Фиг. 43**, линии 1 и 2). Половината от този разтвор беше лиофилизирана и полученият остатък беше подложен на процедура за мономеризиране. За тази процедура използвахме модификацията на методите на Butterfield et al. (1999) и Zagorski et al. (1999). След мономеризирането остатъкът беше разтворен в 50% DMSO/DMEM.

След директното разтваряне на А β 1-42 в 50% DMSO/DMEM получихме разтвор, съдържащ мономери, ди- до тетрамери и високи олигомери (над 200 KD). Някои от високите олигомери останаха на границата между 4% и 10% гелове, а други не можеха да влязат в 4% гел (**Фиг. 43**, линии 1 и 2). Разтворът на мономеризирания А β 1-42 съдържаеше само мономери и незначително количество ди- до тетрамери (**Фиг. 43**, линии 3 и 4).

Изследвахме ефекта на тези разтвори върху електричната активност на невронални мрежи, получени от фронталния кортекс на мишка. Разтворът, съдържащ А β 1-42 мономери, потиска концентрационно зависимо честотата на спайковете и на бърстовете (**Фиг. 44**).

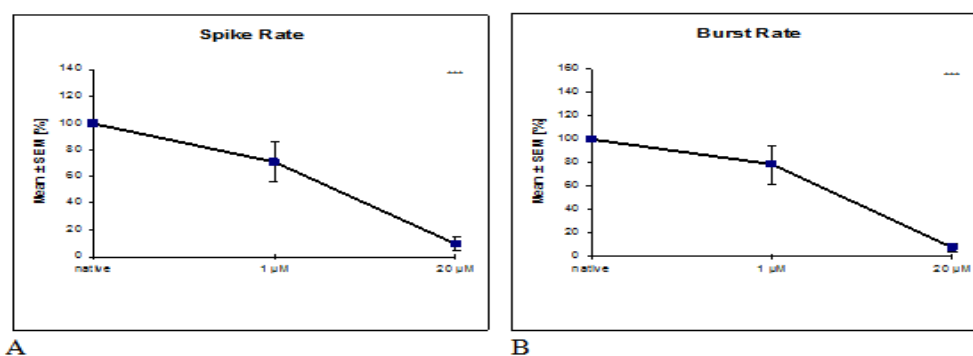
За разлика от разтвора, съдържащ мономери, разтворът, съдържащ олигомери, не оказва забележимо влияние върху честотата на спайковете и на бърстовете на невроналните мрежи (**Фиг. 45**). На **фигура 43** (линии 1 и 2) се вижда, че този разтвор също съдържа мономери и ди- до тетрамери на А β 1-42. Тяхното процентно съдържание, отнесено към съдържанието на олигомеризирания А β 1-42 в общия белтък, е толкова малко, че концентрацията им в аликвота, добавен към

невроналните мрежи, е твърде ниска, за да може да повлияе електричната активност.

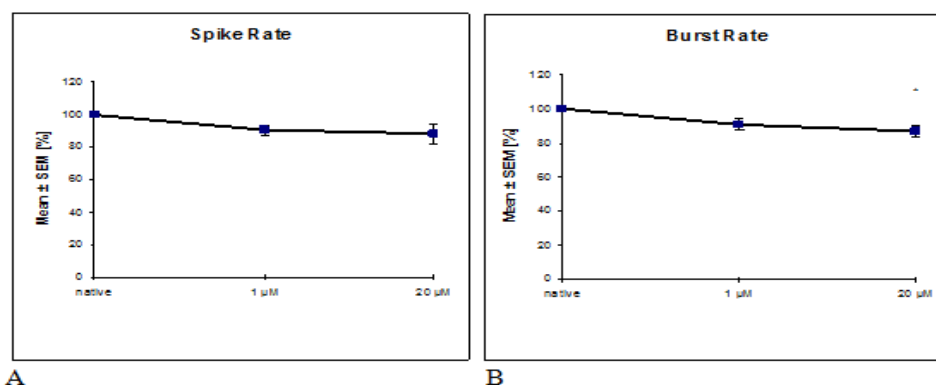


Фиг. 43. Оцветяване с Coomassie Brilliant Blue на tris-tricine полиакриламиден гел с разделяне на двата приготвени разтвора на А β 1-42, показващо съдържанието на различни степени на агрегация. Линии 1 и 2 – А β 1-42, разтворен директно в 50% DMSO/DMEM. Линии 3 и 4 – А β 1-42, разтворен в 50% DMSO/DMEM след мономеризация.

Стрелки с проценти – начало на гела със съответната концентрация; удебелени стрелки – показват А β 1-42 олигомери, които не са навлезли в 4%-ния и 10%-ния гел; отляво и отдясно са показани стандарти за молекулно тегло.



Фиг. 44. Ефект на мономеризираната А β 1-42 подготовка върху честотата на спайковете (А) и на бърстовете (В) на невронални мрежи от фронтален кортекс на мишка. Нативна активност = 100%, $n = 5$.



Фиг. 45. Ефект на Aβ1-42 препаратията, съдържаща високи олигомери, върху честотата на спайковете (A) и на бърстовете (B) на невронални мрежи от фронтален кортекс на мишка. Нативна активност = 100%, $n = 4$.

Представените данни недвусмислено показват, че Aβ1-42 повлиява електричната активност на невроналните мрежи в мономерна форма, но не и в агрегирано състояние. Това е в подкрепа на нашата хипотеза, че Aβ мономерите нарушават синаптичната функция, което води до загуба на комуникация между невроните, което може да е първа стъпка към дегенерация на синапсите и загуба на неврони – процеси, характерни за протичането на Алцхаймеровата болест.

5.10. Изследвания на транскриптома в синаптозомална фракция

5.10.1. Сравнително изследване на транскриптома в синаптозомални фракции от млади и стари мишки

Пластичността и паметта са зависими от локален синтез на белтъци, който се осъществява в близост до синапсите. Синаптозомите са важна моделна система за изучаване на молекулярните механизми на тяхното функциониране. Първите данни за синаптозомалния транскриптом (съвкупността на всички РНК-молекули в определен момент, т.е. транскрибираните от ДНК в РНК гени) бяха получени за синаптозоми от хипокампус на плъх след раждането, за ефекта на консумацията на алкохол върху генната експресия в синаптозоми и за генната експресия в синаптозоми в начални стадии на АБ. Тези изследвания дадоха и първите сведения за локалната специфика на генната експресия в тези фундаментални невронални структури. Досега обаче липсват сравнителни изследвания за промените в локалния синаптичен транскриптом, настъпващи при процесите на стареене.

Бързо нарастващ брой изследвания ясно показват, че интергенните области (некодиращи участъци ДНК между гените) на хуманния геном подлежат на тъканно специфична транскрипция. Дълго време се смяташе, че голяма част от ДНК е

„излишна“ (junk; до 95%), тъй като не се превежда до белтък. Birney et al. (2007) показаха обаче, че поне 93% от човешкия геном по едно или друго време, и в една или друга тъкан, се транскрибира. В резултат на тази така наречена первазивна транскрипция се генерират хиляди различни некодиращи РНК, включително дълги некодиращи РНК (lncРНК) транскрипти (по-дълги от 200 bp), които участват в широк спектър регулаторни и каталитични процеси. Интересно е, че половината от всички lncРНК се експресират в централната нервна система, включително в мозъка. Един от техните субкласове са дългите интервениращи некодиращи РНК (lincРНК), разположени между белтък-кодиращи локуси, чиято експресия е нарушена при невродегенеративни заболявания, като множествената системна атрофия и АБ.

В нашите изследвания за първи път направихме сравнителен анализ на синаптозомалния транскриптом в мозък на млади и стари мишки.

От кората на главния мозък изолирахме фракции, съдържащи синаптозоми, като използвахме метода на Dunkley et al. (2008). Извършихме секвениране на транскриптома на синаптозомалните фракции, изолирани от кората на главния мозък на млади (2-месечни) и стари (23-месечни) мишки. RNA-Seq анализ показва експресия на 16 360 транскрипта в млади мишки и 22 288 транскрипта в стари мишки. Сравнителният анализ на транскриптома показва 6 902 диференцирано експресирани гени (DEGs), от които само 260 (3,8%) бяха описани в съществуващия по време на изследването референтен геном на мишката.

От тези 260 описани гена, 5 (1,9% от транскриптома) се експресират само при младите животни и 23 (8,8%) само в синаптозомалната фракция, изолирана от възрастни мишки. Освен това 212 гена (81,5%) са описани като кодиращи за белтък, докато 48 (18,5%) – като некодиращи за белтък. Осем (16,7%) DEGs от последната група са класифицирани като lincРНК и 7 (14,6%) – като антисенс транскрипти.

Останалите 6 642 DEGs, от общо 6 902, бяха определени с помощта на TopHat/Cufflinks анализ като експресирани локуси, намиращи се в неописаната част на генома. Наблюдавахме забележителна диспропорция на разпределението на генната експресия между стареещите синаптозоми и фракцията, изолирана от млади животни. При това 4 670 гена (70,3%) бяха експресирани само в стареещи синаптозоми и 1 955 (29,4%) – само при млади животни. Само 17 (0,3%) неописани DEGs се експресираха и в двете фракции.

Като част от нашите изследвания направихме и анализ на пътищата на действие на 233 белтък-кодиращи DEGs. При това анализирахме 81 гена с повишена

регулация и 251 гена с понижена регулация в стареещи синаптозоми. Значително обогатените категории от генната онтология (GO), за групата гени с повишена регулация, обхващат процеси като метаболизъм на сукцината, трансмисия на нервни импулси, имунен отговор, пост-транскрипционно регулиране на генната експресия, регулиране на клетъчния метаболизъм на белтъците, транскрипция на рРНК и епигенетично регулиране на генната експресия. При DEGs, които са с понижена регулация в стареещите синаптозоми, се наблюдава обогатяване с гени, свързани с клетъчната миграция.

