

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И  
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

КОРБОЛИНА Елена Евгеньевна

**ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, С КОТОРЫМИ АССОЦИИРОВАНО РАЗВИТИЕ РАННИХ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ У КРЫС OXYS,  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНГЕННЫХ ЛИНИЙ**

03.02.07– генетика

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Колосова Наталия Гориславовна

Новосибирск – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Современные представления о нейродегенеративных заболеваниях.....	12
1.1.1 Основные факторы риска развития нейродегенеративных заболеваний.....	13
1.1.2 Генетическая архитектура нейродегенеративных заболеваний.....	14
1.2 Молекулярно-генетические методы выявления генов, задействованных в патогенетических механизмах комплексных заболеваний.....	16
1.2.1 Анализ сцепления локусов количественного признака (QTL).....	17
1.2.2 Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS).....	19
1.2.3 Технологии массового параллельного секвенирования транскриптома.....	21
1.3 Роль метаболического состояния мозга в нейродегенеративных процессах.....	24
1.4 Общность и различия патогенетических механизмов развития нейродегенеративных заболеваний в мозге и в сетчатке на примере болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД).....	27
1.4.1 Болезнь Альцгеймера.....	28
1.4.2 Возрастная макулярная дегенерация.....	34
1.4.3. Общность происхождения мозга и глаза.....	36
1.4.4 Эпидемиологические и клинические исследования БА и ВМД.....	36
1.4.5 Молекулярное сходство между депозитами: друзы и сенильные бляшки.....	38
1.4.6 Генетические факторы риска развития БА и ВМД.....	38
1.4.7 Основные молекулярные механизмы, задействованные в патогенезе БА и ВМД.....	39
1.4.7.1 Хроническое воспаление с вовлечением системы комплемента.....	39
1.4.7.2 Активация микроглии.....	41
1.4.7.3 Ангиогенез.....	43
1.4.7.4 Окислительный стресс.....	44
1.4.7.5 Нарушения структуры и функции митохондрий.....	46
1.5 Животные модели в свете современных теорий этиопатогенеза БА.....	49
1.6 Преждевременно стареющие мыши SAMP8 – биологическая модель БА.....	50
1.7 Крысы OXYS.....	51
1.7.1 История создания линии.....	51
1.7.2 Функциональные и морфологические особенности крыс OXYS как биологической модели преждевременного старения и связанных с ним заболеваний.....	52

Заключение к Главе 1 и постановка задач.....	57
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
2.1 Материалы, использованные в работе.....	59
2.2 Животные.....	59
2.3 Забор, первичная пробоподготовка и хранение биологических образцов.....	59
2.4 $P^{31}$ -ЯМР-спектроскопическое исследование кислотных экстрактов мозга.....	60
2.4.1 Экстракция органических и неорганических фосфатов мозга.....	60
2.4.2 $P^{31}$ ЯМР-спектроскопический анализ.....	61
2.5 Офтальмологические осмотры.....	61
2.6 Морфологический и морфометрический анализ методом световой микроскопии.....	62
2.7 Исследование поведения животных в стандартных тестах.....	62
2.7.1 Тест «открытое поле».....	62
2.7.2 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».....	63
2.7.3 Тест «радиальный восьмирукавный лабиринт».....	63
2.8 Морфометрическое исследование мозга методом магнитно-резонансной томографии.....	64
2.9 Поиск на 1-й хромосоме генетических локусов, ответственных за развитие у крыс OXYS ранней катаракты, ретинопатии и проявление характерных для этих животных поведенческих признаков.....	65
2.9.1 Выделение геномной ДНК из печени крыс методом фенол-хлороформной экстракции.....	65
2.9.2 Выделение геномной ДНК из хвостов крыс с помощью протеиназы K.....	66
2.9.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на геномной ДНК крыс.....	66
2.9.4 Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ).....	68
2.9.5 Анализ локусов количественного признака (QTL-анализ).....	68
2.10 Конструирование конгенных линий крыс.....	69
2.11 Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq) на платформе Illumina.....	69
2.12 Биоинформатический анализ данных массового параллельного секвенирования.....	71
2.12.1 Картирование и анализ дифференциальной экспрессии.....	71
2.12.2 Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов.....	71
2.12.3 Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-calling).....	71
2.12.4 Анализ фенотипического эффекта выявленных полиморфизмов (SNP).....	72
2.13 Статистический анализ.....	72
ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ.....	73
3.1 Оценка метаболического состояния мозга крыс методом $P^{31}$ -ЯМР спектроскопии.....	73
3.2 Идентификация на первой хромосоме локусов, ответственных за проявление комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS.....	78

