БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 6, с. 831 – 844

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА β-АМИЛОИДА И ЭКСПРЕССИЮ АМИЛОИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 Е. Бабусикова[1], Д. Доброта[1], Э.Дж. Тернер[2], Н.Н. Наливаева[2,3]*

[1] *Университет Коменского в Братиславе, медицинский факультет Ессениуса в Мартине, отдел медицинской биохимии, 036 01 Мартин, Словакия*

[2] *Школа биомедицинских наук факультета биологических наук Университета Лидс, LS2 9JT Лидс, Великобритания*

[3] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk*

Поступила в редакцию 08.02.2021
После доработки 20.04.2021
Принята к публикации 20.04.2021

Заболеваемость болезнью Альцгеймера (БА) значительно увеличивается из-за хронического стресса и ишемии мозга, которые с годами вызывают накопление токсичных видов амилоидного пептида и повреждение головного мозга. Изучено влияние глобальной 15-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии на уровни экспрессии белка-предшественника β-амилоида (APP) и его процессинга в коре головного мозга (Cx) самцов крыс линии Wistar. Также проведена оценка уровней экспрессии амилоид-деградирующих ферментов: неприлизина (NEP), эндотелин-превращающего фермента-1 (ECE-1) и инсулин-деградирующего фермента (IDE), а также некоторых маркёров окислительного повреждения. Полученные нами результаты свидетельствуют, что уровнь мРНК и белка APP в Cx значительно повышается после ишемического инсульта. Уровни растворимых фрагментов APP (особенно sAPPβ, продуцируемого β-секретазой (BACE1)), мРНК и белка BACE1 также были увеличены после ишемии. Через 120 мин реперфузии уровни белков APP и BACE1 в Cx возвращались к контрольным значениям. Уровни мРНК NEP и ECE-1 также были снижены после ишемии, что коррелировало со снижением содержания этих ферментов. Однако мы не наблюдали никаких изменений в содержании инсулин-деградирующего фермента. Маркёры окислительного повреждения (дитирозина и конъюгатов лизина с продуктами перекисного окисления липидов) также были повышены после ишемии. Полученные данные позволяют предположить, что ишемия смещает процессинг APP в сторону амилоидогенного β-секретазного пути и накопления нейротоксичного пептида Aβ, а также запускает окислительный стресс в клетках. Данные результаты обсуждаются в контексте роли стресса и ишемии в инициации и прогрессировании БА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Альцгеймера, белок-предшественник β-амилоида, β-секретаза, эндотелин-превращающий фермент-1, глобальная ишемия головного мозга, инсулин-деградирующий фермент, неприлизин, стресс.

DOI: 10.31857/S0320972521060063

ВВЕДЕНИЕ

Спорадическая или старческая форма болезни Альцгеймера (БА) – одно из самых тяжёлых неврологических расстройств людей пожилого возраста. Патофизиология БА имеет сложный многофакторный характер, и её основные причины все ещё плохо изучены. Однако накопленные клинические и экспериментальные данные позволяют полагать, что стресс на протяжении всей жизни играет важную роль в развитии БА [1, 2], увеличивая риск ишемии мозга и инсульта [3], что, в свою очередь, увеличивает частоту заболеваемости БА [4, 5]. Одной из основных причин возникновения нейродегенерации, вызванной ишемией, является повышенная экспрессия генов, связанных с патогенезом БА [6, 7]. Хронический стресс также может способствовать патогенезу БА, влияя на функ-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; Aβ – β-амилоидный пептид; APP – белок-предшественник амилоида; BACE1 – β-секретаза, Cx – кора головного мозга; ECE-1 – эндотелин-превращающий фермент-1; IDE – инсулин-деградирующий фермент; NEP – неприлизин.

* Адресат для корреспонденции.

циональный статус глиальных клеток головного мозга и приводя к дефициту клиренса амилоида [8]. С другой стороны, раннее нарушение регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси также часто встречается у пациентов с БА, что приводит к нарушению метаболизма глюкокортикоидов. Эти стероидные гормоны могут легко проникать в мозг и вызывать эксайтотоксичность в лимбических структурах (префронтальная кора и гиппокамп), которые поражаются на ранних стадиях БА [9–12].

Патология головного мозга при БА характеризуется образованием двух основных белковых кластеров: внеклеточных отложений β-амилоидного пептида (Aβ) и внутриклеточных агрегатов гиперфосфорилированного тау, которые накапливаются в головном мозге пациентов с БА, особенно в гиппокампе, амигдале и лобной коре [13]. Хотя гипотеза «амилоидного каскада» БА [14] подвергалась критике из-за неудач в разработке успешного лечения, основанного на её главных постулатах, она по-прежнему остаётся основным направлением исследований патологии БА [15]. Гипотеза «амилоидного каскада» предполагает, что образование Aβ из белка-предшественника β-амилоида (APP) является начальной стадией событий, ведущих при определённых патологических условиях к накоплению токсичных агрегатов Aβ, которые вызывают гибель нейрональных клеток и другие нейропатологические процессы в головном мозге [16–17]. Формирование сенильных бляшек, в которых Aβ часто находится в комплексе с другими белками, некоторые авторы рассматривают, как попытку удалить токсичные амилоидные формы из нейрональных клеток, хотя ги-

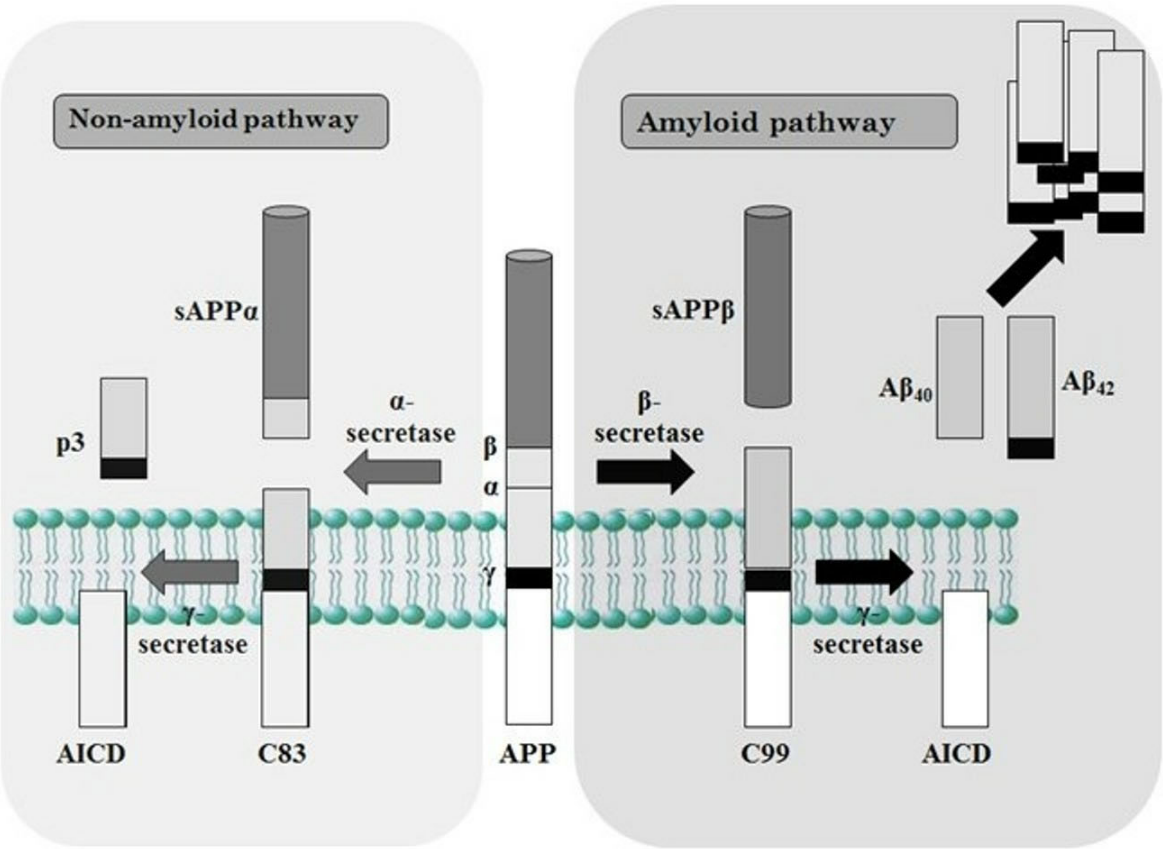

Рис. 1. Процессинг белка-предшественника β-амилоида (APP). Неамилоидогенный путь процессинга APP начинается с его расщепления α-секретазой с образованием нейропротекторного растворимого *N*-концевого фрагмента sAPPα и мембраносвязанного фрагмента C83, который далее расщепляется комплексом γ-секретазы, продуцирующим небольшой пептид (p3) и внутриклеточный домен APP (AICD). Амилоидогенный путь начинается с расщепления APP β-секретазой с образованием нейропротекторного растворимого *N*-концевого фрагмента sAPPβ и мембраносвязанного фрагмента C99, который также расщепляется γ-секретазой, образуя Aβ-пептиды различной длины (в основном Aβ40, но также более токсичный Aβ42) и AICD. Aβ-Пептиды образуют токсичные олигомеры, а затем сенильные бляшки, связываемые с патогенезом БА. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

бель клеток наблюдается также и вблизи самих бляшек [18, 19].