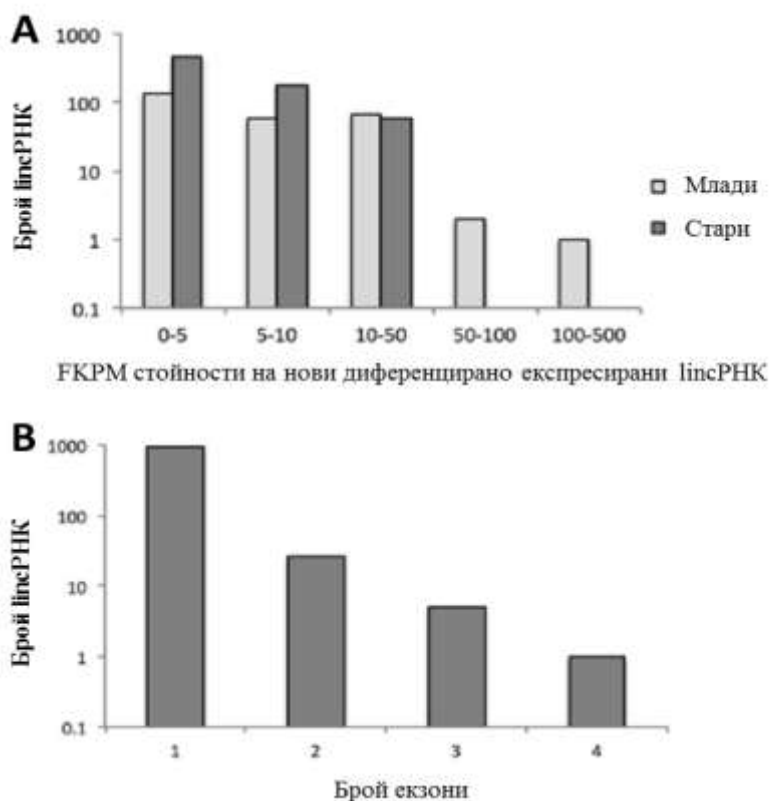
Фокусирахме се върху lincРНК поради тяхната тъканна специфичност и данните за тяхното участие в процеси в централната нервна система. Използвахме следните критерии, за да дефинираме нови lincРНК от генния пул от 6 642 неописани транскрипти: (1) отсъствие на отворени рамки за четене, по-дълги от 300 bp; (2) отсъствие на припокриване с експресиращи локуси по отношение на геномната локализация; и (3) транскрипти, по-дълги от 200 bp. Следвайки тези критерии, идентифицирахме 961 DEGs. Интересно е, че само 11 lincРНК бяха експресирани на сигнификантно различни нива при млади и при стари синаптозомални фракции. Останалите 950 приети lincРНК бяха експресирани или само в младите (259 транскрипта), или само в старите синаптозоми (691 транскрипта).

За по-добро разбиране на характеристиките на транскриптите и спектъра им на експресия анализирахме 962 нови lincРНК за разпределението на FPKM (фрагменти на килобаза от екзон за 1 милион картирани четения) стойностите между всички транскрипти и броя на екзоните, допринасящи за процесията на транскриптите. Резултатите от този анализ са представени във **фигура 46**. Повечето lincРНК остават в ниската област на експресия (до 5 FPKM). 131 транскрипта показват експресия от повече от 10 FPKM в младите или в старите синаптозоми, оставайки по този начин на сравнимо ниво с множество кодиращи белтък гени (**Фиг. 46А**). По отношение на екзонната последователност повечето от lincРНК (96,9%) се състоят от единичен екзон, което е описано и в предишни изследвания на транскриптома на човешки тъкани. Един от транскриптите се състоеше от повече от 3 екзона и потенциално може да бъде алтернативно експресиран в различни изоформи (**Фиг. 46В**). От всичките 6 892 екзона, които съставят 6 642-та гена, 5 922 са с по-малко, или с точно 200 bp.

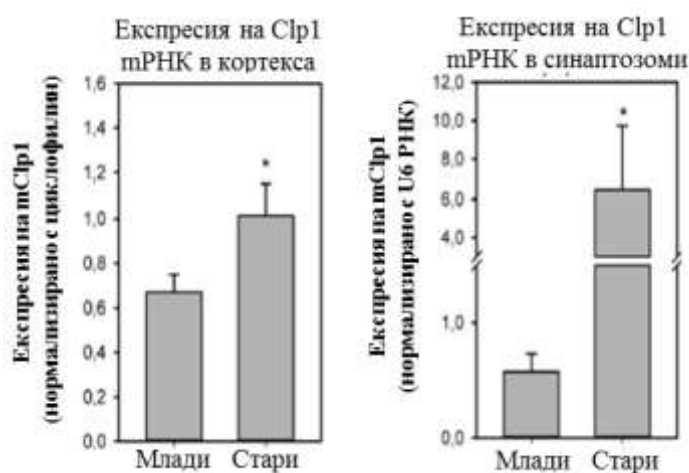
Поставихме си въпроса доколко мишите диференцирано експресирани lincРНК имат хуманни ортолози. Използвахме UCSC LiftOver, за да търсим хуманни ортолози на 962-те миши lincРНК. От 962-та миши гена, 389 се оказаха с позитивни съответствия в референтния човешки геном. От 389-те гена, 91 могат да бъдат съотнесени към 72 описани хуманни гена.

Един от описаните DEGs, а именно Clp1 генът (cleavage and polyadenylation factor, subunit 1; разделящ и полиаденилиращ фактор), привлече нашето внимание поради 115-кратното повишение в стареещите синаптозоми и наличието му в няколко обогатени категории от GO, свързани с процесираването и експресията на РНК. Използвайки RT-qPCR, потвърдихме повишената експресия на Clp1 в изолирана от синаптомални фракции РНК (**Фиг. 47**).

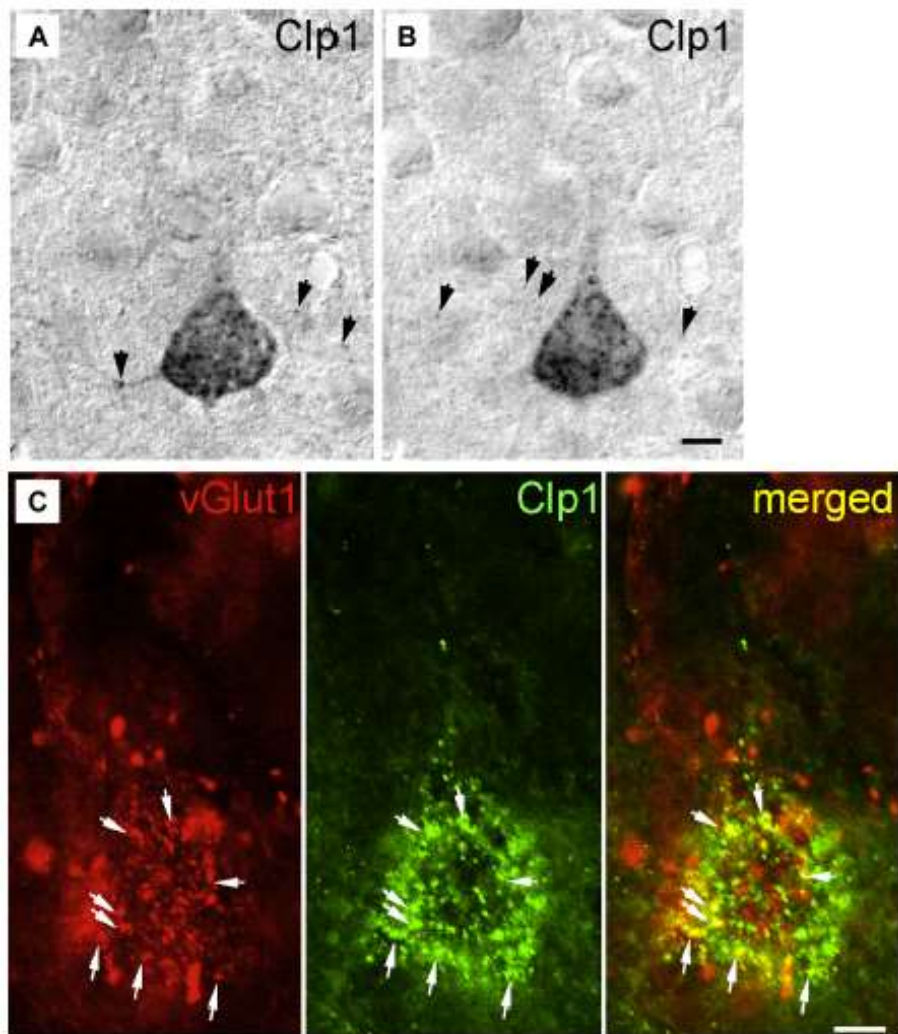
Clp1 кодира протеин, който е мултифункционална киназа, участваща в съзряването на tРНК, мРНК и siРНК, и е описан като важен корегулатор на функции на централната нервна система. Поради това е още по-интересно да се проследи промяната на експресията на Clp1 по време на стареенето. Както е показано на **фигура 48А и В**, белтъкът Clp1 е дифузно разпределен в невроналната сома и невроналните израстъци. Експерименти с двойно оцветяване показват колокализацията му с vGlut1 (**Фиг. 48С**), което потвърждава поне частична синаптомална локализация на Clp1.



Фиг. 46. Разпределение на честотата на експресия на диференцирано експресирани дефинирани lincРНК (А) и тяхната екзонна композиция (В). За оценяване на нивото на експресия както при младите, така и при старите синаптозоми се взимаше по-високата стойност на FPKM за определяне на разпределението на експресията. FPKM – фрагменти на килобаза от екзон за 1 милион картирани четения; lincРНК – дълги интервениращи некодиращи РНК.