3.3 Характеристика конгенных крыс по фенотипическим признакам.....	81
3.3.1 Заболеваемость животных катарактой и ретинопатией.....	81
3.3.2 Гистологическое исследование особенностей развития ретинопатии у крыс конгенных линий.....	83
3.3.3 Признаки ускоренного старения мозга.....	86
3.3.3А Исследование поведения животных.....	86
3.3.3Б Исследование морфофункциональных параметров мозга крыс.....	88
3.4 Анализ данных массового параллельного секвенирования (RNA-seq).....	91
3.4.1 Картирование конгенных локусов первой хромосомы.....	91
3.4.2 Сравнительный анализ выявленных несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).....	94
3.4.3 Анализ секвенирования транскриптома сетчатки крыс.....	98
3.4.4 Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов.....	103
ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	109
4.1 Метаболическое состояние мозга крыс: высокоэнергетические фосфаты.....	110
4.2 Анализ комплексного признака (QTL-анализ) и экспериментальная проверка его результатов с использованием сконструированных конгенных линий крыс.....	114
4.3 Картирование конгенных локусов первой хромосомы.....	118
4.4 Гены-кандидаты, в последовательности кДНК которых у крыс OXYS выявлены несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы относительно крыс WAG.....	119
4.4.1 Гены-кандидаты, картированные в конгенных локусах первой хромосомы.....	120
4.4.2 Гены-кандидаты из числа ассоциированных с развитием БА.....	123
4.5 Сравнительный анализ транскриптома сетчатки крыс конгенных линий и крыс родительской линии OXYS на доклинической стадии развития ретинопатии.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	134
ВЫВОДЫ.....	135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137
<b>Приложение 1: Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК.....</b>	<b>208</b>
<b>Приложение 2: Графики распределения статистической значимости для значений     фенотипических признаков в гибридной популяции <math>F_2</math> на первой     хромосоме крыс.....</b>	<b>209</b>
<b>Приложение 3: Гены, ассоциированные с развитием болезни Альцгеймера.....</b>	<b>216</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АФК** – активные формы кислорода
- БА** – болезнь Альцгеймера
- ВМД** – возрастная макулярная дегенерация
- ДЭ (ДЭГ)** – дифференциально экспрессирующиеся (гены)
- МРТ** – магниторезонансная томография
- п.н.** – пар нуклеотидов
- ПААГ** – полиакриламидный гель
- ПГАА, GWAS** - полногеномный анализ ассоциаций
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- РПЭ** – ретикулярный пигментный эпителий
- см** - сантиморган
- ЦНС** – центральная нервная система
- ЯМР** – ядерный магнитный резонанс
- $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопия** - спектроскопия ЯМР на ядрах фосфора-31
- APP** – белок-предшественник А $\beta$
- А $\beta$**  – амилоидный пептид
- FKPM** – fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments
- KEGG** – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LOD** – логарифм отношения правдоподобия, logarithm of the odds ratios
- Мб** – единица измерения длины молекулы ДНК, равная  $10^6$  п.н., Megabase
- PANTHER** - Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships database
- QTL** – локус количественного признака, quantitative trait locus
- RNA-seq** – метод массового параллельного секвенирования

## ВВЕДЕНИЕ

Общее увеличение продолжительности жизни людей в развитых странах со второй половины XX века определили достижения медицины, обеспечившие снижение смертности от ассоциированных с возрастом заболеваний. В результате меняется демографическая ситуация - увеличивается доля людей старших возрастов в общей численности населения. По данным ВОЗ, число людей в возрасте 80 лет и старше в период до 2050 года увеличится почти в четыре раза – до 395 миллионов человек. Соответственно, повышается частота «заболеваний преклонного возраста», в том числе сопровождающихся прогрессирующими дегенеративными процессами. Их развитие в более раннем возрасте рассматривается как проявление ускоренного старения, более позднее - становится основой успешного старения, долголетия. Необходимым условием существенного продления периода здоровой жизни людей, необходимым для разработки путей фармакологической коррекции заболеваний в направлении успешного старения, является выяснение как общих молекулярно-генетических механизмов старения, так и специфических механизмов развития ассоциированных с ним нейродегенеративных заболеваний.

Несмотря на очевидную связь продолжительности жизни с наследственностью, сведения о генетических факторах детерминации преждевременного старения крайне ограничены. Ассоциированные с возрастом заболевания имеют многофакторную природу с полигенным наследованием, и для их начального генотипирования как у людей, так и у грызунов широко используется метод анализа локусов количественного признака (quantitative trait loci или QTL-анализ). Выявлять метаболические пути и молекулярные мишени - гены, вовлеченные в этиологию и патогенез «заболеваний преклонного возраста», или ассоциированные с предрасположенностью к ним, позволяют также комплексные исследования с использованием возможностей современных масштабных технологий, в том числе – с изучением изменений транскриптома. Однако проведение фундаментальных и клинических исследований на людях связано с рядом определенных ограничений. Одной из очевидных проблем является существование у большинства заболеваний, ассоциированных с возрастом, протяженной доклинической стадии: манифестация заболевания происходит позднее, чем развиваются лежащие в их основе события на молекулярном уровне.

Уникальной моделью для исследования преждевременного старения является линия крыс OXYS, созданная селекцией и инбридингом крыс Wistar, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. Сцепленно с катарактой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе раннее развитие ретинопатии и ускоренное старение мозга, проявляющееся формированием пассивного типа поведения, ростом тревожности, нарушением способности к ассоциативному обучению. Доказано, что

ретинопатия у крыс OXYS аналогична возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей – нейродегенеративному заболеванию сетчатки, которое становится основной причиной потери зрения у людей старше 60 лет. Наши исследования также показали, что нейродегенеративные изменения в сетчатке и мозге крыс OXYS во многом воспроизводят картину болезни Альцгеймера [Stefanova *et al.*, 2014a]. Комплексное проявление признаков старения у крыс OXYS уже в молодом возрасте предполагает существование общих молекулярно-генетических основ у развивающихся фенотипических проявлений, однако патогенетические механизмы остаются неясными. Известно, что развитие нейродегенеративных заболеваний тесно связано с нарушениями энергетического гомеостаза [Cabezas-Opazo *et al.*, 2015]. Нарастающие с возрастом нарушения структуры и функции митохондрий рассматриваются как одна из возможных причин преждевременного старения крыс OXYS. Тем не менее, на момент постановки задач настоящего исследования вопрос о причинно-следственной связи между нарушением энергетического метаболизма и «запуском» процессов преждевременного старения оставался открытым.

Целью настоящей работы являлось выявление генов, с которыми ассоциировано развитие ранних нейродегенеративных изменений у крыс OXYS.

Были поставлены следующие задачи:

1) Оценить возможную связь ускоренного старения крыс OXYS с нарушениями энергетического метаболизма, сравнив его состояние в мозге крыс OXYS и Wistar (контроль) методами  $P^{31}$  ЯМР-спектроскопии.

2) Провести поиск локусов на первой хромосоме, ассоциированных с развитием у крыс OXYS признаков преждевременного старения: поведенческих, ранней катаракты и ретинопатии, - методом анализа локусов количественного признака (QTL-анализа).

3) На основе генома крыс WAG (с нормальным темпом старения) сконструировать конгенные линии крыс, несущие каждая по одному из выявленных локусов первой хромосомы крыс OXYS, ассоциированных с развитием у линии-донора локуса признаков преждевременного старения. Охарактеризовать конгенных животных в сравнении с крысами родительских линий: а) по заболеваемости катарактой и ретинопатией; б) по поведению в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» и по способности обучению в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт»; в) по морфофункциональным параметрам мозга методами магниторезонансной томографии (МРТ).