Образование Aβ из APP происходит через амилоидогенный путь процессинга APP, инициируемый действием аспартатной протеазы β-секретазы (BACE1), с расщеплением APP и высвобождением растворимого *N*-концевого фрагмента sAPPβ (рис. 1). Дальнейшее протеолитическое расщепление оставшегося мембраносвязанного *C*-концевого фрагмента APP (C99) с помощью γ-секретазы, представляющей собой большой мембранный белковый комплекс [20, 21], приводит к образованию Aβ-пептидов различной длины (в основном Aβ40, но также и более токсичного Aβ42), а также *C*-концевого фрагмента APP (AICD), обладающего свойствами регуляции экспрессии генов [22, 23].

В неамилоидогенном пути, на который приходится ~90% процессинга APP [24], он сначала расщепляется α-секретазой, продуцирующей растворимый *N*-концевой фрагмент sAPPα и мембраносвязанный концевой фрагмент C83 (рис. 1). В настоящее время общепринято, что металлопротеиназы семейства ADAM, в частности ADAM10, расщепляют APP по данному пути [25, 26]. Далее C83 также расщепляется комплексом γ-секретазы, высвобождая небольшой пептид p3 с неизвестными свойствами и AICD. Однако транскрипционно активным является только AICD, продуцируемый амилоидогенным β-секретазным путем [22]. Оба этих пути протекают в нормальных физиологических условиях, и все фрагменты APP, включая Aβ, выполняют важные физиологические функции [27, 28].

Метаболизм Aβ сложен, и сейчас хорошо известно, что он включает в себя различные протеолитические ферменты, среди которых основное место занимает металлопептидаза неприлизин (NEP), играющая основную роль в регуляции содержания Aβ в головном мозге [29]. Другими важными ферментами, расщепляющими Aβ, являются эндотелин-превращающий фермент-1 (ECE-1) и инсулин-деградирующий фермент (IDE). И NEP, и ECE-1 способствуют поддержанию стабильного уровня Aβ, предотвращая его накопление [30]. Различное клеточное и тканевое распределение в головном мозге ферментов, разрушающих амилоид, а также других транспортных белков, таких как транстиретин и ApoE, обеспечивает эффективную систему удаления Aβ из ткани мозга [31]. Однако эта система может ухудшаться либо с возрастом, либо из-за воздействия различных патологических состояний, приводящих к снижению эффективности её работы [32, 33], среди которых важную роль играют ишемия и хронический стресс [34–36]. Также показано, что дефицит активности NEP увеличивает содержание амилоида в головном мозге [37], в то время как повышение его экспрессии приводит к уменьшению количества амилоидных бляшек в мозге трансгенных мышей, моделирующих БА [38], и улучшению когнитивных функций животных [39].

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в нейродегенерации, вызванной недостатком кислорода в нервной ткани [40], а также токсичностью Aβ [41, 42]. В процессе старения в мозге наблюдается несколько различных видов окислительного повреждения белков и липидов, а также повышенное образование АФК [43]. В ткани головного мозга пациентов с БА наблюдается повышенный уровень маркёров окислительного стресса, включая окисленные белки, мембранные липиды и ДНК [44], окислительное повреждение которых непосредственно вовлечено в патогенез нейродегенеративных и нейроваскулярных заболеваний [45, 46].

АФК эффективны в очень малых концентрациях, а их период полураспада очень короткий. Наиболее важными мишенями окислительного повреждения являются липиды и аминокислотные остатки белков, и их реакции с АФК часто приводят к потере ферментативной, регуляторной, транспортной или структурной функций [47, 48]. Вызванное АФК повреждение ДНК, в том числе митохондриальной ДНК, приводит к развитию различных нейродегенеративных процессов [49], а также к раку [50]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) также способствует развитию дисфункции ферментов и сигнальных молекул путём изменения состава мембран, а также путём образования реактивных альдегидов, способных связываться с белками [51].

В данном исследовании мы изучали влияние ишемии на экспрессию и метаболизм APP с помощью анализа уровней мРНК APP и общих уровней белков sAPP и sAPPβ, а также экспрессию BACE1 на уровнях мРНК и белка. Также был проведён анализ экспрессии амилоид-деградирующих ферментов NEP, ECE-1 и IDE на уровнях мРНК и белка, а также маркёров окислительного повреждения белков (дитирозина и конъюгатов лизина) в коре головного мозга (Cx) крыс после индуцированной *in vivo* ишемии и реперфузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Крысы-самцы линии Wistar (масса 250–350 г, 6 мес.) были предоставлены Институтом экспериментальной фармакологии и

токсикологии Центра экспериментальной медицины Словацкой Академии Наук (IEPT SAS, Добра Вода, Словацкая Республика). Животным был предоставлен свободный доступ к пище и воде, и их содержали в кондиционируемой комнате с контролируемой температурой (18–22 °C) и 12-часовым циклом свет/темнота. Для обеспечения статистической значимости экспериментов использовали по 8 животных в каждой группе (ишемия, реперфузия, контроль). Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом медицинского факультета им. Ессениуса в Мартине Университета им. Коменского в Братиславе. Все исследования проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных», опубликованным Национальным институтом здравоохранения США (публикация NIH № 85-23, пересмотренная в 1996 г.), рекомендациями ARRIVE [52], а также с правилами, установленными Государственной ветеринарной и пищевой администрацией Словацкой Республики. Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить количество используемых животных.

Моделирование ишемии. Животные были разделены на три экспериментальные группы по 8 животных в каждой: контроль (ложно-оперированные), ишемия (15-мин ишемия) и реперфузия (15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией). Ишемию переднего мозга вызывали методом окклюзии четырёх сосудов [53]. Вкратце, в первый день крыс подвергали хирургической подготовке под наркозом галотаном, и позвоночные артерии были полностью закупорены электрокоагуляцией. Затем были найдены сонные артерии, и вокруг них свободно размещены петли пластиковых трубок, чтобы обеспечить быстрое последующее обнаружение этих сосудов. На второй день сонные артерии были снова локализованы и перекрыты артериальными зажимами. Нормальный температурный режим тела во время ишемии поддерживался с помощью термического одеяла. Через 15 мин крыс декапитировали (группа животных с ишемией). Реперфузию инициировали удалением зажимов с сонных артерий после 15-мин ишемии. После периода рециркуляции (120 мин) крыс умерщвляли декапитацией (группа животных с реперфузией). В период реперфузии животных содержали в боксе со стабильной температурой. Животные контрольной группы были ложно-оперированы. Только одно животное в группе ишемии погибло после операции. Ни одно из выживших животных не было исключено из дальнейших экспериментов. Для биохимических анализов животных декапитировали под галотановым наркозом. Объединённую ткань коры обоих полушарий использовали для дальнейшего анализа, разделив после измельчения скальпелем на две части для последующего анализа мРНК с помощью ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени) и белков с помощью вестерн-блоттинга и флуоресцентной спектрометрии, как описано ниже. Всем животным и образцам головного мозга были присвоены номера, и экспериментаторы не знали об их групповом распределении, которое было раскрыто только в ходе статистического анализа данных.