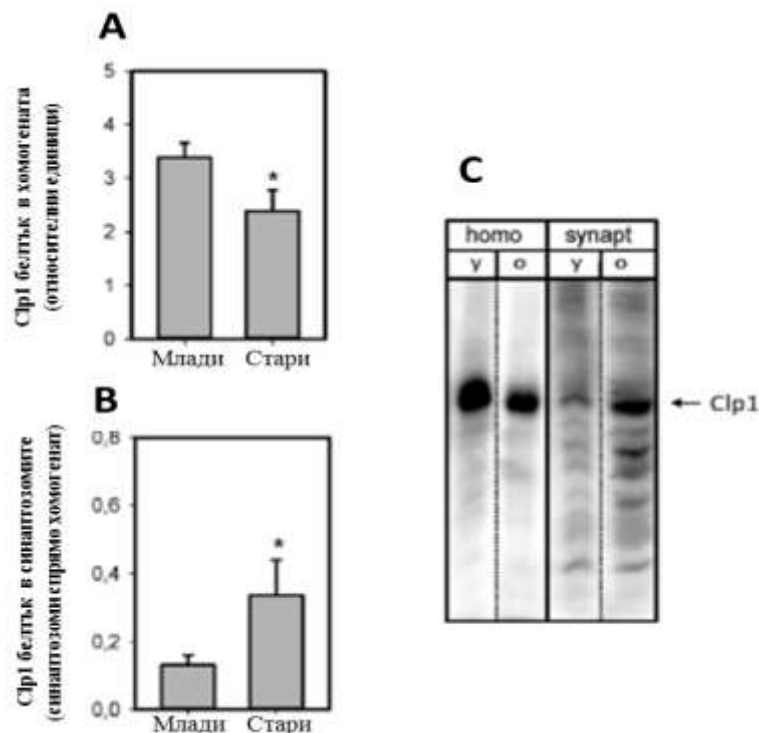


Фиг. 47. RT-qPCR потвърждаване на повишената експресия на Clp1 в стари синаптозоми с използване на РНК проби, получени от независимо изолирана синаптомална фракция (дясно), сравнено с експресията на Clp1 mРНК в тоталната кортикална РНК (ляво). (n = 6; t-тест; *p < 0,05)



Фиг. 48. Имунохистохимично оцветяване на Clp1 белтъка в неврони в кората на главния мозък на мишка. Показано е оцветяване (DAB/Ni, черно) както в клетъчното тяло, така и в клетъчните израстъци (А, В). Двойното оцветяване (С) на Clp1 белтъка (Cy2, зелено) и vGlut1 (Cy3, червено) показва локализация на Clp1 в невроналните синапси (наложено, бели стрелки), което потвърждава биохимичните данни. Масщабната черта показва 10 μm .

Въпреки че общото съдържание на Clp1 в хомогената от кората на главния мозък от мозъка на мишка намалява, процесът на стареене на мозъка се характеризира с нарастващо съдържание на Clp1 в синаптозомите (Фиг. 49).



Фиг. 49. Разпределянето на експресията на Clp1 белтъка в мозъка на млади и стари мишки показва намаляване на Clp1 белтъка в общия хомогенат (A) и нарастване на Clp1 белтъка в синаптозомалната фракция (B), което потвърждава наблюдаваната свръхекспресия на Clp1 mРНК в стареещите синаптозоми ($n = 6$; t -тест; $*p < 0,05$). На (C) е показан репрезентативен имуноблот на Clp1 белтъка в хомогенат (homo) и в синаптозомална фракция (synapt) от млади (y) и стари (o) мишки.

Семи-количественият анализ на имунохистохимичното оцветяване показва изместване на локализацията на Clp1 в хипокампадни неврони в мозъка на стареещи мишки към невроналните израстъци. Количеството беше съпоставимо с това на Clp1 в сомата и потвърждава данните, получени с имуноблот.

В представените изследвания проучихме промените на локалния транскриптом в синаптозомалните фракции, изолирани от млади и възрастни мишки, и за първи път показваме възрастово-зависими промени в експресията на гени, от които се получават кодиращи за белтък и не кодиращи транскрипти в тези специализирани структури. Сравнителният анализ показва, че повечето от засегнатите от процесите на стареене гени в синапсите не са описвани досега и техните РНК-продукти нямат капацитета да кодират за белтък. Освен това значителна част от тези неописани DEGs бяха идентифицирани като lincРНК. Смята се, че този вид РНК представлява регулаторни молекули, които имат важна роля в запазването на невроналните функции. Освен това детайлно изследвахме възрастовите промени на експресията на Clp1 белтъка, който е ключов фактор в

метаболизма на тРНК. Нашите наблюдения показват, че Clp1 може да участва в контрола на когнитивните функции, регулирани от хипокампуса и свързаните структури от главния мозък.

Като цяло е учудващо, че при мишката невроните експресират толкова голям брой lincРНК в синапсите, пространствено отдалечено от клетъчното тяло и по-специално от ядрото. Ядрото се разглежда като основното местонахождение на lincРНК, където те упражняват регулиращите си функции. Предишни изследвания показаха, че геномът на приматите, и по-специално човешкият геном, развива огромен брой не кодиращи локуси до ниво, при което броят на не кодиращите гени далеч надвишава броя на белтък-кодиращите гени. Ние представяме данни, показващи, че геномът на мишката е мощен източник на первазивна транскрипция с много lincРНК, които променят начина си на експресия по време на стареенето.

Голямото разстояние между синапсите и тялото на нервната клетка е фундаментално предизвикателство за невроните. Те трябва да не позволяват синтеза на синаптични протеини по време на транспорта на мРНК до синапсите и същевременно да организират бърз синтез на място в зависимост от изискванията на синаптичната активност. Решаването на тези проблеми изисква локални механизми за контрол на транслацията на РНК, за да може да осъществи синтез на нови белтъци в съответствие с пространствените и подредените във времето изисквания. Редица статии описват важното значение на локалния белтъчен синтез за развитието на синапсите и тяхната пластичност.

В литературата е описано, че при бозайниците lincРНК имат регулаторна роля при транскрипцията на гените и участват в много други функции на клетката. При сравняването на транскриптомите на синаптозоми от млади и стари животни ние намираме стотици диференцирано експресирани lincРНК. Броят им надхвърля четирикратно броя на диференцирано експресираните белтък-кодиращи гени. Това ясно показва, че lincРНК играят важна роля в локалната синаптична среда, а не са само пасивен резултат от первазивна транскрипция.

Друга отличителна характеристика на спектъра на диференцираната генна експресия в стареещи синаптозоми е значителното поляризиране, по-специално при неописаните транскрипти. Само 0,3% от DEGs са експресирани в двете възрасти, докато останалите гени експресират своята РНК единствено и само в една възраст. Следователно гените, експресирани единствено във възрастния мозък, могат да се разглеждат като потенциални молекулярни маркери на стареенето. Това би било от

особен интерес за тези миши гени, които имат хуманни ортолози, което ние установихме за 389 от диференцирано експресирани lincРНК. Некодиращите РНК може да служат като допълнителен молекулярен белег за стареенето на мозъка заедно със специфично експресирани белтък-кодиращи гени, идентифицирани от нас и от други автори с други техники.

Значителното повишаване на експресията на Clp1 сочи, че tРНК сплайсингът може да е важна част от системата за трансляция на белтъците, която е засегната в стареещите неврони. По-ранни изследвания показват свръхекспресия на Clp1 белтъка, в частност в стареещия хипокампус. Това може да показва натрупване на tРНК, която не е сплайсирана, и това да води до повишена нужда от Clp1 белтък, който участва в специфичния tРНК сплайсинг. Показано е, че системата за tРНК сплайсинг е нарушена при невродегенеративни заболявания.

В заключение може да се каже, че представяме за първи път сравнителен анализ на синаптозомалния транскриптом в млад и стареещ миши мозък. Резултатите показват, че огромен брой нови, неописани lincРНК са засегнати в локалната синаптична среда в резултат на стареенето. Изследването разкрива ново ниво на транскрипционно регулиране, което е повлияно при стареенето и дава материал за бъдещи изследвания.

5.10.2. Анализ на кръговия транскриптом в синаптозоми от млади и стари мишки

Неотдавнашното проучване на кръговия транскриптом, станало възможно чрез напредъка на RNA-seq технологията, в крайна сметка доведе до повторното откриване на отделен подклас на дълги некодиращи РНК, характеризиращи се с тяхната кръгова структура, кръгови РНК (circРНК). CircРНК са продукт на специфична форма на алтернативно снаждане. Напоследък са идентифицирани хиляди circРНК при дрозофила, както и в клетки и тъкани на бозайници. Отличителна черта на circРНК е тяхната устойчивост към РНК екзонуклеази, което води до удължен полуживот на кръговите транскрипти за до 48 часа, в сравнение с 10 часа за линейни РНК молекули. circРНК са специфично експресирани при различни видове рак и невродегенеративни заболявания (включително АБ), те могат да се представят като привлекателни кандидати за молекулярни биомаркери.

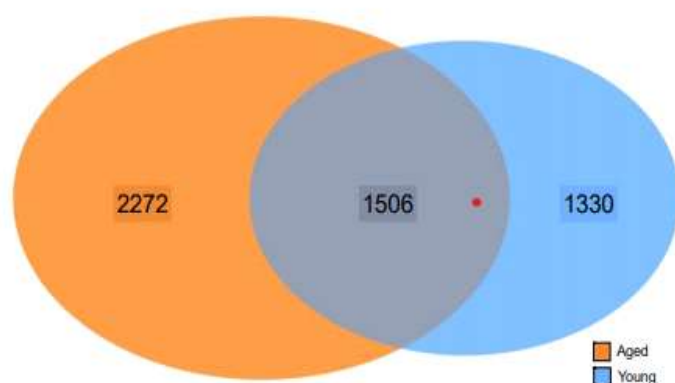
CircРНК са особено много в мозъка и се предполага, че те, заедно с други

класове lncРНК, са важен елемент в контрола на механизма, който поддържа функционалността на синаптичното предаване, както и развитието на синаптична пластичност и паметта. За потенциалните функции на circРНК все още много се спекулира, но има тенденция да се приема, че circРНК могат да имат роля в конкурентния сплайсинг, регулирането на транскрипцията, като структурна основа за събиране на протеини (protein scaffolding) и РНК свързващи протеини scaffolding. Освен това е доказано, че circРНК се натрупват в мозъка по време на развитието на дрозофилата и при синаптогенезата и в синапсите при мишки circРНК са преференциално експресирани от гени, които кодират синаптични протеини.