4) Картировать перенесенные в сконструированные конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 локусы первой хромосомы крыс OXYS при помощи выявленных методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq) однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

5) Выявить характерные для крыс OXYS несинонимичные относительно крыс WAG замены нуклеотидов в генах: а) расположенных в перенесенных от крыс OXYS локусах первой хромосомы у крыс OXYS и конгенных животных WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2; б) ассоциированных с развитием аутосомно-доминантной или спорадической формы болезни Альцгеймера согласно литературным данным.

б) Провести сравнение транскриптома сетчатки конгенных животных WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 и крыс OXYS методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq); провести функциональную аннотацию дифференциально экспрессирующихся генов.

Научная новизна. В работе впервые установлено, что постнатальное развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма при отсутствии дефицита высокоэнергетических фосфатов, который не проявляется и в период манифестации признаков ускоренного мозга. Выявлены два локуса количественного признака на первой хромосоме, ассоциированные с развитием у крыс OXYS ранней катаракты, ретинопатии и характерных поведенческих признаков. Их влияние на развитие исследуемых признаков доказано экспериментально созданием конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2. На основании данных массового параллельного секвенирования (RNAseq) был проведен сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов, который позволил картировать конгенные локусы и выявить в 19-ти расположенных в них генах, а также в генах *Casp3* и *Sor11*, несинонимичные замены, потенциально ассоциированные с развитием ранней катаракты и ретинопатии у крыс OXYS и конгенных животных. Сравнение профилей экспрессии генов в сетчатке 20-дневных крыс WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 и OXYS методом RNA-seq выявило функциональные группы генов, с изменением экспрессии которых может быть связано развитие у крыс OXYS ранних нейродегенеративных изменений: гены метаболического пути болезни Альцгеймера, Wnt -, и TGF- $\beta$  - сигнальных путей.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты исследования вносят вклад в фундаментальные знания о молекулярно-генетических механизмах комплексного развития признаков преждевременного старения и могут быть востребованы для поиска новых терапевтических мишеней при создании препаратов, направленных на профилактику преждевременного старения и связанных с ним заболеваний. Сконструированные в ходе работы конгенные линии крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 наряду с крысами OXYS являются уникальным инструментом для исследования механизмов развития ранних нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе - в случае их параллельного с катарактой развития.



Положения, выносимые на защиту:

- 1) Манифестация признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS не связана с нарушениями энергетического метаболизма - дефицитом высокоэнергетических фосфатов.
- 2) Лocusы количественного признака, расположенные на первой хромосоме, ассоциированы с развитием у крыс OXYS признаков преждевременного старения: ранней катаракты и ретинопатии.
- 3) Развитию нейродегенеративных изменений в сетчатке крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 предшествуют изменения уровня мРНК генов, ассоциированных с метаболизмом жирных кислот, липидов и ДНК, воспалительным ответом, морфогенезом кровеносных сосудов и генов, задействованных в Wnt - и TGF- $\beta$  - сигнальных путях.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях, в том числе: «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2014), «FEBS» (Санкт-Петербург, 2013), «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2012), The XXth Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER, Берлин, 2012), «Генетика старения и продолжительности жизни» (Сыктывкар, 2008, 2010; Москва, 2012), «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), «International conference on bioinformatics of genome regulation and structure - BGRS» (Новосибирск, 2010, 2014), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Основные публикации:

1. Стефанова Н.А., **Корболина Е.Е.**, Ершов Н.И., Рогаев Е.И., Колосова Н.Г. Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19. - №4. – С. 74-82.
2. Stefanova NA, Muraleva NA, **Korbolina EE**, Kiseleva E, Maksimova KYi, Kolosova NG. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. // *Oncotarget*. – 2015, Jan 30. - 6(3). – P.1396-1413.
3. **Korbolina EE**, Ershov NI, Bryzgalov LO, Kolosova NG. Application of quantitative trait locus mapping and transcriptomics to studies of the senescence-accelerated phenotype in rats. // *BMC Genomics*. – 2014. – 15. - Suppl 12:S3. Epub 2014 Dec 19.
4. Колосова Н. Г., Стефанова Н. А., **Корболина Е. Е.**, Фурсова А. Ж., Кожевникова О. С. Крысы OXYS — генетическая модель преждевременного старения и связанных с ним заболеваний // *Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo*. - 2014. - Т. 27. - №2. - С. 336 – 341.
5. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., **Korbolina E.E.**, Muraleva N.A., Kolosova N.G. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. Review. // *Cell Cycle*. – 2014, Feb 17. - 13(6). – P. 898-909.
6. Kozhevnikova O.S., **Korbolina E.E.**, Stefanova N.A., Muraleva N.A., Orlov Y.L., Kolosova N.G. Association of AMD-like retinopathy development with an Alzheimer's disease metabolic pathway in OXYS rats // *Biogerontology*. – 2013, Aug 20. - 14(6). - P. 753-762.
7. Kozhevnikova O.S., **Korbolina E.E.**, Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: Effects of aging and AMD-like retinopathy // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol.6. – N. 12(11). – P. 1745-1761.
8. **Korbolina E.E.**, Kozhevnikova O.S., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Quantitative trait loci on chromosome 1 for cataract and AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // *Aging (Albany NY)*. – 2012. – Vol.4. – N.1. – P.49-59.
9. Кожевникова О.С., Мартыщенко М.К., Генаев М.А., **Корболина Е.Е.**, Муралева Н.А., Колосова Н.Г., Орлов Ю.Л. RatDNA: база данных микрочиповых исследований на крысах для генов, ассоциированных с заболеваниями старения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т.16. - № 4/1. – С. 756-765.
10. Ойдопова О.С., Польшгалова Н.Е., **Корболина Е.Е.**, Колосова Н.Г. Поиск генетических детерминант преждевременного старения крыс линии OXYS // *Advances in*

gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo, 2008. - T. 21. - С. 499 – 500.