Подготовка образцов головного мозга. Для получения фракции, содержащей растворимые белки, ткань Cx обоих полушарий гомогенизировали в гомогенизаторе стекло/стекло в 1 мл низкосолевого буфера (20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), содержащего 10 мМ $MgCl_2$ и 50 мМ NaCl), а затем гомогенизатор снова промывали 1 мл того же буфера с коктейлем ингибиторов протеаз («Roche Diagnostics», Германия), и объединённый гомогенат центрифугировали при 100 000 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и рассматривали как низкосолевую растворимую цитозольную фракцию. Осадок ресуспендировали в 1 + 1 мл 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1% (*w/v*) Triton X-100, инкубировали на льду в течение 1 ч и центрифугировали в течение 10 мин, как указано выше, для получения растворимой в детергенте (мембранной) фракции.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), вестерн-блоттинг, иммунодетекция. Образцы, содержащие равные количества белка (45 или 90 мкг в зависимости от содержания предварительно оцененных белков), разделяли на 8%-ном SDS-PAGE и переносили на поливинилиден-флуоридную (PVDF) мембрану (Amersham Hybond-P, «GE Healthcare», Великобритания). Мембраны обрабатывали в течение ночи соответствующими первичными антителами: для обнаружения APP и общего sAPP – мышиными моноклональными антителами 22C11 («Roche Molecular Biochemicals», Германия), 1/4000; для sAPPβ – мышиными моноклональными антителами G26 («GlaxoSmithKline», Великобритания), 1/200; для BACE1 – мышиными моноклональными антителами 9B21 («GlaxoSmithKline», Великобритания), 1/2000; для NEP – кроличьими поликлональными антителами против НЕП крысы («US Biological», США), 1/100; для ECE-1 – мышиными моноклональными антителами Mab 32 (AEC32-236) (получены в дар от доктора К. Танзавы, Токио, Япония), 1/200; для IDE – мышиными моноклональными анти-

телами MMS-282R («Covance», Великобритания), 1/200; для β-актина – кроличьи антитела Actin (20-33) («Sigma Aldrich», США). После инкубации с первичными антителами мембраны промывали 4 раза по 15 мин в TBS (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6, содержащий 0,1% Tween 20 (*v/v*)) с последующей инкубацией в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена – HRP кроличьими анти-крысиными или анти-мышиными антителами («Amersham Biosciences»), 1/2000. Затем мембраны промывали 4 раза по 15 мин в TBS pH 7,6, содержащем 0,1% Tween 20 (*v/v*); детекцию проводили с помощью системы обнаружения хемилюминесценции ECL – «Pierce ECL western blotting substrate» («ThermoFisher Scientific», Великобритания) в соответствии с инструкциями производителея, визуализацию проводили на фотоплёнке Kodak. За загрузкой образца следили либо по актину (анти-актин 1/2000), либо по окрашиванию PVDF-мембран 0,1%-ным «Ponceau S» («Sigma Aldrich») в 5%-ной уксусной кислоте (*v/v*). Количественное определение полос проводили с помощью хемилюминесцентной сканирующей денситометрии с использованием системы ChemiDoc SRS+ и программного обеспечения «Bio-Rad Multi-AnalystTM/PC», версия 1.1.1 («Bio-Rad», Великобритания).

ПЦР в реальном времени. Ткани Cx выдерживали в соответствующем объёме реагента для стабилизации РНК («RNAlater», «Qiagen», Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя при 4 °C до выделения РНК. РНК выделяли с помощью набора «RNeasy Lipid Tissue» («Qiagen») в соответствии с протоколом производителя. кДНК получали с использованием набора «iScript cDNA kit» («Bio-Rad») и общепринятой полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР в реальном времени выполняли в термоциклере PTC-200 Peltier Thermal Cycler («MJ Research», США) с многоцветной системой детектирования ПЦР с использованием «SensiMixTM SYBR & Fluorescein Kit» («Bioline», Великобритания), и выражали экспрессию генов интереса относительно мРНК актина. Все образцы анализировали троекратно. Список праймеров приведён в табл. 1.

Анализ дитирозина и конъюгатов лизина. Анализы дитирозина и конъюгатов лизина с продуктами ПОЛ проводили при 25 °C с использованием спектрофлуориметра «Shimadzu RF 540» («Shimadzu Corporation», Япония), как описано ранее [54]. Для измерений флуоресценции аликвоты мембранной фракции, содержащие 50 мкг общего белка, разбавляли в 1 мл буфера (10 мМ HEPES, 100 мМ KCl, pH 7,0). Спектры излучения дитирозина, продукта окисления тирозина, регистрировали в диапазоне длин волн 380–440 нм (ширина щели 5 нм) при λ_{ex} (длина волны возбуждения) 325 нм. Спектры излучения конъюгатов лизина с продуктами ПОЛ регистрировали в диапазоне длин волн 425–480 нм при λ_{ex} 365 нм (ширина щели 5 нм). Результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего для интенсивности флуоресценции, выраженной в условных единицах.

Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью бицинхонинового метода (BCA) [55], модифицированного для 96-луночных микротитровальных планшетов. Рабочий реагент готовили путём смешивания раствора бицинхониновой кислоты (B9643, «Sigma-Aldrich») с 4%-ным (*w/v*) $CuSO_4$ в соотношении 50/1. Образцы (10 мкл) вносили в лунки планшетов, в каждую лунку добавляли 200 мкл реагента BCA/$CuSO_4$ и инкубировали при 37 °C в течение 30 мин, после чего определяли поглощение при длине волны 570 нм на мультидетекторном микропланшете-ридере «FLUOstar Omega multidetection microplate reader» («BMG Labtech», Великобритания). В лунках для проб сравнения

Таблица 1. Праймеры, используемые для ПЦР-РВ

МРНК	Последовательность праймеров (5′–3′)	
	Прямой	Обратный
APP	GGCCCTCGAGAATTACATCA	GTTCATGCGCTCGTAGATCA
BACE-1	GCATGATCATTGGTGGTATC	CCATCTTGAGATCTTCACCA
NEP	GGAAGCCATTCAGCTGGT	TGGAGCATAAACAACCACTTCT
ECE-1	GGACTTCTTCAGCTACGCCTGT	CTAGTTTCGTTCATACACGCACG
β-актин	GCTACAGCTTCACCACCACA	GCCATCTCTTGCTCGAAGTC

содержалось 10 мкл воды или 10 мкл различных разведений бычьего сывороточного альбумина (P0914, «Sigma Aldrich»), который использовали в качестве стандарта.

Статистический анализ. Статистический анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 9.1.0.». Оценку минимального размера группы проводили по методу Салливана на основе предварительных экспериментов. Нормальность распределения анализировали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, при этом все данные проходили тест на нормальность. Сравнение экспериментальной и контрольной групп проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки. Все данные представлены как среднее значение ± SEM (стандартная ошибка среднего). Статистически значимым считалось значение при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние ишемии и реперфузии на уровни мРНК и белка APP. Вызванная *in vivo* 15-мин глобальная ишемия приводила к увеличению экспрессии мРНК APP в Cx крыс на 22,26 ± 8,52% ($F_{2,21} = 6,22$; $p = 0,0076$) по сравнению с экспрессией у ложно-оперированных животных, принятой за 100% (табл. 2). После 120 мин реперфузии содержание мРНК APP возвращалось к контрольным значениям (97,80 ± 3,96%), зарегистрированным для ложно-оперированных животных.

Уровни белка APP анализировали как в растворимой (цитозольной), так и в мембранной фракциях Cx (рис. 2). В мембранной фракции уровень мембраносвязанного APP после глобальной ишемии увеличился до 182,83 ± 5,66% ($F_{2,21} = 66,97$; $p < 0,0001$), тогда как после 120 мин реперфузии он составил только