Според последни оценки 20% от гените, кодиращи протеини в мозъка, произвеждат circРНК с диференциални модели на експресия в анатомично и функционално различни мозъчни региони. Няма проучвания, които да са изследвали промените на кръговите транскриптоми, по-специално в синаптичните структури, в резултат на нормалното стареене на мозъка както при хора, така и при гризачи.

Ние представяме биоинформатичен анализ на circРНК и експериментално потвърдени circРНК, обхващащи кръговия транскриптом на синаптозоми, получени от кортекса на млади и възрастни мишки.

Детектирането на circРНК както с CIRI2, така и с CIRCexplorer2, показва общо 2 836 circРНК в млади синаптозоми и 3 778 circРНК във възрастни синаптозоми. Имаше 1 506 circРНК, експресирани и в двете възрастови групи, което означава, че 1 330 и 2 272 circРНК са уникално експресирани в младите и респ. във възрастните синаптични групи (**Фиг. 50**). Във възрастните синаптозоми има 1,7-кратно увеличение на детектираните circРНК в сравнение с младите синаптозоми.



Фиг. 50. Брой на circРНК, открити като уникални изоформи при млади (1 330) и възрастни (2 272) синаптозоми, и такива, които се откриват и при двете групи (1 506). Общите circРНК бяха използвани при анализ на диференцираната експресия.

Беше изследвана и връзката между гените, които експресират само транскрипти, претърпяващи каноничен сплайсинг и локуси, които експресират само *circ*РНК във всяка група синаптозоми. Както е показано в **таблица 8**, 4,64% от всички гени, експресиращи линейни РНК, бяха установени като ко-експресиращи *circ*РНК в синаптомалните фракции от млади мишки, в сравнение с 6,78% в синаптомалните фракции на възрастни мишки. Освен това открихме общо 16 гена, експресиращи 18 уникални *circ*РНК както при млади, така и при възрастни синаптозоми, тези гени не експресират канонично сплайсирани РНК.

Табл. 3. Гени, експресиращи линейни и кръгови РНК при млади, възрастни, както и в двете синаптомални фракции.

	<u>Млади</u>	<u>Възрастни</u>
Гени, експресиращи линейни РНК	22652	23098
Гени, експресиращи <i>circ</i> РНК	1059	1576
Гени, експресиращи линейни и <i>circ</i> РНК (%)	1050 (4,64)	1567 (6,78)
Гени, експресиращи само линейни РНК	21602	21531
Гени, експресиращи само <i>circ</i> РНК	9 [#]	9 [#]

%; Процент от гените, експресиращи линейни РНК, които също експресират *circ*РНК при всяка възраст на синаптозомите

[#] Всеки ген експресира уникална *circ*РНК. Два от деветте гена във всяко възрастово разделяне експресират уникални *circ*РНК и в двете групи.

edgeR диференциален експресионен анализ на *circ*РНК, експресирани в синаптомалните фракции от млади и възрастни мишки, показва четири сигнификантни диференцирано експресирани (DE) кръгови транскрипта (**Табл. 4**), които бяха избрани за допълнително проучване чрез RT-qPCR количествено определяне. Тези четири *circ*РНК са експресирани от диацилглицерол киназата делта (*Dgkd*), хистоновата деактилаза 4 (*Hdac4*), тирозин-протеин фосфатаза не-рецептор тип 4 (*Ptpn4*) и roundabout homolog 2 (*Robo2*) гените. Освен това имаше 1 330 и 2 272 уникални *circ*РНК, експресирани само в младите и възрастните синаптозоми. *circ*РНК за инсулиноподобния растежен фактор 1 рецептор (*Igf1r*) (**Табл. 4**) от възрастните синаптозоми също беше избрана за количествено определяне с RT-qPCR.

Табл. 4. Списък на диференцирано експресираниите *circRNA* между млади и възрастни миши синаптозоми, потвърдени с RT-qPCR.

Gene	Gene Name	circRNA ID	CPM – young*	CPM – aged*	logFC	p-Value
<i>Dgkd</i>	Diacylglycerol kinase, delta	chr1:87880368–87881939	1.758	0.171	3.033	0.0204
<i>Ptpn4</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4	chr1:119773049–119783589	2.074	0.085	2.785	0.0321
<i>Hdac4</i>	Histone deacetylase 4, HD4	chr1:92148256–92148494	5.781	0.581	2.899	0.0448
<i>Robo2</i>	Roundabout homolog 2	chr16:74352551–74352877	0.879	0.053	2.411	0.0485
Uniquely expressed circRNA in aged synaptic division						
<i>Igf1r</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	chr7:68003810–68004355	—	1.106		

* CPM values presented here are averaged across all biological replicates.

Ние представихме резултати от изследването на кръговия транскриптом в синаптозоми, получени от кортекса на млади и на стари мишки. Анализът на данните доведе до идентифициране на четири DE *circRNA* между 2- и 23-месечна кортикална тъкан на мишки и един *circRNA* транскрипт, уникално изразен във възрастни синаптозоми. Уникалните синаптични кръгови транскриптоми съдържаха 1330 преписи в млади и 2272 преписи във възрастни синаптозоми. Това показва натрупване на кръгови транскрипти в застаряващия мозък.

Изобилието на идентифицираните *circRNA* говори за локализирана експресия в синаптичните пространства, което дава допълнителна подкрепа за хипотезата, че *circRNA* имат важна роля в синапсите.

Тъй като *circRNA* са силно устойчиви на екзонуклеазна активност, те са изключително благоприятстващи паметта, ученето и синаптичната пластичност, като всичко това са свойства, проявявани от изходните гени на *circRNA*, представени в това проучване. Тези свойства показват, че *circRNA* вероятно участват в тези функционални процеси в развитието на мозъка.

Ако ролята на *circRNA* е в съответствие с данните на Shigeoka et al. (2016), потенциалната роля на представените в нашето проучване *circRNA* в синаптомалните фракции, може да се предположи, че е експанзивно *circRNA*-протеин взаимодействие, като по този начин може да допринася за когнитивния спад, свързан със стареенето.

GO анализът на гените, експресиращи уникални *circRNA* при млади и възрастни синаптозоми, показва, че споделят някои GO категории, които до голяма степен са свързани с дендритното развитие и организация, синаптичната организация, секрецията на невротрансмитери и освобождаването на сигнали от

синапсите. Интересното е, че тези GO категории са значително обогатени в млади синаптозоми и по-малко обогатени във възрастни синаптозоми. Младите синаптозоми също така експресират гени, свързани с Ras- и GTPаза-опосредствана сигнална трансдукция, докато възрастните синаптозоми експресират гени, по-силно свързани с биологията на дендритите и невроните.

Броят на гените, наблюдавани в това проучване, които експресират кръгови и линейни транскрипти, 4,64% при млади мишки и 6,78% при възрастни мишки, е в съответствие с ниското ниво, докладвано за експресията на *circRNA* в свински кортекс, показващо, че в зависимост от етапа на развитие, 5,8% до 15,8% от експресираните гени едновременно произвеждат и *circRNA*. Също така, наблюдаван от нас брой гени, ко-експресиращи кръгови и линейни *RNA* изоформи, достигат едва 14,1%, което беше наблюдавано по-рано в човешкия мозък.

Освен това всички 16 гена, експресиращи само кръгови транскрипти, представени в това проучване, експресират нови *circRNA*. Интересното е, че повече от 60% от гените, експресиращи само *circRNA*, са протеин- кодиращи транскрипти, но тази стойност е малко по-ниска от отчетените 85% от циркулираните екзони, които се припокриват с протеин-кодиращи последователности. Афинитетът към коекспресията на кръгови транскрипти от протеин-кодиращи гени е важен по отношение на потенциалния транслационен капацитет на тези *circRNA*, за което се предполага, че е една от многото възможни функции на *circRNA*.

5.11. Ефект на третиране с олово върху секрецията на APP

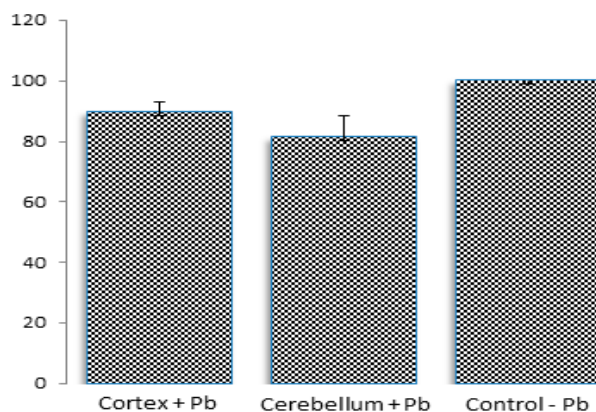
В мозъка на болели от АБ се наблюдава нарушаване на нивата на метални катиони, което се свързва с нарастващите с развитието на болестта загуба на когнитивни способности и невродегенерация. На това се основава т. нар. „Метална хипотеза за АБ“, според която запазването на металната хомеостаза е критично за невроналната функция и нейното нарушаване допринася за развитието на АБ.

Оловото отдавна е известно със своята токсичност за организма и в частност за мозъка. Има данни, че то инхибира транслацията на APP посредством заместване на желязните йони в регулирани от тях метаболитни пътища. От своя страна APP участва в баланса на нивата на вътреклетъчните желязни йони посредством регулиране на техния ефлукс, като се смята, че тази функция се изпълнява от секретирани APP форми.

Предизвиканото от оловото намаляване на нивото на APP, и така на регулирания от APP ефлукс на желязни йони, води до повишаване на вътреклетъчните нива на желязните йони и вследствие на това до образуване на ROS. Така оловото предизвиква пероксидация на мембранните липиди и в частност на митохондриалните мембрани. Това води до промяна в биологичния баланс в тези органи и впоследствие до клетъчна смърт. Този процес е наречен „ferroptosis”.