11. **Korbolina E.E.**, Agafonova I.G., Sergeeva S.V., Trofimova N.A., Mishenko N.P., Kolosova N.G. Early-life hypoxia in the development of behavioral dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats and its correction with antioxidants //Advances in Gerontology. - 2007. - Vol. 20. - N 3. - P. 46-48.

12. Sergeeva S., Bagryanskaya E., **Korbolina E.**, Kolosova N. Development of behavioral dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism // Exp Gerontol. – 2006. – V. 41 (2). – P. 141-150.

Выражаю искреннюю благодарность коллегам, внесшим вклад в эту работу: д.ф-м.н. Е.Г. Багрянской, д.б.н. А.Л. Маркелю, д.м.н. А.А. Жданкиной, д.м.н. А.Ж. Фурсовой. Выражаю глубокую признательность к.б.н. С.В. Сергеевой и к.б.н. О.Е. Рединой за ценные консультации и помощь при освоении методов; к.б.н. Л.О. Брызгалову и к.б.н. Н.И. Ершову - за плодотворное сотрудничество в биоинформатическом анализе данных; к.б.н. Н.А. Стефановой, к.б.н. Н.А. Муралевой, к.б.н. О.С. Кожевниковой, А.О. Витовтову, а также всем сотрудникам сектора молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН - за помощь при выполнении и подготовке работы и теплую рабочую атмосферу. Особая благодарность - моему научному руководителю, д.б.н., профессору Наталии Гориславовне Колосовой.

## Глава 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе рассматриваются:

- 1) современные подходы к изучению механизмов развития комплексных заболеваний, к которым относятся нейродегенеративные заболевания;
- 2) современные представления об общих чертах и различиях в патогенетических механизмах развития нейродегенеративных заболеваний на примере болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД);
- 3) исследования БА и ВМД на моделях животных в свете современных теорий этиопатогенеза;
- 4) функциональные и морфологические особенности преждевременно стареющих крыс OXYS, как перспективной нетрансгенной модели нейродегенеративной патологии, воспроизводящей картину БА.

### 1.1 Современные представления о нейродегенеративных заболеваниях

Термином «нейродегенеративные заболевания» объединяется группа разнородных дегенеративных заболеваний, в основе которых лежит процесс прогрессирующей гибели нейронов, который ведет к развитию различных неврологических симптомов, однако не связан непосредственно с известными внешними или внутренними факторами (такими как интоксикация, сосудистая недостаточность, инфекции или метаболические расстройства). Наиболее известными представителями этого класса заболеваний человека являются болезни Альцгеймера (БА), Паркинсона, Гентингтона. К менее распространенным относятся болезнь Нимана-Пика, синдром Туретта, а также группа заболеваний, характеризующихся поражением двигательных нейронов головного и спинного мозга и нервных проводящих путей (боковой амиотрофический склероз). Изменения при нейродегенеративных процессах затрагивают как когнитивную сферу и психику человека (потеря памяти и, в конечном счете, деменция при болезни Альцгеймера), так и его способность свободно двигаться и обслуживать себя (скованность, дрожание, расстройства ходьбы при болезни Паркинсона). Симптомы нейродегенеративных заболеваний могут проявляться в различном возрасте, при этом для многих из них характерен более или менее длительный период бессимптомного развития и неуклонное прогрессирование нарушений когнитивных функций. Избирательное поражение нейронов вовлеченных систем объясняется структурными или биохимическими особенностями, свойственными непосредственно нейрональным клеткам или окружающим их элементам глии [Zhang *et al.*, 2014b].

Патоморфологически нейродегенеративные заболевания характеризуются снижением численности нейронов в определённых структурах нервной системы, а также нарушением

метаболизма и изменением конформации клеточных белков с их последующим накоплением и агрегацией в определенных группах нейронов, выявляемой на определенной стадии заболевания [Andreasen, Lorenzen, Otzen, 2015; Lee *et al.*, 2011]. Однако явных патоморфологических изменений может и не выявляться, например, при развитии идиопатической мышечной дистонии клинические признаки объясняются нарушением обмена нейромедиаторов. Причины агрегации белков могут быть связаны с каскадом патологических клеточных биохимических процессов: избыточного фосфорилирования, гликозилирования, активизации перекисного окисления липидов [Tenreiro, Eckermann, Outeiro, 2014; Vicente Miranda, Outeiro, 2010], а также носить установленный генетически детерминированный характер. Так, миссенс-мутации и мутации, изменяющие число копий гена, кодирующего нейронный цитозольный белок  $\alpha$ -синуклеин, который, как считается, участвует в регуляции синаптической передачи, ассоциированы с развитием аутосомно-доминантной формы болезни Паркинсона, хотя механизмы, приводящие в данном случае к нейродегенеративным изменениям остаются неясными [Sahay *et al.*, 2015].

### **1.1.1 Основные факторы риска развития нейродегенеративных заболеваний**

Наиболее сильным и независимым фактором риска развития и прогрессии многих нейродегенеративных заболеваний является пожилой и старческий возраст. Старение оказывает влияние на многие клеточные процессы, повышая уязвимость мозга по отношению к патологическим воздействиям. С возрастом уменьшается масса мозга, снижается количество нейрональных клеток в определенных областях и число синапсов, изменяется активность нейротрансмиттерных систем [Dickstein *et al.*, 2007; Rizzo, Richman, Puthanveetil, 2014; Хекардаки *et al.*, 2015]. Эти инволютивные изменения способствуют снижению нейрональной пластичности и, в конечном итоге, приводят к снижению компенсаторных возможностей головного мозга [Brehmer *et al.*, 2014; Gutchess, 2014; Robertson, 2013]. В совокупности с накоплением ассоциированных с возрастом соматических повреждений это может способствовать повышению вероятности развития нейродегенеративных процессов. В некоторых публикациях выдвигается предположение о том, что генетический дефект, запускающий развитие патологических нейродегенеративных процессов, возможно, предопределяет ограниченность ресурса жизнедеятельности определённых групп нейронов.

Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что с повышенным риском развития нарушений памяти и когнитивных функций в пожилом и старческом возрасте могут быть связаны различные сосудистые факторы риска, включая артериальную гипертензию и сахарный диабет. При этом статистическая связь имеется не только с сосудистыми когнитивными нарушениями, но и с риском развития непосредственно БА. Максимальный

риск закономерно отмечается при сочетании артериальной гипертензии, гиперлипидемии, абдоминального ожирения и сахарного диабета 2 типа, что нередко наблюдается у пациентов с так называемым «метаболическим синдромом» [Misiak, Leszek, Kiejna, 2012]. Однако клиническое значение сосудистых изменений в патогенезе нейродегенеративных заболеваний требует тщательного изучения. К доказанным факторам риска когнитивных нарушений в пожилом возрасте относятся также черепно–мозговые травмы, продолжительные стрессы и эпизоды депрессии в анамнезе, женский пол (в частности, для риска развития БА), дефицит витаминов группы В и фолиевой кислоты, низкая интеллектуальная и физическая активность в молодые и средние годы жизни, а также низкий уровень образования [Lenehan *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2014; Zawia, Basha, 2005].

### **1.1.2 Генетическая архитектура нейродегенеративных заболеваний**

Результаты, полученные при проведении популяционных, генеалогических исследований, а также изучения близнецов и приемных детей в семьях однозначно указывают на существование наследственной предрасположенности к нейродегенеративным заболеваниям. Генетическая отягощенность является фактором риска развития когнитивных нарушений. Так, риск развития БА особенно велик при наличии ближайших родственников, диагноз которым был установлен до достижения 60 лет, поскольку «семейная» форма заболевания с ранним началом характеризуется аутосомно–доминантным типом наследования и высокой пенетрантностью. Однако «семейные» формы нейродегенеративных заболеваний достаточно редки. Так, в наиболее полной, периодически обновляемой базе данных по мутациям, ассоциированным с развитием БА и деменции (Frontotemporal Dementia) [Cruts, 2012] по состоянию на 2014 год описано различных 450 мутаций, зарегистрированных у 1493 пациентов и/или семей. Во многих случаях наследование форм заболевания со сходными клиническими и гистопатологическими признаками не укладывается в рамки моногенной модели, на что указывает, в частности, нелинейное снижение риска заболевания среди родственников больного по мере уменьшения степени родства. Огромная группа нейродегенеративных заболеваний представлена спонтанными, так называемыми спорадическими случаями, которые могут объясняться приобретенной патологией, возникающей в результате сосудистых, метаболических нарушений или инфекционного процесса. Сам термин «спорадический» возможно, дает здесь чересчур упрощенное представление, поскольку многие нейродегенеративные заболевания в определенной степени показывают семейную агрегацию [Fang *et al.*, 2009; Mitsui, Tsuji, 2014; Thacker, Ascherio, 2008; Tsuji, 2013]. Риск заболеть у ближайших родственников пациентов, например, с диагностированной спорадической формой БА выше среднестатистического, что предполагает

вклад генетических факторов в патогенез спорадических форм нейродегенеративных заболеваний.

Многофакторная модель развития сложных «не-менделевских» заболеваний в рамках теории о взаимодействии генетических факторов с факторами среды была предложена еще в 1965 году [Falconer, 1965]. В настоящее время научное сообщество разделяет представление о том, что нейродегенеративные заболевания принадлежат к группе комплексных заболеваний, и развиваются в результате сочетанного действия генетических и средовых факторов, приводящих в конечном итоге к клиническим и патоморфологическим изменениям [Lill, Bertram, 2011; Wirth *et al.*, 2014]. Для многих заболеваний наследование носит полигенный характер, а вариация экспрессии генов и взаимодействие факторов может обуславливать существование многообразных клинических вариантов.

Гипотеза «распространенная болезнь – распространенный генетический вариант» (CDCV, Common Disease – Common Variant, [Hemminki, Försti, Bermejo, 2008], предложенная для объяснения характера наследования комплексных заболеваний, предполагает, что причиной их развития становятся один/несколько распространенных аллельных вариантов, взаимодействующих между собой, и, возможно с определенными факторами окружающей среды. Характерным примером может служить аллельный вариант *e4* гена *APOE* в контроле развития БА [Seripa *et al.*, 2011]. Собственно, эта гипотеза и явилась научной парадигмой для полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) [Eichler *et al.*, 2010; Risch, 2000; Yang *et al.*, 2010]. К настоящему времени эта модель показала свою несостоятельность в свете так называемой «проблемы недостающей наследственности», *missing heritability* [Gibson, 2010; Manolio *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2014]. Так, при помощи GWAS выявлено более 20ти локусов, оказывающих влияние на риск развития болезни Паркинсона, которые, однако, объясняют только 3-5% фенотипической дисперсии, связанной с заболеванием. Эта оценка существенно меньше полученной в эпидемиологических исследованиях [Hamza, Payami, 2010; Keller *et al.*, 2012; Wirdefeldt *et al.*, 2011], что является убедительным доказательством существования некоторого числа еще неидентифицированных генетических факторов риска. Концепция «распространенная болезнь – множественные редкие генетические варианты» (Common Disease – Multiple Rare Variants) [Auer, Lettre, 2015] исходит из того предположения, что многие функциональные генетические варианты, повышающие риск развития заболевания, обладают высокой пенетрантностью, однако чрезвычайно редко встречаются в популяции, возможно только у отдельных пациентов/семей. При этом разные пациенты/семьи могут нести редкие мутации в кодирующей области одного и того же гена. Так, недавний полно-экзомный анализ семейных форм БА (с последующим анализом данных в масштабных исследованиях типа «случай-контроль») выявил достаточно редкий аллельный вариант (частота встречаемости

менее 1%) – V232M в гене *PLD3*, сегрегированный в двух неродственных семьях. Этот вариант был ассоциирован с увеличением риска развития БА у носителей в 4 раза по сравнению с лицами старше 70-ти без признаков деменции [Cruchaga *et al.*, 2014]. Однако подавляющее большинство идентифицированных вариантов, увеличивающих риск развития БА (за исключением *APOE*), связаны с увеличением/уменьшением риска у носителей всего лишь в 0,10-0,15 раз [Bertram, Lill, Tanzi, 2010].