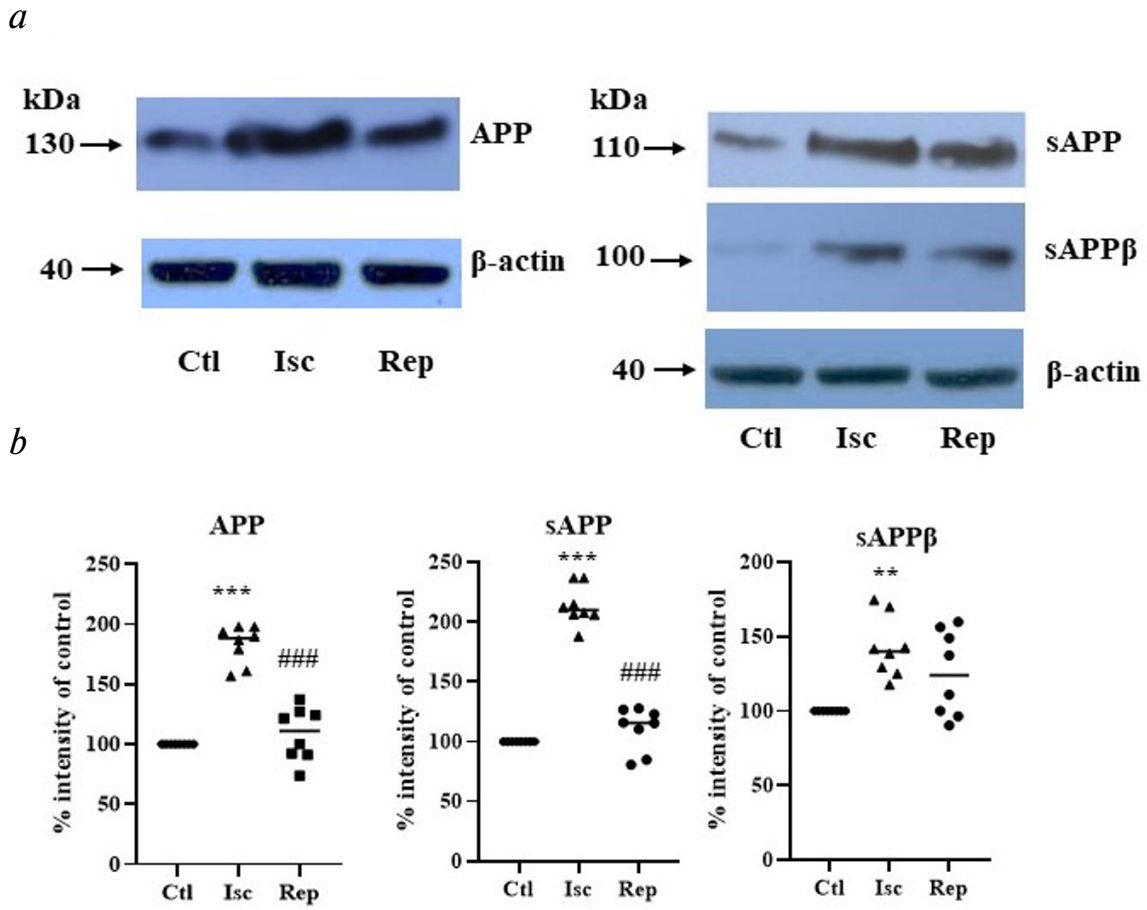

Рис. 2. Влияние ишемии на уровни APP и sAPP в коре головного мозга крысы. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровней белка APP, sAPP и sAPPβ в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($n = 8$). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем. ### $p < 0,001$ по сравнению с ишемией

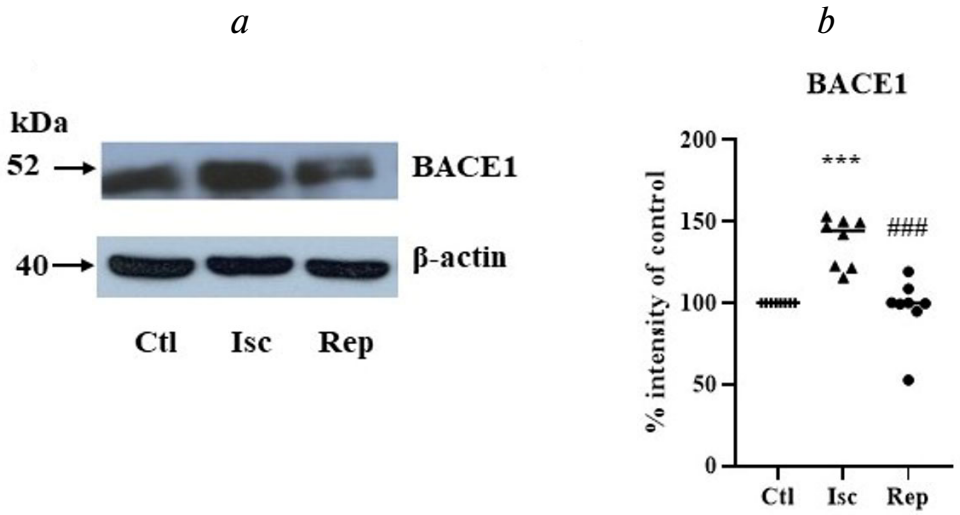

Рис. 3. Уровни белка BACE1 в коре головного мозга крысы после ишемии. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровня белка BACE1 в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 8). *** p < 0,001 по сравнению с контролем; ### p < 0,001 по сравнению с ишемией

108,49 ± 7,81% (p < 0,001) от уровня ложно-оперированных животных (рис. 2, *a* и *b*). Уровень общего sAPP в растворимой фракции после глобальной ишемии увеличился до 213,69 ± 5,79% ($F_{2,21}$ = 158,0; p < 0,0001). После реперфузии уровень sAPP был все ещё выше, чем у ложно-оперированных животных (приблизительно на 10%), но это не было статистически значимым. Количество sAPPβ (продукта расщепления APP по β-секретазному пути) также было значительно выше после глобальной ишемии и достигало 142,37 ± 7,21% ($F_{2,21}$ = 8,82; p = 0,0017). Хотя после реперфузии уровни sAPPβ оставались довольно высокими по сравнению с ложно-оперированными животными, это не было статистически достоверным.

Влияние ишемии и реперфузии на уровни мРНК и белка BACE1. Поскольку в Cx ишемизированного мозга мы наблюдали повышенные уровни sAPPβ, мы также предприняли анализ экспрессии β-секретазы (BACE1), которая отвечает за амилоидогенный процессинг APP. Уровни мРНК и белка BACE1 были увеличены после глобальной ишемии, но снижались до контрольных уровней после реперфузии. Так, уровень мРНК BACE1 в Cx после ишемии был выше на 34,02 ± 10,86% ($F_{2,21}$ = 5,86; p = 0,0095) (табл. 2), а на уровне белка – на 37,61 ± 3,34% ($F_{2,21}$ = = 20,45; p < 0,001) (рис. 3), в то время как статистически значимых различий после реперфузии по сравнению с ложно-оперированными животными зарегистрировано не было.

Ишемия снижает уровни мРНК и белка амилоид-деградирующих ферментов. ПЦР-анализ уровней мРНК NEP и ECE-1 в Cx показал, что экспрессия обоих ферментов снижалась после ишемии (табл. 3). В Cx экспрессия NEP была ниже на 22,14 ± 7,54% ($F_{2,21}$ = 3,86; p < 0,05) по сравнению с контролем. После реперфузии уровни мРНК NEP возвращались к контрольным значениям. Мы также наблюдали значительное снижение на 24,98 ± 5,71% ($F_{2,21}$ = 5,22; p = 0,014) уровней мРНК ECE-1 в Cx, которые возвращались к контрольным значениям после реперфузии.

Данные вестерн-блоттинга показали, что ишемия также приводит к снижению уровней белков NEP и ECE-1 (рис. 4). Уровни NEP снижались на 38,11 ± 5,29% ($F_{2,21}$ = 21,33; p < 0,001) после 15-мин глобальной ишемии по сравнению с ложно-оперированными контрольными животными, в то время как после 120 мин реперфузии они существенно не отличались от

Таблица 2. Уровни мРНК APP и BACE1 в коре головного мозга крыс после ишемии и реперфузии

Статус	APP	BACE1
Контроль	100	100
Ишемия	122,26 ± 8,52*	134,02 ± 10,86*
Реперфузия	97,80 ± 3,96##	100,85 ± 8,63##

Примечание. Результаты рассчитывали в % от значений контроля (ложно-оперированные животные), взятых за 100%, и выражали в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (n = 8). * p < 0,01 по сравнению с контролем; ## p < 0,01 по сравнению с ишемией.

контроля. Уровни ECE-1 снижались на 47,32 ± 4,85% ($F_{2,21}$ = 51,96; p < 0,001) после ишемии, но были выше на 24,65 ± 7,33% после реперфузии по сравнению с контрольной группой (p < 0,01). Вестерн-блоттинг также показал отсутствие изменений в уровнях белка IDE как после ишемии ($F_{2,21}$ = 1,53; p = 0,24), так и после реперфузии.

Маркёры окислительного повреждения. Накопление продуктов перекисного окисления липидов и белков, которые мы проанализировали в мембранной фракции Cx, позволили предположить, что ишемия приводит к значительному окислительному повреждению ткани. Так, уровень интенсивности флуоресценции дитирозина увеличивался после ишемии на 32,15 ± 10,92% ($F_{2,21}$ = 18,85; p < 0,0001) по сравнению с контролем (табл. 4), но снижался до контрольных величин после реперфузии. Чтобы оценить модификации белков конечными продуктами перекисного окисления липидов, мы измерили спектры флуоресценции, соответствующие конъюгатам конечных продуктов ПОЛ со свободными аминогруппами белков. В табл. 4 приведены результаты изменения интенсивности флуоресценции в спектре излучения конъюгатов лизина после ишемии и реперфузии, которая увеличилась на 36,33 ± 6,23% ($F_{2,21}$ = 21,8; p < 0,0001) соответственно по сравнению с ложно-оперированными животными, но вернулась к контрольному уровню после реперфузии.

Таблица 3. Уровни мРНК амилоид-деградирующих ферментов в коре головного мозга крыс после ишемии и реперфузии

Статус	NEP	ECE-1
Контроль	100	100
Ишемия	77,86 ± 7,54*	75,02 ± 5,71**
Реперфузия	95,19 ± 8,22	101,26 ± 9,65#

Примечание. Результаты рассчитывали в % от значений контроля (ложно-оперированные животные), взятых за 100%, и выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 8). * p < 0,05; ** p < 0,01 по сравнению с контролем; # p < 0,05 по сравнению с ишемией.