В литературата данните за директно повлияване на секрецията на APP от третиране с олово са оскъдни, което ни даде основание да проведем наши изследвания. Използвайки модела на Ivanova et al. (2016), проследихме влиянието на третиране с олово върху секрецията на APP в церебрални хемисфери, церебелум, преден мозък и заден мозък на мишки. Хомогенатите от тези области бяха разделени на мембранна фракция и фракция, съдържаща разтворими белтъци. APP беше доказан с имуноблот с моноклоналното антитяло 22C11. Като вътрешен контрол за нормализиране на резултатите използвахме актин.

Цифровото остойностяване на получените резултати е показано във **фигура 1X**. Вижда се, че третирането с олово намалява секрецията на APP в церебралните хемисфери с 10%, а в церебелума с 19%. В другите две изследвани области не се наблюдава сигнификантно повлияване на секрецията на APP след третирането с олово.



Фиг. 1X. Цифровото остойностяване на ефекта на третирането с олово (Pb) върху секрецията на APP в церебралните хемисфери и церебелума. Стойностите са изчислени като оптична плътност/ μg белтък и контролата е взета за 100%. Данните са усреднени от три експеримента.

В предишно наше изследване показахме, че се наблюдава значително по-висока експресия на APP в кортекс съдържащите структури (церебрални хемисфери

и церебелум) в сравнение с другите изследвани мозъчни области (Фиг. 2X). Това може да е обяснение за разликата в повлияването на секрецията на APP в изследваните области.



Фиг. 2X. Репрезентативна автордиограма на експресията на APP695 в сагитален срез на 90-дневен мозък на плъх. Фигурата е част от данните, представени в т. 4.9.2.

В мембранните фракции от посочените мозъчни области след третирането с олово не можахме да установим забележими разлики в съдържанието на APP.

Нашето изследване показва, че третирането с олово води до намаляване на секрецията на APP в церебралните хемисфери и церебелума. Имайки предвид съобщението на McCarthy et al. (2014), че секретиранияте форми на APP участват в хомеостазата на желязните йони, като регулират техния ефлуks, можем да предположим следния механизъм на токсичност – оловото намалява секрецията на APP, в резултат на което се увеличава вътреклетъчната концентрация на желязни йони, което може да доведе до значими нарушения на метаболитните процеси в клетката.

6. ИЗВОДИ

След обобщаване на получените резултати могат да се направят следните изводи:

1. Сравняването на методите за определяне на белтък по Lowry и Bradford показва, че методът на Bradford не дава надеждни резултати при определянето на белтъчното съдържание на тъканни фракции съдържащи мембранно-свързани белтъци. Този метод също така не е надежден при изследването на фракции, съхранявани при -20°C .
2. Невротрансмитерът глутамат повлиява метаболизма на амилоидния прекурсорен протеин (APP). Стимулирането на метаботропния глутаматен рецептор води до повишаване на секрецията на APP, докато стимулирането на AMPA рецептора намалява секрецията. Посредством противоположното въздействие на рецепторите глутамат може да модулира процесирането на APP и промяна в баланса може да е от значение при развитието на АБ.
3. Секретираният от мозъчни срезове APP няма обратна връзка със секрецията му. След секрецията APP претърпява допълнително Ca^{2+} -зависимо процесирание, което се извършва физиологично в мозъчната тъкан, най-вероятно от мембранно-асоциирани фактори. Тази физиологична протеолиза на секретирания APP може да е необходима за получаване на разградни продукти с различна биологична активност.
4. Васкуларният ендотелен растежен фактор участва в метаболизма на APP, като повлиява процесирането на APP и модулира активността на α - и β -секретазите, а с това и β -амилоидогенезата, поради което е потенциален участник в етиологията на АБ.
5. Интерлевкин- 1β инхибира предаваната чрез мускариновите ацетилхолинови рецептори сигнализация, с което може да участва в патогенните механизми, водещи до холинергичните дефицити, наблюдавани при АБ. Това най-вероятно се осъществява чрез нарушаване на активирането на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1.
6. Предизвиканата *in vivo* холинергична хипоактивност в кората на главния мозък посредством лезия на холинергичните неврони в базалните ядра на предния мозък на плъхове с имунотоксин 192IgG-сапорин води до намаляване на

секрецията на APP в кортекса, както и до намаляване на активността на ChAT, което е обратимо с присаждане на NGF. Получените за първи път *in vivo* резултати показват, че процесирането на APP в получаващите холинергична инервация кортикални неврони е под холинергична регулация.

7. *In vivo* имунолезия на холинергичните неврони в базалните ядра на предния мозък на трансгенни мишки (Tg2576) с наличие на амилоидна патология предизвиква засилване на амилоидна патология, както и проявата на други важни патологични белези на АБ, като в хипокампуса се наблюдава намалена холинергична инервация и активност на AChE, невродегенерация и атрофия, както и загуба на синапси.
8. Синаптозомите (синаптозомалната фракция) представляват подходящ модел за изследване на процесирането на APP, и в частност на невротрансмитерния контрол на неговото процесирание заради директния достъп на стимулиращите агенти и освобождаването на APP непосредствено в инкубационната среда, което изключва риска от допълнително процесирание в комплексната мозъчна тъкан.
9. Резултатите от изследването на промените на експресията на APP по време на онтогенезата показаха:
 - А) На ниво белтък – проследяването на съдържанието на APP в растежни конуси и синаптозоми по време на развитието дава основание да се приеме, че APP участва както в прорастването и намирането на пътя на невритите в ранните стадии на развитие, така и в синаптогенезата и в поддържането на нормалните синаптични функции.
 - Б) На ниво мРНК – по време на онтогенезата APP695 е тясно свързан с процесите на диференциране на нервните клетки не само в централната, но и в периферната нервна система, докато формите APP751 и APP770 са с много по-ниска експресия в мозъка, отколкото в периферните тъкани и органи.
 - В) Сравнението на експресията на APP в мозъка и в периферни тъкани дава основание да се заключи, че: експресията и процесирането на APP в мозъка има специфични за този орган характеристики; секрецията на APP е специфичен за мозъка/нервната тъкан процес; APP се експресира предимно в мозъка, където неговата концентрация е в пъти по-висока от тази в другите изследвани органи.

10. Амилоидният β -пептид влияе на електричната активност на невроналните клетки:

А) Биологично активният фрагмент от амилоидния β -пептид ($A\beta_{25-35}$) намалява бързо, концентрационно зависимо и обратимо електричната активност на невронални мрежи. От получените резултати може да се изведе хипотезата, че предизвиканото от $A\beta$ намаляване, до спиране, на електричната активност води до нарушаване на комуникацията между невроните и впоследствие до дегенерация на синапсите и е ключов елемент в патологията на АБ.

Б) Механизмът на действие на $A\beta$ не е посредством оксидативен стрес, който да предизвика чрез цитотоксичност общо, неспецифично повлияване на електричната активност на невроналните мрежи.

В) $A\beta$ най-вероятно действа като агонист на рецептори на инхибиторните невротрансмитери GABA-A и глицин. Това се потвърждава от голямото сходство на ефекта на диазепам върху електричната активност на невроналните мрежи.

Г) Ефектите на биологично активния фрагмент $A\beta_{25-35}$, както и на биологично представените форми $A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$, се различават по въздействието си върху електричната активност на невронални мрежи, като това може да се дължи на различни механизми на действие или на зависимост на ефекта от структурата им.

Д) $A\beta_{1-42}$ повлиява електричната активност на невроналните мрежи в мономерна форма, но не и в агрегирано състояние.

11. Във възрастните синаптозоми, в сравнение с младите, се транскрибират огромен брой нови дълги интервениращи некодиращи РНК. Това разкрива ново ниво на транскрипционно регулиране, което е повлияно при стареенето. Също така във възрастните синаптозоми се натрупват кръгови РНК. Тяхната експресия в синаптозомите се различава от тази в мозъчния хомогенат. Може да се предположи, че потенциалната им роля е в засилване на взаимодействието с протеини, като реакция на процесите на стареене.

12. Третирането с олово води до намаляване на секрецията на APP в церебралните хемисфери и церебелума на мишки, в резултат на което може да се стигне до увеличаване на вътреклетъчната концентрация на желязни йони и оттам до невротоксичност.

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

7.1. Справка за научните приноси

Оригинални приноси

1. Доказано беше, че амилоидният β -пептид ($A\beta$) повлиява бързо, концентрационно зависимо и обратимо електричната активност на невронални клетки. Различните изоформи на $A\beta$ ($A\beta$ 1-40, $A\beta$ 1-42) и биологично активният фрагмент $A\beta$ 25-35 имат разлика във въздействието. Ефектът не се дължи на оксидативен стрес, а се осъществява най-вероятно посредством активирането на инхибиторни рецептори (GABA-A и глицин). $A\beta$ 1-42 инхибира електричната активност на невроните в разтворимо, мономерно състояние, но не и във формата на високи олигомери.
2. Установено беше, че секретираният амилоиден прекурсорен протеин (sAPP) подлежи на допълнително, физиологично, Ca^{2+} -зависимо разграждане в мозъчната тъкан. Също така беше показано, че няма обратна връзка между sAPP и секрецията на APP, което е важно при различни модели на изследване.
3. За първи път беше показано, че васкуларният ендотелен растежен фактор може да повлиява метаболизма на APP, като модулира активността на α - и β -секретазите, а с това и амилоидогенезата.
4. Във връзка с хипотезата, че възпалителни процеси участват в етиологията на Алцхаймеровата болест (АБ), беше показано, че интерлевкин 1β може да повлиява холинергичната сигнална каскада и да допринася за холинергичните дефицити, наблюдавани при АБ. Това най-вероятно се осъществява чрез нарушаване на активирането на транскрипционните фактори NF κ B и AP-1.
5. С помощта на холинергичния имунотоксин сапорин бяха създадени модели с които за първи път *in vivo* беше доказана ролята на холинергичната инервация за процесирането APP. При единият модел бяха използвани плъхове и беше показано, че лезията на еферентни холинергични неврони в базалните ядра на предния мозък води до намаляване на секрецията на APP и на активността на AChE в кортекса, което е обратимо с присаждане на NGF. При другия модел бяха използвани трансгенни мишки (Tg2575) при които, освен засилена амилоидна патология, се наблюдаваше холинергична дисфункция, загуба на

синапси и тежка атрофия в хипокампуса, което прави този модел още по-добър за изследване на етиологията на АБ.