Таким образом, в спектре частотных аллелей предполагается наличие большого количества распространенных вариантов с малым эффектом [Visscher, Hill, Wray, 2008]; наличие редко встречающихся аллелей, обладающих значительным эффектом [Cirulli, Goldstein, 2010]; или учитывается влияние на риск развития заболевания комбинации генетических, эпигенетических и экологических факторов [Gemenetzi, Lotery, 2014; Sadee *et al.*, 2014; Sobrin, Seddon, 2014]. Однако в контроле комплексного заболевания могут участвовать как редкие, так и относительно распространенные аллели даже одного гена [Gibson, 2011]. Стратегии поиска генетических факторов риска, таким образом, должны учитывать, что следование одной из вышеупомянутых гипотез не подразумевает их взаимоисключаемость. Возможно, каждая из моделей генетической архитектуры в различной степени характеризует каждое определенное заболевание или комплексный признак.

## **1.2 Молекулярно-генетические методы выявления генов, задействованных в патогенетических механизмах комплексных заболеваний**

В случае «семейных» форм нейродегенеративных заболеваний, наследующихся по менделевскому типу, достаточно успешной для определения кандидатных генов показала себя стратегия позиционного клонирования [Collins, 1992]. В общей сложности по состоянию на апрель 2014 были описаны 3195 генов, мутации в которых являются причиной развития определенных фенотипических проявлений [McKusick, 2007]. В течение последнего десятилетия процессы поиска кандидатных вариантов ускорены развитием технологий секвенирования нового поколения, next generation sequencing (NGS) [Ishiura *et al.*, 2012]. На сегодняшний день, достигнут значительный прогресс в плане скорости, пропускной способности, и снижения себестоимости исследований. Вместе взятые, эти успехи предопределили путь для широкого применения технологий NGS в фундаментальных научных исследованиях, а также в клинической диагностике [Buermans, Dunnen den, 2014; Dijk van *et al.*, 2014; Keogh, Chinnery, 2013], в том числе при исследовании ассоциаций с развитием нейродегенеративных заболеваний или с предрасположенностью к ним [Antonell *et al.*, 2013; Bettens, Sleegers, Broeckhoven Van, 2013; Humphries, Kohli, 2014; Tian *et al.*, 2015; Whitmore *et al.*, 2014].



В настоящее время массовое параллельное секвенирование осуществляется с использованием платформ, использующих различные стратегии приготовления матриц, секвенирования и визуализации данных, в том числе секвенирование путем синтеза (Illumina), секвенирование путем лигирования (SOliD), пиросеквенирование (454 Life Sciences). Следует отметить, что развитие и интеграция в фундаментальный научный процесс технологий «нового поколения» предъявляет особые требования к биоинформатическим алгоритмам выравнивания и обработки данных, и прогресс в этой области только набирает обороты. Разработка новых алгоритмов для аннотации коротких прочтений [Dijk van *et al.*, 2014; Hatem *et al.*, 2013], сборки геномов *de novo* [Zhang *et al.*, 2011], выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [Li *et al.*, 2013b], анализа данных иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием, ChIP-seq [Rougemont, Naef, 2012] и транскриптомных исследований, RNA-seq [Kvam, Liu, Si, 2012], а также корректировки технических погрешностей [Hansen, Brenner, Dudoit, 2010], в конечном итоге способствуют увеличению объема получаемой информации и улучшению интерпретации данных NGS.

В число основных подходов к картированию генов-кандидатов для комплексных (в том числе, нейродегенеративных) заболеваний входят также анализ локусов количественных признаков (QTL, quantitative trait loci) и полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА, Genome-Wide Association Studies, GWASs).

### **1.2.1 Анализ сцепления локусов количественного признака (QTL)**

QTL-анализ, или анализ локусов количественного признака (quantitative trait loci) - эффективная стратегия, применяемая для анализа и генотипирования фенотипических количественных признаков (в том числе поведенческих) и у грызунов [Cook *et al.*, 2015; Maga *et al.*, 2015; Sher *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*, 2005], и у человека [Chaum, Winborn, Bhattacharya, 2015; Franceschini *et al.*, 2014]. Метод основан на принципах мейотической рекомбинации и свободной сегрегации аллелей и известен в двух основных вариантах. Первый – метод генов-кандидатов – предусматривает использование полиморфных ДНК-маркеров, тесно сцепленных с генами, о которых известно, что белковый продукт принимает участие в формировании фенотипического эффекта/признака. Второй – сканирование генома или отдельных хромосом при помощи анонимных ДНК-маркеров. Исторически в качестве первых доступных ДНК-маркеров использовались полиморфизмы по длине рестрикционных фрагментов [Olsen *et al.*, 1996]. Вплоть до сегодняшнего дня для QTL-анализа широко используются микросателлитные повторы -SSR (SimpleSequenceRepeats) или STR (SimpleTandemRepeats). Эти короткие тандемные ДНК-повторы достаточно многочисленны в ДНК эукариот [Sharma, Grover, Kahl, 2007; Tóth, Gáspári, Jurka, 2000], распространены чаще в некодирующих областях ДНК, вследствие чего высоко полиморфны по длине и легко генотипируются с помощью

полимеразной цепной реакции. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), имеют определенные преимущества в качестве ДНК-маркеров, в том числе благодаря удобству картирования хромосом, высокой плотности доступных маркеров и развитию автоматизированных методов с использованием SNP-чипов и объединенных баз данных [Hashimoto *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2013].

Идентификация локусов, ассоциированных с количественным признаком, проводится с использованием сконструированных гибридных популяций, однако требуется, чтобы исходные родительские линии животных были инбредны и контрастны по исследуемому фенотипическому признаку. Для каждого представителя гибридной популяции статистически устанавливается связь между количественным значением признака и аллельным составом кандидатного локуса: анализ сцепления QTL [Redina *et al.*, ]. На графике в координатах «вероятность сцепления маркера с геном-кандидатом/ позиция на карте хромосомы» (LOD score, логарифм отношения правдоподобия, logarithm off the odds ratio) выявляется пик, расположение которого соответствует наиболее вероятному расположению QTL. Высота пика отражает меру статистической значимости, при этом значимым считается  $LOD \geq 3$  [Rapp, 2000].