Таблица 4. Влияние ишемии и реперфузии на интенсивность флуоресценции (условные единицы) маркёров окислительного повреждения во фракции мембран коры мозга крыс

Статус	Дитирозин	Конъюгаты лизина
Контроль	67,89 ± 2,58	61,57 ± 3,32
Ишемия	87,88 ± 2,61***	83,56 ± 1,46***
Реперфузия	69,09 ± 2,69###	61,68 ± 2,99###

Примечание. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 8). *** p < 0,001 по сравнению с контролем; ### p < 0,001 по сравнению с ишемией.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хотя влияние различных типов ишемии на метаболизм амилоидного пептида было изучено на различных моделях [56–58], наше исследование впервые продемонстрировало, что острая глобальная ишемия влияет одновременно на различные пути метаболизма амилоидного пептида в ткани коры мозга крыс, включая экспрессию APP на уровне мРНК и белка, его процессинг с помощью амилоидогенной β-секретазы (BACE1) и экспрессию белкового продукта BACE1, а также на уровни экспрессии ферментов, участвующих в деградации Aβ. Данные, накопленные в этом исследовании, ясно продемонстрировали, что даже после 15-мин глобальной ишемии происходит значительный сдвиг в сторону процессов, ведущих к продукции и накоплению Aβ из-за повышенной экспрессии APP и BACE1 (как на уровне мРНК, так и на уровне белка), образования sAPPβ, а также из-за снижения экспрессии амилоид-деградирующих ферментов NEP и ECE-1. Полученные результаты объясняют, почему различные авторы сообщают о повышенных уровнях Aβ и накоплении сенильных бляшек в ишемизированном мозге у трансгенных мышей, моделирующих БА [59, 60], или в мозге человека [61, 62]. Поскольку крысы дикого типа не накапливают амилоидные отложения из-за различий в аминокислотной последовательности APP в домене Aβ по сравнению с APP человека [63], большая часть исследований метаболизма амилоида проводится на трансгенных животных. Тем не менее весь механизм процессинга APP и деградации амилоида у крыс имеет те же основные компоненты, что и в человеческом мозге, поэтому данные исследований на крысах можно экстраполировать на основную биохимию человеческого мозга.

В нашем исследовании повышение уровней мРНК APP после 15-мин глобальной ишемии коррелировало с увеличением уровней белка APP как в мембранной, так и в растворимой фракции Cx крысы, что согласуется с ранее полученными нами данными для всего полушария мозга [64]. Также имеются данные об ускоренной продукции *C*- и *N*-концевых фрагментов sAPP в периинфарктной зоне головного мозга крыс после очаговой церебральной ишемии [65]. В то время как количество общих сек-

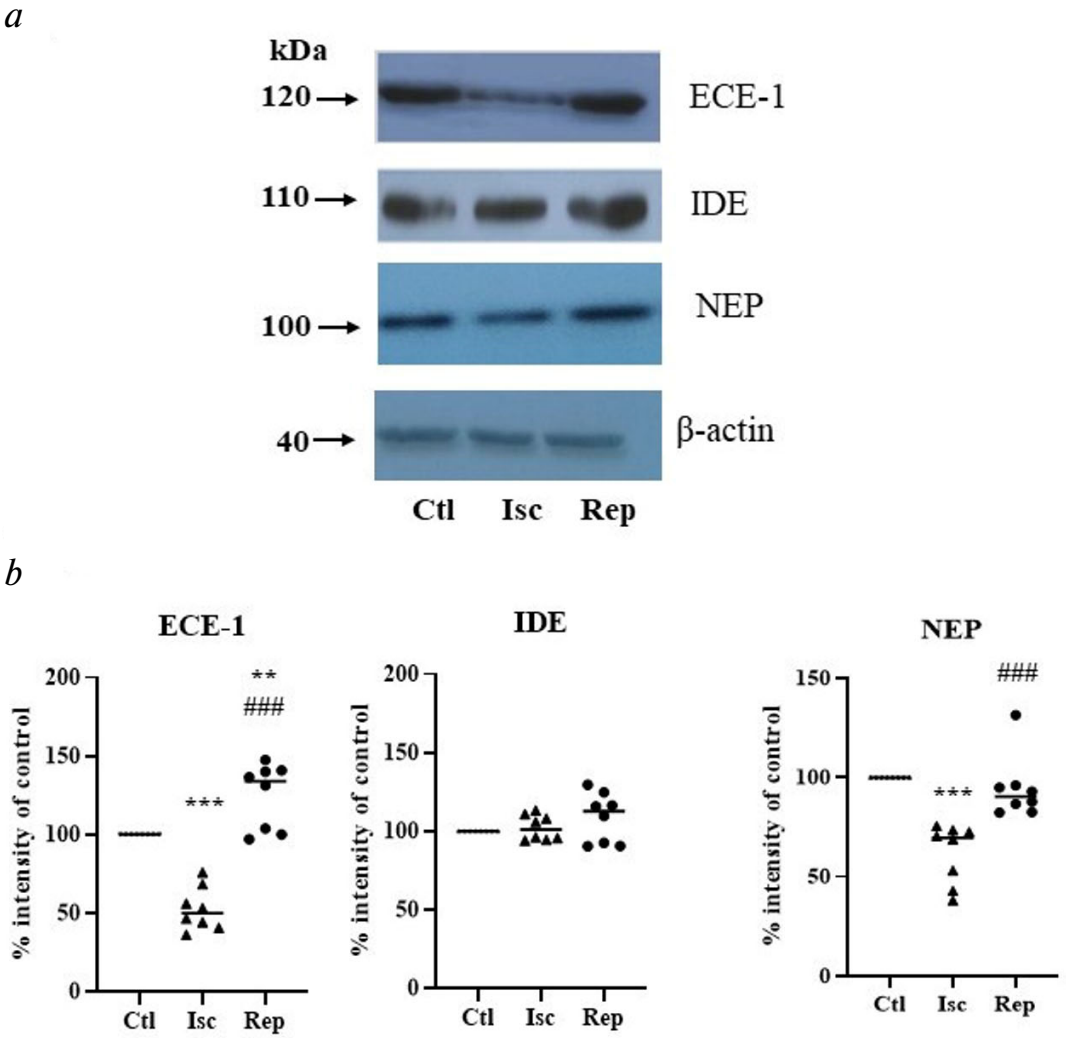

Рис. 4. Уровни белка амилоид-деградирующих ферментов в мембранной фракции коры головного мозга крысы после ишемии. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровней белков ECE-1, IDE и NEP в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($n = 8$). ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ по сравнению с контролем; ### $p < 0{,}001$ по сравнению с ишемией

ретируемых продуктов APP, наблюдаемых нами в Cx после глобальной ишемии, было увеличено на 113% по сравнению с контролем, количество sAPPβ увеличилось на 42%, это позволяет сделать предположение о том, что другая часть секретируемых продуктов была образована при действии на APP α-секретазы. Действительно, имеются данные, что хроническая ишемия головного мозга вызывает активацию металлопептидаз семейства ADAM, особенно ADAM10 и ADAM17 [66].

Увеличение продукции sAPPβ после 15-мин глобальной ишемии также коррелировало с повышенной экспрессией и уровнями белка BACE1, который инициирует амилоидогенный процессинг APP. Хотя это и не является статистически значимым, уровни sAPPβ были все же выше после 120-мин реперфузии, в то время как общий sAPP практически снижался до уровней ложно-оперированных животных. Также ранее нами была показана повышенная иммунореактивность sAPPβ и BACE1 в гиппокампе крыс после глобальной ишемии, что позволяет сделать предположение о том, что амилоидогенный процессинг APP увеличивается в различных структурах мозга. Стоит отметить, что увеличение уровней sAPPβ в гиппокампе было намного выше, чем мы наблюдали в данном исследовании в Cx, несмотря на то что в гиппокампе не было обнаружено значительного увеличения уровней белка BACE1 [67]. После ишемии в коре средней височной доли крыс были

зарегистрированы повышенные уровни мРНК BACE1 даже через 2 дня после глобальной ишемии [68]. Увеличение выработки sAPPβ предполагает, что после ишемии клетки в Сх имеют больше субстрата для расщепления γ-секретазой и продукции Aβ. Более того, есть сообщения о том, что ишемия увеличивает экспрессию основных белков комплекса γ-секретазы, PS1 и PS2, в гиппокампе крыс даже через 2 дня после временной 10-мин глобальной ишемии, вызванной остановкой сердца у крыс [69]. В совокупности эти данные позволяют сделать вывод, что ишемия неизбежно приводит к условиям, благоприятствующим образованию избыточного количества пептида Aβ в Сх мозга. Хотя в нашем исследовании мы наблюдали, что после 120-мин реперфузии экспрессия APP и BACE1 практически возвращалась к контрольным значениям, есть данные, что после ишемии их экспрессия может увеличиваться на более поздних стадиях восстановления, что предрасполагает к продолжительной выработке Aβ [68, 69] с более выраженным эффектом у старых животных [70].