6. Бяха проведени изследвания на промените на експресията на APP в мозъчен хомогенат, изолирани растежни конуси и синаптозоми от ембрионални стадии на развитие до възрастно животно (плъх). В същите стадии на развитие беше изследвана експресията на мРНК изоформите APP695, APP751 и APP770. Резултатите потвърждават ролята на APP в синаптогенезата. Също така беше установено, че изоформата APP695 е с основна роля при диференцирането на нервните клетки не само в централната, но и в периферната нервна система.
7. Беше направено сравнително изследване на съдържанието на APP по време на онтогенезата в мозъка и периферни органи. Резултатите показват, че процесията на APP в мозъка има специфични за този орган характеристики и че съдържанието му в мозъка е в пъти по-голямо, отколкото в периферните органи.
8. С помощта на разработения метод за изследване на секрецията на APP от нативни мозъчни срезове (при условия, много по-близки до тези в интактната мозъчна тъкан, в сравнение с модела на клетъчни култури) бяха получени оригинални резултати за стимулиране на секрецията на APP от невротрансмитера глутамат и за модулиращата роля на различните субтипове глутаматни рецептори.
9. За първи път беше направено сравнително изследване на транскриптома в синаптомална фракция от млади и възрастни мишки и бяха установени множество неописани дълги интервениращи некодирани РНК при възрастните синаптозоми. В допълнително изследване беше установено, че във възрастните синаптозоми се натрупват кръгови РНК, а също така че кръговите РНК показват различен модел на експресия в синаптомите в сравнение с мозъчния хомогенат. Тези резултати дават широко поле за изследване на значението на това транскрипционно регулиране.
10. Бяха получени оригинални резултати за влиянието на олово върху секрецията на APP и беше формулирана хипотеза за механизма на токсичния ефект на оловото върху нервните клетки.

Научно-приложни приноси

1. Беше извършено задълбочено сравнение на най-използваните методи за определяне на белтък – на Lowry и на Bradford. Беше доказано, че методът на Bradford не дава коректни резултати при изследване на фракции обогатени с биологични мембрани. Установено беше, че при съхраняване на мембранни фракции при -20°C те променят свойствата си и постепенно губят способността да образуват цветния продукт използван при метода на Bradford.
2. Беше предложен модел за изследване на процесирането на APP с използването на синаптозоми (синаптозомална фракция). Този модел е особено подходящ за изследване на ролята на различни невротрансмитери и техните рецептори.

7.2. Публикации по темата на дисертационния труд

1. Bürger S., Noack M., Kirazov L.P., Kirazov E.P., Naydenov C.L., Kouznetsova E., Yafai Y., Schliebs R. (2009) Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and beta-amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(6), 517-523.
2. Chen B.J., Ueberham U., Mills J.D., Kirazov L., Kirazov E., Knobloch M., Bochmann J., Jendrek R., Takenaka K., Bliim N., Arendt T., Janitz M. (2017a) RNA sequencing reveals pronounced changes in the noncoding transcriptome of aging synaptosomes. *Neurobiol. Aging* 56, 67-77.
3. Curry-Hyde A., Ueberham U., Chen B.J., Zipfel I., Mills J.D., Bochmann J., Jendrek R., Takenaka K., Kirazov L., Kirazov E., Junger J., Brueckner M.K., Arendt T., Janitz M. (2020a) Analysis of the circular transcriptome in the synaptosomes of aged mice. *Neuroscience* 449, 202-213.
4. Gil-Bea F.J., Gerenu G., Aisa B., Kirazov L.P., Schliebs R., Ramírez M.J. (2012) Cholinergic denervation exacerbates amyloid pathology and induces hippocampal atrophy in Tg2576 mice. *Neurobiol. Dis.* 48(3), 439-446.
5. Kirazov L., Venkov L., Kirazov E. (1991a) A reassessment of the Lowry protein assay. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 44(4), 105-108.
6. Kirazov L., Venkov L., Kirazov E. (1991b) The applicability of the Bradford protein assay for protein estimation of rat brain fractions. *Rend. Acad. Bulg. Sci.* 44(5), 55-58.
7. Kirazov L., Venkov L., Kirazov E. (1993) Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. *Anal. Biochem.* 208, 44-48.
8. Kirazov L., Löffler T., Schliebs R., Bigl V. (1997) Glutamate-stimulated secretion of amyloid precursor protein from cortical rat brain slices. *Neurochem. Int.* 1997 (6), 557-563.

9. Kirazov L., Schliebs R., Bigl V. (1999a) Influence of protease inhibitors on the secretion and the proteolytic processing of amyloid precursor protein. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 52(1-2), 121-124.
10. Kirazov L., Schliebs R., Bigl V. (1999b) Secretory amyloid precursor protein undergoes membrane-associated proteolysis controlled by extracellular calcium ions. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 52(9-10), 111-114.
11. Kirazov L., Schliebs R., Bigl V. (1999c) Glutamate stimulates the secretion of the amyloid precursor protein: I. Is there a feedback effect of the secreted forms on the secretion? *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 52(7-8), 115-118.
12. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Schliebs R., Bigl. (2000a) Synaptosomes as a model system for studies on the secretion of the amyloid precursor protein. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 53(8), 99-102.
13. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Bigl V., Schliebs R. (2000b) Ontogenetic changes of APP in homogenates, growth cones and synaptosomes from developing rat brain. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 53(9), 97-100.
14. Kirazov E., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Schliebs R., Bigl. (2001a) Stimulation of protein C increases the secretion of the amyloid precursor protein from synaptosomes. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 54(4), 109-111.
15. Kirazov E., Kirazov L., Bigl V., Schliebs R. (2001b) Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19(3), 287-296.
16. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2002a) The amyloidogenic A β -peptide affects the electric activity of neuronal cells. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 55(4), 103-108.
17. Kirazov E., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2002b) Studies on the effects of the amyloidogenic A β -peptide on the electrical activity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Acta Morphol. Anthropol.* 7, 9-16.
18. Kirazov E., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2002c) Effects of the soluble amyloidogenic A β 25-35-peptide and of inhibitory receptor antagonists on the electrical activity of cultured neuronal networks. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 55(12), 87-90.
19. Kirazov E., Inchowska M., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2002d) Differential effects of the soluble amyloidogenic A β 25-35 peptide and an oxidative stress inducing agent (Fe²⁺) on the electrical activity of cultured neuronal networks. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 55(12), 91-94.
20. Kirazov E., Inchowska M., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2004a) Comparative studies on the cytotoxicity of the soluble amyloidogenic peptide fragment A β 25-35 and oxidative stress-inducing agents (Fe²⁺ and H₂O₂). *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 57(10), 75-80.
21. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Naydenov C., Stuewe S., Weiss D.G. (2004b) Comparison of the effect of different forms of the amyloidogenic β peptide on the electrical activity of cultured neuronal networks. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.* 57(5), 91-96.
22. Kirazov L., Kirazov E., Schliebs R. (2005a) L-Glutamate and phorbol ester stimulate the release of secretory amyloid precursor protein from rat cortical synaptosomes. *Acta Biol. Hung.* 56(3-4), 177-183.

23. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Stuewe S., Weiss D.G. (2005b) Different forms of the amyloid β peptide affect differentially the electrical activity of cultured neuronal networks. *Acta Morphol. Anthropol.* 10, 20-23.
24. Kirazov E., Kirazov L., Schroeder O., Gramowski A., Vassileva E., Naydenov C., Weiss D.G. (2008) Amyloid beta peptides exhibit functional neurotoxicity to cortical network cultures. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 61(7), 905-910.
25. Kirazov L., Naydenov C., Kouznetsova E., Schliebs R. (2009) Effect of vascular endothelial growth factor on processing of amyloid precursor protein in primary astrocytic cell cultures derived from transgenic Tg2576 mice. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 62(9), 1125-1130.
26. Kirazov L., Kirazov E., Gramowski A., Juegelt K., Schroeder O., Naydenov C., Vassileva E., Weiss D.G. (2010) Amyloid beta 1-42 monomers but not high oligomers induce an inhibition of electrical activity of cultured neuronal network. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 63(7), 1023-1028.
27. Kirazov L., Kirazov E., Naydenov C., Mitev V. (2015) Model systems and approaches to the study of the metabolism of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Acta Morphol. Anthropol.* 21, 55-61.
28. Kirazov L., Kirazov E. (2019) Study of amyloid precursor protein developmental changes in homogenate, membrane und soluble fractions derived from rat brain, skeletal muscle, kidney and liver. *Acta Morphol. Anthropol.* 26(1-2), 25-29.
29. Kirazov L., Kirazov E., Gluhcheva, Y. (2020) Influence of lead on the secretion of amyloid precursor protein in mouse brain. *Acta Morphol. Anthropol.* 27(3-4), 30-34.
30. Rossner S., Ueberham U., Yu J., Kirazov L., Schliebs R., Perez-Polo J.R., Bigl V. (1997) In vivo regulation of amyloid precursor protein secretion in rat neocortex by cholinergic activity. *Eur. J. Neurosci.* 9(10), 2125-2134.
31. Schliebs R., Heidel K., Apelt J., Gniezdzinska M., Kirazov L., Szutowicz A. (2006) Interaction of interleukin-1 β with muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling cascade in cholinergically differentiated SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 1122(1), 78-85.