Метод имеет определенные ограничения. Во-первых, точность картирования локуса определяется такими параметрами, как точность оценки проявления количественного признака в индивидуальном фенотипе, плотность расположения молекулярных маркеров, а также размер и половой состав исследуемой популяции [Clark *et al.*, 1996; Rapp, 2000]. С увеличением расстояния между маркером и сцепленным с ним кандидатным геном увеличивается вероятность ошибки, связанной с вероятностью рекомбинационного события между ними. Уплотнение маркеров (увеличение их количества для анализа) уменьшает расстояние между ними на карте хромосомы. Однако показано, что, начиная с 5-10 сМ, такое уплотнение лишь незначительно уточняет локализацию QTL. На практике интервал между маркерами на карте хромосомы составляет в среднем 20-35 сМ. С целью более точного картирования QTL в дальнейшем применяется, в частности, позиционное картирование и построение сегрегационных конгенных линий [Rapp, Deng, 1995]. Во-вторых, как правило, выявляемые локусы QTL охватывают протяженные участки хромосом, которые либо содержат сотни генов – либо, напротив, в них не картируется ни одного аннотированного гена. Ситуации такого типа заложили основы современного представления о том, что эффект выявленного QTL может отражать регуляторные взаимодействия, в том числе - эффекты посттрансляционных модификаций и регуляции на уровне микроРНК [Wao *et al.*, 2007; Barakat *et al.*, 2012]. Ограничения метода QTL-анализа могут быть связаны также с возможностью существования в пределах исследуемой хромосомы нескольких локусов количественного признака, направленность и степень влияния каждого из которых на проявление фенотипического

признака может различаться. К примеру, если два QTL расположены близко, но их аллельные эффекты в дублирующей фазе, возможны несколько вариантов наблюдаемых графиков LOD: 1) одиночный пик; 2) плато; 3) 2 отдельных пика; 4) так называемый «призрачный» пик («ghost»), располагающийся на карте между двумя QTL. В последнем случае интервал между QTL обычно составляет порядка 40 сМ, а между маркерами – порядка 20 сМ. При этом выявленный с использованием одной гибридной популяции QTL может не подтвердиться при использовании другой [Rapp, 2000; Saad *et al.*, 2007]. Существует предположение о том, что количество локусов QTL, которые могут быть выявлены для любого количественного признака с использованием сегрегационного анализа, ограничено 12 локусами [Huyne, Kearsey, 1995]. Ограничивающим фактором для выявления QTL может служить и его слабое влияние на исследуемый признак.

Тем не менее, QTL-анализ успешно используется в качестве метода первого выбора, в том числе в фундаментальных исследованиях нейродегенеративных заболеваний [Goldowitz *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2012; Ryman, Gao, Lamb, 2008; Swanberg *et al.*, 2009]. Следует отметить, что QTL-анализ помогает построить гипотезу о существовании в выявленном локусе гена, оказывающего влияние на проявление исследуемого количественного признака, причем поиск может быть осуществлен без принятия априорной гипотезы. Однако LOD score отражает лишь вероятность сцепления ДНК-маркера с потенциальным геном-кандидатом. Дальнейшие исследования чаще всего заключаются в получении конгенных линий животных, различающихся лишь небольшими хромосомными сегментами. Проявление у конгенных животных исследуемого признака считается доказательством существования в выявленных локусах гена/генов, участвующих в формировании фенотипического признака у родительской линии-донора QTL [Rapp, 2000]. Для подтверждения роли определенного кандидатного гена используется получение животных, которые проявляют ожидаемый фенотип и несут мутацию кандидатного гена, расположенного в пределах QTL.

### **1.2.2 Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS)**

В ходе полногеномного анализа ассоциаций устанавливается связь между геномным вариантом (часто только для однонуклеотидных полиморфизмов, SNPs) и фенотипическим признаком. При этом используемые генетические варианты могут располагаться в некодирующих областях генома. Основная цель при исследовании заболеваний человека заключается в идентификации генетических факторов риска, что позволяет дать обоснованный прогноз о предрасположенности к заболеванию. Не менее важной областью применения ПГАА является фармакокинетика, а именно поиск аллельных вариантов, ассоциированных с метаболизмом, эффективностью и проявлением побочных эффектов лекарственных средств [Athanasiau *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2014]. Высокая мощность анализа обеспечивается

исключительной масштабностью исследований. В связи с этим одной из главных проблем является аккуратный анализ и правильная биологическая интерпретация массивов данных. Национальный институт геномных исследований США устанавливает крайне строгие критерии качества исследований: количество проанализированных индивидуальных полиморфизмов должно составлять не менее 100 000, а уровень значимости ассоциации – не более 0,00001 [Hindorff *et al.*, 2009].

Мета-анализ GWAS успешно выявил, по крайней мере, 19 генов и метаболических путей патогенеза возрастной макулярной дегенерации (ВМД), включая ассоциированные с системой комплемента (CFH, C2 / CFB, C3 и CFI), липопротеинами высокой плотности (LIPC и CETP), внеклеточным или коллагеновым матриксом (TIMP3, COL8A1 and COL10A1) и сигнальным путем ангиогенеза (Vegfa) [Fritsche *et al.*, 2013]. К сожалению, метод позволяет выявлять достаточно мало функциональных SNP [Cirulli, Goldstein, 2010], а его разрешающая способность, похоже, ограничена распространенными аллелями, обладающими малыми эффектами [Maher, 2008]. ПГАА не дает окончательного ответа на вопрос, продукт какого именно гена участвует в контроле комплексного признака. Более того, зачастую по результатам исследования невозможно указать ни на какие определенные патогенетические механизмы [Gibson, 2010; Mitsui, Tsuji, 2014].