Помимо потенциации образования Aβ, ишемия определенно влияет на ферменты, участвующие в его деградации. Как мы показали в данном исследовании, экспрессия мРНК и уровни белка двух основных ферментов, расщепляющих амилоид, NEP и ECE-1, значительно снижаются после 15-мин глобальной ишемии. Помимо того, что NEP является ферментом, разлагающим Aβ, он также является важной нейропептидазой, участвующей в прекращении пептидергической нейротрансмиссии таких важных нейропептидов, как соматостатин, энкефалины, вещество P и т.д., и снижение уровня NEP приведет к нарушению всех процессов в головном мозге, которые требуют его активности [71]. С другой стороны, есть сообщения о том, что предварительное введение мышам комбинированного препарата LCZ696 (блокатор рецепторов ангиотензина/ингибитор NEP) предотвращает повреждение мозга, вызванное окклюзией средней мозговой артерии, за счёт снижения уровней супероксидного аниона на ишемической стороне коры [72]. Хотя NEP также играет очень важную роль в регулировании артериального давления, и его ингибиторы в сочетании с блокаторами рецепторов ангиотензина предотвращают сердечную недостаточность [73], нельзя недооценивать возможность негативного влияния пониженной экспрессии NEP в головном мозге на содержание Aβ. Действительно, есть существенные доказательства того, что дефицит экспрессии NEP или ингибирование его активности увеличивает накопление Aβ в головном мозге различных видов животных, включая приматов [37, 74, 75].

Поскольку экспрессия NEP в нейрональных клетках повышается при участии AICD через β-секретазный путь расщепления APP [22, 76], было возможным ожидать, что после ишемии экспрессия NEP будет увеличиваться при активации процессинга APP с помощью BACE1, которую мы обнаружили в данном исследовании. Однако после глобальной ишемии мы не наблюдали увеличения уровня мРНК NEP, а напротив, значительное его снижение в Сх крыс. Основной причиной этого может быть повышенная экспрессия каспаз в условиях ишемии, которые разрушают AICD, а также высокие уровни IDE, который также расщепляет AICD [77]. Активация каспаз в условиях ишемии довольно хорошо изучена [78]. В наших исследованиях мы также наблюдали повышенную экспрессию каспаз, сопровождаемую снижением уровней AICD и NEP в Сх головного мозга крыс после пренатальной гипоксии, которая восстанавливалась после инъекции ингибитора каспаз Ac-DEVD-CHO [79]. Поскольку настоящее исследование не выявило каких-либо изменений уровней мРНК и белка IDE после глобальной ишемии, можно предположить, что IDE может легко расщеплять AICD в Сх крыс, предотвращая повышение экспрессии NEP.

Уменьшение экспрессии ECE-1, помимо сниженного расщепления амилоида-β, также может оказывать повреждающее действие на мозг, поскольку, как было показано, его субстрат, эндотелин-1, усугубляет ишемически-реперфузионное повреждение в неокортексе крыс [80]. Более того, имеются данные, что полиморфизм в гене *ECE-1b* увеличивает риск ишемического инсульта [81]. Поскольку число исследований экспрессии ECE-1 после ишемии весьма ограничено, наши данные добавляют новую информацию к общим знаниям об этой важной металлопептидазе.

Окислительный стресс, который всегда сопровождает ишемию и реперфузию, заметно усиливает их патогенное действие на мозг [82]. Как мы показали в данном исследовании, 15-мин глобальная ишемия приводит к значительному увеличению модификаций белков на уровне дитирозина и конъюгатов лизина в Сх крыс, что коррелирует с данными, полученными ранее, о повышенных уровнях модификаций липидов и белков в переднем мозге крыс [83]. Есть также данные о том, что окислительный стресс влияет на экспрессию и активность NEP [34]. Окислительное повреждение липидов и белков также является потенциальной основной причиной гиперпродукции Aβ при ишемии и гибели ней-

рональных клеток [5], что представляет собой порочный круг в патогенных процессах, вызываемых ишемией. Повышенные уровни окисленных белков и липидов могут быть результатом не только увеличения производства АФК и их реактивности во время ишемического инсульта, но также и следствием снижения способности организма защищаться от окислительных повреждений, вызванных ослаблением системы антиоксидантной защиты, что также является одним из основных механизмов патологии БА и мишенью для нейропротекции [84]. Лечение антиоксидантами может ослабить негативные эффекты ишемии у пациентов и может быть полезным для предотвращения связанного с ишемией накопления Aβ за счёт увеличения уровней и активности белка NEP, как показано на животных после пренатальной гипоксии [85].

Данные, полученные в этом исследовании, предполагают, что даже 15-мин глобальная ишемия значительно влияет на белки, которые являются основными участниками метаболизма Aβ. Тот факт, что после относительно короткой (120 мин) реперфузии их экспрессия практически возвращается к контрольным уровням, предполагает, что мозг имеет способность восстанавливать свой нормальный гомеостаз даже после глобального эпизода ишемии. Однако в долгосрочной перспективе эпизоды ишемии и реоксигенации могут приводить к более серьезным нарушениям, наблюдаемым на различных уровнях метаболизма амилоида [57, 58, 68, 74]. Поэтому хронический стресс, который часто приводит к нарушению мозгового кровообращения и ишемическим состояниям в головном мозге, может выступать фактором, предрасполагающим к нейродегенеративным процессам, а в более тяжёлых случаях – к БА [3, 6, 12].

Поскольку патологические изменения в головном мозге, приводящие к БА, на протяжении многих лет имеют кумулятивный эффект, не следует недооценивать роль хронического стресса, депрессии, гипоперфузии мозга и ишемии. Нельзя ожидать создание одного магического лекарства, которое бы предотвращало или полностью излечивало нейродегенеративные процессы в головном мозге. Только комплексный терапевтический подход, направленный на различные аспекты метаболизма амилоида, может привести к разработке стратегии, позволяющей отсрочить начало заболевания и минимизировать его тяжесть.

Финансирование. Работа поддержана грантами FP7-PEOPLE-2010-IEF, MRC, ARUK, VEGA 1/0266/18, а также частично Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-015-00232) и Госзаданием АААА-А18-118012290373-7.

Благодарности. Благодарим Я. Бенкатова, З. Цетлова и А. Кемпна за лабораторную помощь.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит исследований с участием людей. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами ARRIVE по проведению исследований на животных и отчетности по ним.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Escher, C. M., Sannemann, L., and Jessen, F. (2019) Stress and Alzheimer's disease, *J. Neural. Transm (Vienna)*, **126**, 1155-1161, doi: 10.1007/s00702-019-01988-z.
2. Sotiropoulos, I., Silva, J. M., Gomes, P., Sousa, N., and Almeida, O. F. X. (2019) Stress and the etiopathogenesis of Alzheimer's disease and depression, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1184**, 241-257, doi: 10.1007/978-981-32-9358-8_20.
3. Kotlęga, D., Gołąb-Janowska, M., Masztalewicz, M., Ciećwież, S., and Nowacki, P. (2016) The emotional stress and risk of ischemic stroke, *Neurol. Neurochir. Pol.*, **50**, 265-270.
4. Daulatzai, M. A. (2017) Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 943-972, doi: 10.1002/jnr.23777.
5. Dong, S., Maniar, S., Manole, M. D., and Sun, D. (2018) Cerebral hypoperfusion and other shared brain pathologies in ischemic stroke and Alzheimer's disease, *Transl. Stroke Res.*, **9**, 238-250, doi: 10.1007/s12975-017-0570-2.
6. Ułamek-Kozioł, M., Pluta, R., Januszewski, S., Kocki, J., Bogucka-Kocka, A., and Czuczwar, S. J. (2016) Expression of Alzheimer's disease risk genes in ischemic brain degeneration, *Pharmacol. Rep.*, **68**, 1345-1349, doi: 10.1016/j.pharep.2016.09.006.
7. Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., and Czuczwar, S. J. (2020) shared genomic and proteomic contribution of amyloid and tau protein characteristic of Alzheimer's disease to brain ischemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3186, doi: 10.3390/ijms21093186.
8. Bisht, K., Sharma, K., and Tremblay, M. È. (2018) Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress, *Neurobiol. Stress*, **9**, 9-21, doi: 10.1016/j.ynstr.2018.05.003.
9. Canet, G., Hernandez, C., Zussy, C., Chevallier, N., Desrumaux, C., and Givalois, L. (2019) Is AD a stress-related disorder? Focus on the HPA axis and its promising therapeutic targets, *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 269, doi: 10.3389/fnagi.2019.00269.
10. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
11. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2020) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal

damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, doi: 10.1111/jnc.15265.
12. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
13. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011) Alzheimer's disease, *Lancet*, **377**, 1019-1031, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
14. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, **297**, 353-356, doi: 10.1126/science.1072994.
15. Walton, C. C., Begelman, D., Nguyen, W., and Andersen, J. K. (2020) Senescence as an amyloid cascade: the amyloid senescence hypothesis, *Front. Cell. Neurosci.*, **14**, 129, doi: 10.3389/fncel.2020.00129.
16. Walsh, D. M., Hartley, D. M., Condron, M. M., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (2001) *In vitro* studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala692→Gly) Alzheimer's disease, *Biochem. J.*, **355**, 869-877, doi: 10.1042/bj3550869.
17. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., and De Felice, F. G. (2015) Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 191, doi: 10.3389/fncel.2015.00191.
18. Kobayashi, K., Hayashi, M., Nakano, H., Shimazaki, M., Sugimori, K., and Koshino, Y. (2004) Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **6**, 623-632, doi: 10.3233/jad-2004-6606.
19. Kuhla, A., Ludwig, S. C., Kuhla, B., Münch, G., and Vollmar, B. (2015) Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain, *Neurobiol. Aging*, **36**, 753-761, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.025.
20. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, **286**, 735-741, doi: 10.1126/science.286.5440.735.
21. Wolfe, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., et al. (1999) Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease, *Biochemistry*, **38**, 4720-4727, doi: 10.1021/bi982562p.
22. Belyaev, N. D., Kellett, K. A., Beckett, C., Makova, N. Z., Revett, T. J., et al. (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β-secretase-dependent pathway, *J. Biol. Chem.*, **285**, 41443-41454, doi: 10.1074/jbc.M110.141390.
23. Beckett, C., Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., and Turner, A. J. (2012) Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma, *Cell. Signal.*, **24**, 402-409, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.10.007.
24. Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells, *Biochemistry*, **38**, 9728-9734, doi: 10.1021/bi9906827.
25. Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases, *J. Neurosci. Res.*, **74**, 342-352, doi: 10.1002/jnr.10737.
26. Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 231-235, doi: 10.1016/s0006-291x(02)02999-6.
27. Octave, J.-N., Pierrot, N., Santos, S. F., Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2013) From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein, *J. Neurochem.*, **126**, 183-190, doi: 10.1111/jnc.12239.
28. Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012) Functions of Aβ, sAPPα and sAPPβ: similarities and differences, *J. Neurochem.*, **120 Suppl. 1**, 99-108, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x.
29. Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 3447-3463, doi: 10.1111/bph.14593.
30. Eckman, E. A., Adams, S. K., Troendle, F. J., Stodola, B. A., Kahn, M. A., et al. (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30471-30478, doi: 10.1074/jbc.M605827200.
31. Nalivaeva, N. N., Beckett, C., Belyaev, N. D., and Turner, A. J. (2012) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.*, **120**, Suppl. 1, 167-185, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07510.x.
32. Miners, J. S., Palmer, J. C., Tayler, H., Palmer, L. E., Ashby, E., et al. (2014) Aβ degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes, *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 238, doi: 10.3389/fnagi.2014.00238.
33. Di Marco, L. Y., Farkas, E., Martin, C., Venneri, A., and Frangi, A. F. (2015) Is vasomotion in cerebral arteries impaired in Alzheimer's disease? *J. Alzheimer's Dis.*, **46**, 35-53, doi: 10.3233/JAD-142976.
34. Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2017) Role of ageing and oxidative stress in regulation of amyloid-degrading enzymes and development of neurodegeneration, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 32-40, doi: 10.2174/1874609809666161111101111.
35. Shi, X., Ohta, Y., Liu, X., Shang, J., Morihara, R., et al. (2019) Chronic cerebral hypoperfusion activates the coagulation and complement cascades in Alzheimer's disease mice, *Neuroscience*, **416**, 126-136, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.050.
36. Morgese, M. G., Schiavone, S., and Trabace, L. (2017) Emerging role of amyloid beta in stress response: implication for depression and diabetes, *Eur. J. Pharmacol.*, **817**, 22-29, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.031.
37. Mouri, A., Zou, L. B., Iwata, N., Saido, T. C., Wang, D., et al. (2006) Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory, *Behav. Brain Res.*, **168**, 83-91, doi: 10.1016/j.bbr.2005.10.014.
38. Devi, L., and Ohno, M. (2015) A combination Alzheimer's therapy targeting BACE1 and neprilysin in 5XFAD transgenic mice, *Mol. Brain*, **8**, 19, doi: 10.1186/s13041-015-0110-5.
39. Poirier, R., Wolfer, D. P., Welzl, H., Tracy, J., Galsworthy, M. J., et al. (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of Abeta-related spatial memory deficit, *Neurobiol. Dis.*, **24**, 475-483, doi: 10.1016/j.nbd.2006.08.003.
40. Bakthavachalam, P., and Shanmugam, P. S. T. (2017) Mitochondrial dysfunction – Silent killer in cerebral ischemia, *J. Neurol. Sci.*, **375**, 417-423, doi: 10.1016/j.jns.2017.02.043.
41. Butterfield, D. A. (2002) Amyloid β-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review, *Free Radic. Res.*, **36**, 1307-1313, doi: 10.1080/1071576021000049890.
42. Angelova, P. R., and Abramov, A. Y. (2014) Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1286-1290, doi: 10.1042/BST20140153.

43. Babusikova, E., Hatok, J., Dobrota, D., and Kaplan, P. (2007) Age-related oxidative modifications of proteins and lipids in rat brain, *Neurochem. Res.*, **32**, 1351-1356, doi: 10.1007/s11064-007-9314-0.
44. Umeno, A., Biju, V., and Yoshida, Y. (2017) *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes, *Free Radic Res.*, **51**, 413-427, doi: 10.1080/10715762.2017.1315114.
45. Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F., and Sultana, R. (2007) Roles of amyloid β-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 658-677, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037.
46. Nanetti, L., Raffaelli, F., Vignini, A., Perozzi, C., Silvestrini, M., et al. (2011) Oxidative stress in ischaemic stroke, *Eur. J. Clin. Invest.*, **41**, 1318-1322, doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02546.x.
47. Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (2019) Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications, *J. Biol. Chem.*, **294**, 19683-19708, doi: 10.1074/jbc.REV119.006217.
48. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
49. Nissanka, N., and Moraes, C. T. (2018) Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease, *FEBS Lett.*, **592**, 728-742, doi: 10.1002/1873-3468.12956.
50. Assi, M. (2017) The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **313**, R646-R653, doi: 10.1152/ajpregu.00247.2017.
51. Petersen, D. R., and Doorn, J. A. (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 937-945, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.012.
52. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., and Altman, D. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.*, **8**, e1000412, doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
53. Pulsinelli, W. A., and Buchan, A. M. (1988) The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation, *Stroke*, **19**, 913-914, doi: 10.1161/01.str.19.7.913.
54. Babusíková, E., Kaplán, P., Lehotský, J., Jesenák, M., and Dobrota, D. (2004) Oxidative modification of rat cardiac mitochondrial membranes and myofibrils by hydroxyl radicals, *Gen. Physiol. Biophys.*, **23**, 327-335.
55. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
56. Pluta, R., Kida, E., Lossinsky, A. S., Golabek, A. A., Mossakowski, M. J., and Wisniewski, H. M. (1994) Complete cerebral ischemia with short-term survival in rats induced by cardiac arrest. I. Extracellular accumulation of Alzheimer's beta-amyloid protein precursor in the brain, *Brain Res.*, **649**, 323-328, doi: 10.1016/0006-8993(94)91081-2.
57. Hiltunen, M., Mäkinen, P., Peräniemi, S., Sivenius, J., van Groen, T., et al. (2009) Focal cerebral ischemia in rats alters APP processing and expression of Abeta peptide degrading enzymes in the thalamus, *Neurobiol. Dis.*, **35**, 103-113, doi: 10.1016/j.nbd.2009.04.009.
58. Koike, M. A., Garcia, F. G., Kitazawa, M., Green, K. N., and Laferla, F. M. (2011) Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia, *Neurosci. Lett.*, **495**, 55-59, doi: 10.1016/j.neulet.2011.03.034.
59. Garcia-Alloza, M., Gregory, J., Kuchibhotla, K. V., Fine, S., Wei, Y., et al. (2011) Cerebrovascular lesions induce transient beta-amyloid deposition, *Brain*, **134**, 3697-3707, doi: 10.1093/brain/awr300.
60. Pimentel-Coelho, P. M., Michaud, J. P., and Rivest, S. (2013) Effects of mild chronic cerebral hypoperfusion and early amyloid pathology on spatial learning and the cellular innate immune response in mice, *Neurobiol. Aging*, **34**, 679-693, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.025.
61. Jendroska, K., Poewe, W., Daniel, S. E., Pluess, J., Iwerssen-Schmidt, H., Paulsen, J., et al. (1995) Ischemic stress induces deposition of amyloid beta immunoreactivity in human brain, *Acta Neuropathol.*, **90**, 461-466, doi: 10.1007/BF00294806.
62. Kövari, E., Herrmann, F. R., Hof, P. R., and Bouras, C. (2013) The relationship between cerebral amyloid angiopathy and cortical microinfarcts in brain ageing and Alzheimer's disease, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **39**, 498-509, doi: 10.1111/nan.12003.
63. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Inouye, H., Surewicz, W. K., Selkoe, D. J., et al. (1992) Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid β-protein, *Biochemistry*, **31**, 10716-10723, doi: 10.1021/bi00159a011.
64. Nalivaeva, N. N., Fisk, L., Kochkina, E. G., Plesneva, S. A., Zhuravin, I. A., et al. (2004) Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1035**, 21-33, doi: 10.1196/annals.1332.002.
65. Badan, I., Dinca, I., Buchhold, B., Suofu, Y., Walker, L., et al. (2004) Accelerated accumulation of N- and C-terminal β-APP fragments and delayed recovery of microtubule-associated protein 1B expression following stroke in aged rats, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 2270-2280, doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03323.x.
66. Cai, Z., Liu, Z., Xiao, M., Wang, C., and Tian, F. (2017) Chronic cerebral Hypoperfusion promotes amyloid-beta pathogenesis via activating β/γ-secretases, *Neurochem. Res.*, **42**, 3446-3455, doi: 10.1007/s11064-017-2391-9.
67. Nalivaeva, N. N., Babusikova, E. B., Dobrota, D., and Turner, A. J. (2005) Effect of ischaemia and reperfusion on the content and degradaiton of amyloid precursor Protein in the hippoampus of rats, *Neirokhimia*, **22**, 207-212.
68. Pluta, R., Kocki, J., Ułamek-Kozioł, M., Petniak, A., Gil-Kulik, P., et al. (2016) Discrepancy in expression of beta-secretase and amyloid-beta protein precursor in Alzheimer-related genes in the rat medial temporal lobe cortex following transient global brain ischemia, *J. Alzheimer's Dis.*, **51**, 1023-1031, doi: 10.3233/JAD-151102.
69. Kocki, J., Ułamek-Kozioł, M., Bogucka-Kocka, A., Januszewski, S., Jabłoński, M., et al. (2015) Dysregulation of amyloid-β protein precursor, β-Secretase, presenilin 1 and 2 genes in the rat selectively vulnerable CA1 subfield of hippocampus following transient global brain ischemia, *J. Alzheimer's Dis.*, **47**, 1047-1056, doi: 10.3233/JAD-150299.
70. Petcu, E. B., Sfredel, V., Platt, D., Herndon, J. G., Kessler, C., and Popa-Wagner, A. (2008) Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review, *Gerontology*, **54**, 6-17, doi: 10.1159/000112845.
71. Nalivaeva, N. N., Vasilev, D. S., Dubrovskaya, N. M., Turner, A. J., and Zhuravin, I. A. (2020) Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory, *Russ. J. Physiol.*, **106**, 1191-1208, doi: 10.31857/S0869813920100076.
72. Bai, H. Y., Mogi, M., Nakaoka, H., Kan-No, H., Tsukuda, K., et al. (2015) Pre-treatment with LCZ696, an orally active angiotensin receptor neprilysin inhibitor, prevents ischemic brain damage, *Eur. J. Pharmacol.*, **762**, 293-298, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.059.