7.3. Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. Kirazov L., Vassileva E., Venkov L., Kirazov E. Estimation of protein - Lowry versus Bradford assay. Abstracts 9th Balkan Biochemical and Biophysical Days, Thessaloniki, Greece, May 21-23, 1992.
2. Kirazov E., Vassileva E., Kirazov L., Venkov L. Estimation of the protein content of brain subcellular fractions. Balkan Biochemical Biophysical Days, Varna, Bulgaria, May 22-25, 1994.
3. Kirazov L. Transmitter-stimulierte Freisetzung von APP-Derivaten aus nativen Hirnschnitten. Alzheimer Verbundtreffen, Leipzig, BRD, Januar 16-17, 1995 (oral presentation)
4. Kirazov L., Loeffler T., Schliebs R., Bigl V. Glutamate-stimulated release of amyloid precursor protein derivatives from cortical rat brain slices. Herbsttagung (Fall Meeting) der Gesellschaft fuer Biologische Chemie, Hannover, BRD, September 11-13, 1995. Poster and Abstract. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376 (1995), Suppl., S115.
5. Kirazov L. Pharmakologische Untersuchung zur APP-Prozessierung am Hirnschnitt und an primaeren Zellkultursystemen. Alzheimer Verbundtreffen, Heidelberg, BRD, Dezember 4, 1995. (oral presentation)
6. Kirazov L., Schliebs R., Bigl V. Receptor-mediated release of secretory forms of amyloid precursor protein from cortical rat brain slices. 1. Kongress der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Berlin, BRD, Februar 24-27, 1996.

7. Kirazov L. Regulation der APP-Prozessierung durch glutamaterge Mechanismen am nativen Hirnschnitt. Alzheimer Verbundtreffen, Berlin, BRD, Juni 13, 1996 (oral presentation).
8. Kirazov L., Loeffler T., Schliebs R., Bigl V. Glutamate-stimulated secretion of amyloid precursor protein from cortical rat brain slices. Herbsttagung der Studiengruppe "Neurochemie", Leipzig, BRD, September 14-15, 1996.
9. Kirazov L., Loeffler T., Schliebs R., Bigl V. Glutamate-stimulated secretion of amyloid precursor protein from cortical rat brain slices. Herbsttagung der Gesellschaft fuer Biochemie und Molekularbiologie, Leipzig, BRD, September 16-18, 1996. Poster and Abstract. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377, 1996, Suppl., S181.
10. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Schliebs R., Bigl V. Calcium dependent membrane-associated proteolysis of the secretory amyloid precursor protein. Internat. Symp. Anat. Clin., Varna, Bularia, September 11-14, 1997.
11. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Schliebs R., Bigl V. Identification and developmental changes of amyloid precursor protein in growth cones and synaptosomes. Internat. Symp. Anat. Clin., Varna, Bulgaria, September 11-14, 1997.
12. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Schliebs R., Bigl V. Synaptosomes as a model system for studies on the secretion of the amyloid precursor protein. Nat. Congr. Histol. Embryol., Pleven, Bulgaria, September 17-19, 1999, p. 67.
13. Kirazov L., Kirazov E., Venkov L., Vassileva E., Schliebs R., Bigl V. Ontogenetic changes of the amyloid precursor protein in homogenates, growth cones and synaptosomes from developing rat brain. Nat. Congr. Histol. Embryol., Pleven, Bulgaria, September 17-19, 1999, p. 68.
14. Kirazov E., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Schliebs R., Bigl V. Studies on the prenatal ontogeny of isoforms of amyloid precursor protein in rat nervous system by *in situ* hybridization. Nat. Congr. Histol. Embryol., Pleven, Bulgaria, September 17-19, 1999, p. 69.
15. Kirazov E., Kirazov L. Untersuchung des Amyloidprecursor-Proteins und dessen Entwicklungsmuster im Hirngewebe. Kolloquium des Instituts fur Zellbiologie und Biosystemtechnik, Rostock, BR Deutschland, May 6, 2000, (invited speaker).
16. Kirazov E., Kirazov L., Bigl V., Schliebs R. Prenatal changes of amyloid precursor protein isoforms in whole rat embryos studied by *in situ* hybridization. 13th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN), Heidelberg, Germany, July 28 – August 1, 2000.
17. Kirazov E., Kirazov L., Bigl V., Schliebs R. Developmental regulation of amyloid precursor protein expression in growth cones and synaptosomes. 13th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN), 2000, July 28 – August 1, Heidelberg, Germany.
18. Kirazov E., Kirazov L., Stueve S., Weiss D. The amyloidogenic A- β -peptide affects the electric activity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays. XVth National Congress of The Bulgarian Anatomical Society, Stara Zagora, Bulgaria, Jun 1-3, 2001.
19. Kirazov E., Kirazov L., Vassileva E., Venkov L., Bigl V., Schliebs R. Changes of amyloid precursor protein (APP) level and expression of APP mRNA isoforms during development, Three Meetings on Intra-Neuronal Transport and Communication, First Meeting, Rostock-Warnemuende, Germany, May 2-5, 2002.
20. Kirazov L., Kirazov E., Vassileva E., Venkov L., Bigl V., Schliebs R. Studies on the secretion of the amyloid precursor protein employing different model systems, Three Meetings on Intra-Neuronal Transport and Communication, First Meeting, Rostock-Warnemuende, Germany, May 2-5, 2002.

21. Gniezdzińska M., Kirazov L., Szutowicz A., Schliebs R. Interaction of Interleukin-1 β with muscarinic acetylcholine receptor-stimulated signaling cascade in cell culture. 2. Biotechnologie-Tag an der Universität Leipzig, Leipzig, Germany, May 21, 2003. *J. Neurochem.* 87, 2003, 96.
22. Gniezdzińska M., Schliebs R., Kirazov L., Szutowicz A. Interaction of interleukin-1 β with muscarinic acetylcholine receptor-stimulated signaling cascade in cell culture. International conference of study group GBM neurochemistry, Dresden, Germany, September 19-20, 2003, p. 13.
23. Кирацов Л., Кирацов Е., Венков Л., Василева Е., Щюве С., Вайс Д. Влияние на алцхаймеровия амилоиден β пептид върху електричната активност на невронални мрежи. V-та Национална Конференция по Антропология с международно участие (Доклад). Копривщица, България, юни 4-6, 2004.
24. Kirazov E., Kirazov L., Stuewe S., Weiss D.G. The electrical activity of neuronal networks is affected by the amyloidogenic A β -peptide. Scientific reunion of the special program of the Alexander von Humboldt Foundation "Sustainability for humanity & environment in the extended connection field science – economy – policy". (S. Ionel ed.). Editura Politehnica, Timisoara, Rumania, February 24-25, 2005.
25. Kirazov E., Inchevska M., Kirazov L., Venkov L., Vassileva E., Stueve S., Weiss D.G. The Alzheimer's amyloid β peptide and oxidative stress inducing agents affect differentially the electrical activity and cell viability of cultured neuronal networks. III national congress of the Bulgarian Society for Neuroscience. Sofia, Bulgaria, June 3-4, 2005, 17.
26. Kirazov E., Inchevska M., Kirazov L., Weiss D.G. Differential effects of the amyloid β peptide and oxidative stress-inducing agents on the electrical activity, redox potential and viability of cultured neuronal networks. International conference of study group neurochemistry Gesellschaft fur Biochemie und Molekularbiologie. Leipzig, Germany, Oktober 6-8, 2005.
27. Kirazov L., Kirazov E., Weiss D.G. The amyloid β peptides A β 1-40 and A β 1-42 and the biologically active fragment A β 25-35 affect distinctively the electrical activity of cultured neuronal networks. International conference of study group neurochemistry Gesellschaft fur Biochemie und Molekularbiologie. Leipzig, Germany, Oktober 6-8, 2005.
28. Gniezdzińska M., Kirazov L., Kirazov E., Szutowicz A., Schliebs R. The muscarinic cholinergic receptor-stimulated signal transduction cascade is affected by Interleukin-1 β . 6th National anthropological conference and 2nd koprivshitsa morphological days. Koprivshitsa, Bulgaria, June 2-4, 2006.
29. Gil-Bea F.J., Schliebs R., Kirazov L., Del Rio J., Ramírez M.J. Basal forebrain cholinergic immunolesion in Tg2576 mice affects beta-amyloidogenesis and cognitive function. 10th International conference on Alzheimer's disease and related disorders (ICAD). Madrid, Spain, July 15-20, 2006, P1-078. *Alzheimer's and Dementia*, Vol. 2, Issue 3, Suppl. 1, July 2006, S117-S118.
30. Kirazov E., Kirazov L., Schroeder O.H.-U., Gramowski A., Weiss D.G. Functional neurotoxicity of amyloid beta peptides in cortical network cultures. International Conference, Molecular pathways in health and disease of nervous system, Gesellschaft fuer Biochemie und Molekularbiologie, Study Group Neurochemistry, Hamburg, Germany, September 14-15, 2007, P 11.
31. Schroeder O., Kirazov E., Kirazov L., Gramowski A., Weiss D. Assessment of functional neurotoxicity of amyloid beta peptides in cortical network cultures with

- MEA-neurochips, Proceedings of the 19th Polish Peptide Symposium, Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Warsaw, Poland, September 23-27, 2007, p. 116.
32. Schliebs R., Noack M., Kirazov L., Kirazov E., Kouznetsova E. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on processing of amyloid precursor protein in brain slice and astrocytic cultures derived from transgenic Tg2576 mice. 6th FENS-Forum of European Neuroscience. Geneva, Switzerland, July 12-16, 2008, C-17.
 33. Kirazov L., Kirazov E., Schroeder O.H.-U., Gramowski A., Weiss D.G. Alzheimer's disease related amyloid beta peptides exhibit functional neurotoxicity in cortical network cultures. IIIrd Koprivshitsa Morphological Days/VIIth National Conference of Anthropology, Koprivshitsa, Bulgaria, May 30 – June 1, 2008, I-21.
 34. Kirazov L., Kirazov E., Noack M., Kouznetsova E., Schliebs R. Vascular endothelial growth factor affects the processing of amyloid precursor protein in brain slice and astrocytic cultures derived from transgenic Tg2576 mice. IVth National Congress, Bulgarian Society for Neuroscience, Sofia, Bulgaria, October 26-27, 2008, P 33.
 35. Bürger S., Noack M., Kirazov L., Kirazov E., Kouznetsova E., Schliebs R. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on processing of amyloid precursor protein in brain slices and primary cultures derived from transgenic Tg2576 mice. 7th Leipzig Research Festival for Life Sciences, Dezember 12., 2008. Abstract in: 7th Leipzig Research Festival for Life Sciences Abstract Book (J. Thiery, A. Beck-Sicking, T. Arendt, Hrsg.), Leipzig (ISBN-Nr. 3-9810760-4-4), 2008, S. 11.
 36. Bürger S., Noack M., Kouznetsova E., Yafai Y., Kirazov L., Kirazov E., Schliebs R. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and beta-amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. Saxon Biotechnology Symposium, May 26, 2009, in Leipzig. Abstract in: Saxon Biotechnology Symposium 2009, Abstracts book (Eds. A.A. Robitzki, M. Blessing, T. Züchner, M. Brand, F. Stewart, A. Beyer, E. Schäffer), Leipzig 2009 (ISBN-Nr. 978-3-00-027884-6), 2009, p. 201.
 37. Bürger S., Noack M., Kouznetsova E., Yafai Y., Kirazov L., Kirazov E., Schliebs R. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and β -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. 18th European Society for Neurochemistry (ESN), 4th Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders, Leipzig, July 11-14, 2009. Abstract in: J. Neurochem. 110, Suppl. 1, 2009, pp. 40-41.
 38. Bürger S., Noack M., Kirazov L.P., Kirazov E.P., Naydenov C.L., Kouznetsova E., Yafai Y., Schliebs R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and β -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. Poster. COST Action B30 "Neural Regeneration and Plasticity", 7th Working Meeting, October 24-25, 2009, Larnaca (Cyprus).
 39. Schliebs R., Bürger S., Noack M., Kouznetsova E., Yafai Y., Kirazov L., Kirazov E., Naydenov C.L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and β -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. Poster. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SfN), October 17-21, Chicago. Abstract Viewer 2009 of the SfN. Poster no. 427.15.
 40. Bürger S., Yafai Y., Bigl M., Kirazov L.P., Kirazov E.P., Kouznetsova E., Wiedemann P., Schliebs R. VEGF differentially affects processing of amyloid precursor protein in primary neurons and astrocytic cells derived from transgenic Tg2576 mouse brain tissue. Poster. COST Action B30 "Neural Regeneration and

Plasticity”, 9th Working Groups and Management Meeting, June 17-19, 2010, Carmona (Spain).

41. Bürger S., Yafai Y., Bigl M., Kirazov L., Kirazov E., Kouznetsova E., Wiedemann P., Schliebs R. VEGF differentially affects processing of amyloid precursor protein in primary neurons, and astrocytic cells derived from transgenic Tg2576 mouse brain tissue. Mai 07, FENS Forum 2010 Amsterdam, FENS Abstr., vol.5, 078.13, 2010.
42. Schliebs R., Bürger S., Günter K., Bigl M., Kirazov L., Kirazov E., Kouznetsova E., Yafai Y. Does VEGF play a role in processing of amyloid precursor protein in the neuro-glia-vascular unit? 40th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, November 13-17, 2010.
43. Kirazov L., Kirazov E., Kadiysky D., Vassileva E., Petrova E. The amyloid β peptide affects the electrical activity of neuronal cells. Experimental Models and Methods in Biomedical Research, Sofia, Bulgaria, May 16-18, 2011.
44. Schliebs R., Bürger S., Günter K., Bigl M., Kirazov L., Kirazov E., Kouznetsova E., Yafai Y. VEGF and its role in processing of amyloid precursor protein in the neuro-glia-vascular unit. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy July, 14-18, 2011.
45. Kirazov E., Kirazov L. The application of neuronal networks to study the toxicological effects of different compounds. Science without borders: Alexander von Humboldt's concepts in today's world. Varna, Bulgaria, September 18-21, 2019.

7.4. Наукометрични показатели

Общ импакт фактор на публикациите по дисертацията – 30,23

Цитирания на публикациите по дисертацията отбелязани в Scopus – 257

Намерени цитирания на публикациите по дисертацията в публикации, дисертации в чужбина, книги и патенти – 425

SUMMARY
BIOCHEMICAL BASIS OF ALZHEIMER'S DISEASE
Ludmil Kirazov

Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

The aim of the presented work was to contribute to the elucidation of the etiology of Alzheimer's disease and to create experimental models to help with this endeavor. The approach and the tasks we set to achieve this goal were determined according to the results achieved, which gave us guidance for further research. A huge role in determining the upcoming tasks was the information on the progress of research in this area received from publications in specialized publications. Also crucial for choice and preparation of the next study was the development of scientific techniques and our access to them.

The main results are listed below as conclusions:

1. A comparison of Lowry and Bradford protein determination methods showed that the Bradford method did not give reliable results in determining the protein content of tissue fractions containing membrane-bound proteins. This method is also not reliable in the study of fractions stored at -20°C .
2. The neurotransmitter glutamate affects the metabolism of amyloid precursor protein (APP). Stimulation of the metabotropic glutamate receptor leads to an increase in APP secretion, while stimulation of the AMPA receptor decreases secretion. By counteracting receptors, glutamate may modulate APP processing and a change in balance may be important in the development of Alzheimer's disease (AD).
3. The APP secreted by brain sections has no feedback with its secretion. Following secretion, APP undergoes additional Ca^{2+} -dependent processing, which takes place physiologically in brain tissue, most likely by membrane-associated factors. This physiological proteolysis of secreted APP may be required to produce degradation products with different biological activity.
4. Vascular endothelial growth factor is involved in APP metabolism by influencing APP processing and modulating the activity of α - and β -secretases, and thus β -amyloidogenesis, and is therefore a potential participant in the etiology of AD.
5. Interleukin- 1β inhibits the signaling transmitted by muscarinic acetylcholine receptors, which may be involved in the pathogenic mechanisms leading to cholinergic

deficiencies observed in AD. This is most likely due to impaired activation of the transcription factors NF κ B and AP-1.

6. Induced *in vivo* cholinergic hypoactivity in the cerebral cortex by lesion of cholinergic neurons in the basal nuclei of the forebrain of wild-type mice with immunotoxin 192IgG-saporin leads to a decrease in APP secretion in the cortex and a decrease in ChAT activity, which is reversible by NGF grafting. These first *in vivo* results indicate that APP processing in cortical neurons receiving cholinergic innervation is under cholinergic regulation.
7. *In vivo* immunolesion of cholinergic neurons in the basal nuclei of the forebrain of transgenic mice (Tg2576) with a presence of amyloid pathology causes an increase in amyloid pathology, as well as the manifestation of other important pathological signs of AD. Reduced cholinergic innervation and AChE activity, neurodegeneration and atrophy, and loss of synapses were observed in the hippocampus.
8. Synaptosomes (synaptosomal fraction) are a suitable model for studying the processing of APP, and in particular the neurotransmitter control of its processing due to the direct access of stimulatory agents and the release of APP directly into the incubation environment, which eliminates the risk of further processing in the complex brain tissue.
9. The results of the study of changes in APP expression during ontogenesis showed that:
 - a) at the protein level - tracking the content of APP in growth cones and synaptosomes during development gives grounds to assume that APP is involved in the germination and pathfinding of neuritis in the early stages of development, as well as in synaptogenesis and maintenance of normal synaptic functions;
 - b) at the mRNA level - during ontogenesis, APP695 is closely related to the processes of differentiation of nerve cells not only in the central but also in the peripheral nervous system, while the forms APP751 and APP770 are much lower expressed in the brain than in peripheral tissues and organs;
 - c) the comparison of the expression of APP in the brain and in peripheral tissues gives grounds to conclude that: the expression and processing of APP in the brain has specific characteristics for this organ; APP secretion is a brain/nerve tissue specific process; APP is expressed mainly in the brain, where its concentration is many times higher than in other studied organs.

10. The amyloid β -peptide affects the electrical activity of neuronal cells:
- a) the biologically active fragment of the amyloid β -peptide ($A\beta_{25-35}$) decreases the electrical activity of neural networks rapidly, concentration-dependently and reversibly. From the obtained results it can be concluded that the reduction caused by $A\beta$, to stop, of the electrical activity leads to disruption of communication between neurons and subsequently to degeneration of synapses and is a key element in the pathology of AD;
 - b) the mechanism of action of $A\beta$ is not through oxidative stress, which acts through cytotoxicity and causes a general, nonspecific effect on the electrical activity of neural networks;
 - c) $A\beta$ most likely acts as a receptor agonist for the inhibitory neurotransmitters GABA-A and glycine. This is confirmed by the great similarity with the effect of diazepam on the electrical activity of neural networks;
 - d) the effects of the biologically active fragment $A\beta_{25-35}$, as well as of the biologically represented forms $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$, differ in their effect on the electrical activity of neural networks, and this may be due to different mechanisms of action or depending on the effect of their structure;
 - e) $A\beta_{1-42}$ affects the electrical activity of neural networks in monomeric form, but not in aggregate state.
11. In adult synaptosomes, compared to young ones, a huge number of new long intervening non-coding RNAs are transcribed. This reveals a new level of transcriptional regulation that is affected by ageing. Circular RNAs also accumulate in adult synaptosomes. Their expression in synaptosomes differs from that in brain homogenate. It can be assumed that their potential role is to enhance the interaction with proteins in response to the ageing processes.
12. Lead treatment reduces the secretion of APP in the cerebral hemispheres and the cerebellum of mice, which can lead to an increase in the intracellular concentration of iron ions and hence to neurotoxicity.

Най-сърдечна благодарност

на ръководството на ИЕМПАМ-БАН в лицето на проф. Светлозара Петкова, проф. Димитър Кадийски и проф. Нина Атанасова за пълната подкрепа при разработването и оформянето на дисертационния труд;

на тримата рецензенти: проф. Димитър Кадийски, проф. Николай Лазаров и проф. Румяна Миронова, както и на цялото научно жури (проф. Светлозара Петкова, проф. Машенка Димитрова, проф. Стефан Панайотов, доцент Ивайло Иванов) за ценните препоръки и положителната оценка на труда;

на колегите от ИЕМПАМ-БАН помогнали при оформянето на този труд;

на колегите от „Паул Флексиг“ Институт за изследване на мозъка, Лайпциг, в колаборация с които беше извършена голяма част от експерименталната работа;

специална благодарност на съпругата ми Мария и членовете на моето семейство за стимулирането за разработване на дисертационния труд и разбирането и подкрепата по време на неговото оформяне.