73. Haynes, R., Zhu, D., Judge, P. K., Herrington, W. G., Kalra, P. A., and Baigent, C. (2020) Chronic kidney disease, heart failure and neprilysin inhibition, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **35**, 558-564, doi: 10.1093/ndt/gfz058.
74. Newell, A. J., Sue, L. I., Scott, S., Rauschkolb, P. K., Walker, D. G., et al. (2003) Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid beta levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid, *Neurosci. Lett.*, **350**, 178-180, doi: 10.1016/s0304-3940(03)00902-9.
75. Li, W., Wu, Y., Min, F., Li, Z., Huang, J., and Huang, R. (2010) A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-beta42 and thiorphan, *Metab. Brain Dis.*, **25**, 277-284, doi: 10.1007/s11011-010-9207-9.
76. Belyaev, N. D., Nalivaeva, N. N., Makova, N. Z., and Turner, A. J. (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer's disease, *EMBO Rep.*, **10**, 94-100, doi: 10.1038/embor.2008.222.
77. Venugopal, C., Pappolla, M. A., and Sambamurti, K. (2007) Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites, *Neurochem. Res.*, **32**, 2225-2234, doi: 10.1007/s11064-007-9449-z.
78. García de la Cadena, S., and Massieu, L. (2016) Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12, *Apoptosis*, **21**, 763-777, doi: 10.1007/s10495-016-1247-0.
79. Kozlova, D. I., Vasylev, D. S., Dubrovskaya, N. M., Nalivaeva, N. N., Tumanova, N. L., and Zhuravin, I. A. (2015) Role of caspase-3 in regulation of the amyloid-degrading neuropeptidase neprilysin level in the rat cortex after hypoxia, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **51**, 480-484, doi: 10.1134/S0022093015060046.
80. Chang, C. Z., Yen, C. P., Winadi, D., Wu, S. C., Howng, S. L., et al. (2004) Neuroprotective effect of CGS 26303, an endothelin-converting enzyme inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44**, Suppl. 1, 487-489, doi: 10.1097/01.fjc.0000166307.86678.d1.
81. Li, R., Cui, M., Zhao, J., Yu, M., Ying, Z., Zhou, S., and Zhou, H. (2013) Association of endothelin-converting enzyme-1b C-338A polymorphism with increased risk of ischemic stroke in Chinese Han population, *J. Mol. Neurosci.*, **51**, 485-492, doi: 10.1007/s12031-013-0100-y.
82. Rodrigo, R., Fernández-Gajardo, R., Gutiérrez, R., Matamala, J. M., Carrasco, R., et al. (2013) Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **12**, 698-714, doi: 10.2174/1871527311312050015.
83. Urikova, A., Babusikova, E., Dobrota, D., Drgova, A., Kaplan, P., et al. (2006) Impact of Ginkgo Biloba Extract EGb 761 on ischemia/reperfusion – induced oxidative stress products formation in rat forebrain, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **26**, 1343-1353, doi: 10.1007/s10571-006-9030-3.
84. Quan, H., Koltai, E., Suzuki, K., Aguiar, A. S. Jr., Pinho, R., et al. (2020) Exercise, redox system and neurodegenerative diseases, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165778, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165778.
85. Zhuravin, I. A., Dubrovskaya, N. M., Vasilev, D. S., Kozlova, D. I., Kochkina, E. G., et al. (2019) Regulation of neprilysin activity and cognitive functions in rats after prenatal hypoxia, *Neurochem. Res.*, **44**, 1387-1398, doi: 10.1007/s11064-019-02796-3.

EFFECT OF GLOBAL BRAIN ISCHEMIA ON AMYLOID PRECURSOR PROTEIN METABOLISM AND EXPRESSION OF AMYLOID-DEGRADING ENZYMES IN RAT CORTEX: ROLE IN PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

E. Babusikova[1], D. Dobrota[1], A. J. Turner[2], and N. N. Nalivaeva[2,3]*

[1] *Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Medical Biochemistry, 036 01 Martin, Slovakia*

[2] *School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT United Kingdom*

[3] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia; E-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk*

The incidence of Alzheimer's disease (AD) increases significantly following chronic stress and brain ischemia which, over the years, cause accumulation of toxic amyloid species and brain damage. The effects of global 15-min ischemia and 120-min reperfusion on the levels of expression of the amyloid precursor protein (APP) and its processing were investigated in the brain cortex (Cx) of male Wistar rats. Additionally, the levels of expression of the amyloid-degrading enzymes neprilysin (NEP), endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1), and insulin-degrading enzyme (IDE), as well as of some markers of oxidative damage were assessed. It was shown that the APP mRNA and protein levels in the rat Cx were significantly increased after the ischemic insult. Protein levels of the soluble APP fragments, especially of sAPPβ produced by β-secretase, (BACE-1) and the levels of BACE-1 mRNA and protein expression itself were also increased after ischemia. The protein levels of APP and BACE-1 in the Cx returned to the control values after 120-min reperfusion. The levels of NEP and ECE-1 mRNA also decreased after ischemia, which correlated with the decreased protein levels of these enzymes. However, we have not observed any changes in the protein levels of insulin-degrading enzyme. Contents of the markers of oxidative damage (di-tyrosine and lysine conjugates with lipid peroxidation products) were also increased after ischemia. The obtained data suggest that ischemia shifts APP processing towards the amyloidogenic β-secretase pathway and accumulation of the neurotoxic Aβ peptide as well as triggers oxidative stress in the cells. These results are discussed in the context of the role of stress and ischemia in initiation and progression of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein, β-secretase, endothelin-converting enzyme-1, global brain ischemia, insulin-degrading enzyme, neprilysin, stress