Многие нейродегенеративные заболевания связаны с рядом сопутствующих заболеваний и/или изменений в уровне лабораторно определяемых маркеров, некоторые из которых, в свою очередь, ассоциированы с генетическими факторами восприимчивости, занесенными в каталог NHGRI GWAS (<http://www.genome.gov/26525384>). Например, болезнь Паркинсона ассоциирована с наличием в анамнезе аффективных расстройств и уровнем урата в сыворотке. Такие ассоциации дают возможность изучать генетические профили риска, связанные с коморбидными клиническими фенотипами в качестве факторов риска нейродегенеративных заболеваний. Так, при выявлении генетических профилей риска для дополнительных эпидемиологических и клинических факторов с использованием данных GWAS, варианты, ассоциированные с развитием шизофрении и болезни Крона, оказались в значительной степени связанными с риском развития болезни Паркинсона [Nalls *et al.*, 2014]. Интересно, что, несмотря на существенное сходство клинических и патологических особенностей многих нейродегенеративных заболеваний, на удивление мало идентифицированных в исследованиях GWAS генетических вариантов показывают кросс-ассоциации. На примере болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера показано, что таким образом можно выявлять гены, расположенные в патологическом каскаде событий «ниже» генов, отвечающих за основную часть предрасположенности к развитию заболеваний [Moskvina *et al.*, 2013]. При этом гены, функционально объединенные участием в одном метаболическом пути, вероятно, могут

совместно влиять на предрасположенность к развитию нейродегенеративных заболеваний, даже в тех случаях, когда для отдельно взятых SNPs значимых ассоциаций не выявляется [Baranzini *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013; O'Dushlaine *et al.*, 2011; Ramanan, Saykin, 2013; Wang, Li, Hakonarson, 2010]. Некоторые гены, идентифицированные при помощи такого подхода, обладают незначительным влиянием на риск развития заболевания, однако представляются более перспективными терапевтическими мишенями [Hirschhorn, 2009; Penrod, Cowper-Sal-lari, Moore, 2011]. Таким образом, концепция интегративных исследований с привлечением результатов GWAS представляется мощным инструментом для повышения эффективности приложения результатов фундаментальных исследований к клинической практике [Ramanan, Saykin, 2013].

### 1.2.3 Технологии массового параллельного секвенирования транскриптома

Транскриптомный анализ - исследование совокупности всех кодирующих и некодирующих последовательностей РНК в данном типе клеток или конкретной ткани, - является ценным инструментом для характеристики и понимания молекулярных основ вариации фенотипа и позволяет исследовать первый уровень реализации генетической информации, заключенной в геноме [Buil *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2013; Hassan, Saeij, 2014; Melé *et al.*, 2015]. Структура транскриптома сложно организована и постоянно изменяется в зависимости от стадий клеточного цикла, от типа клеток и тканей, от стадий развития организма, от состояния тканей и органов. На сегодняшний день задачи транскриптомики как науки частично перекрываются с задачами функциональной геномики и заключаются прежде всего в выявлении и изучении условий для формирования характерной для определенных клеток и тканей структуры транскриптома, предопределенной геномными сигналами, в том числе регуляторными сигналами транскрипции (промоторы, сайленсеры, энхансеры, граничные элементы/инсуляторы, сигналы завершения синтеза РНК-полимеразой и т. д.), сплайсинга и пост-транскрипционных процессов (взаимодействия с микроРНК (miRNA) или короткими интерферирующими РНК (siRNA) и т.д.).

Методология массового параллельного секвенирования позволяет проводить транскриптомные исследования с высокой эффективностью и высоким уровнем разрешения [Dijk van *et al.*, 2014; Dong, Chen, 2013; Finotello, Camillo Di, 2015; Wang, Gerstein, Snyder, 2009]. Тем не менее, анализ изменения экспрессии генов при помощи технологии RNA-seq осложняется вариацией, создаваемой большим количеством сложно взаимодействующих факторов биологической и экспериментальной природы [Fonseca, Marioni, Brazma, 2014; Sultan *et al.*, 2014]. В частности, источником вариации могут служить синтезирование кДНК при помощи random-праймеров или процессы лигирования адаптеров [Dijk van, Jaszczyszyn, Thermes, 2014]. Считается, что формирование вторичных структур РНК может создавать

неравномерность покрытия, но такого рода ошибки сложно обнаружить. Известно, что различные технологические платформы характеризуются определенными систематическими ошибками секвенирования [Frey *et al.*, 2014; Hansen, Brenner, Dudoit, 2010; Pickrell *et al.*, 2010], к примеру, Illumina - некоторой избирательностью по отношению к генам с более протяженной последовательностью [Oshlack, Wakefield, 2009]. Интересно, что в условиях эксперимента на достоверность результатов анализа дифференциальной экспрессии может оказывать влияние не столько увеличение глубины прочтения [Bashir, Bansal, Vafna, 2010; Liu *et al.*, 2013], сколько количество биологических реплик [Rapaport *et al.*, 2013].

Результаты исследований показывают, что исследование профилей экспрессии генов в качестве эндотипов заболеваний со сложным характером наследования [Gottesman, Gould, 2003; Leboyer *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2010], способствует выявлению ассоциированных с риском развития заболевания кандидатных генов. Для приоритизации дифференциально экспрессирующихся генов используются данные о функциональной аннотации [Tiffin *et al.*, 2005], экспрессии генов [Codina-Solà *et al.*, 2015; Curtis, Oresic, Vidal-Puig, 2005], изменений последовательности гена [Adie *et al.*, 2005; Yousef, Moghadam Charkari, 2015], белок-белковых взаимодействиях [Gunev, Oliva, 2012; Smedley *et al.*, 2014] и/или их комбинации [Doncheva, Kasprowski, Albrecht, ], а также результаты полногеномных исследований [Holmans *et al.*, 2009]. Такой подход показал себя чрезвычайно эффективным, в частности, при изучении генетических факторов, влияющих на риск развития спорадических форм БА [Zou *et al.*, 2010].

Генетические варианты, располагающиеся в транскрибируемых (кодирующих или некодирующих) областях генома способны оказывать влияние на экспрессию или функциональность кодируемой последовательности. Сочетание определенных полиморфизмов у одного человека может привести к развитию патологического процесса [Zou *et al.*, 2012]. При этом, поскольку подавляющее большинство ассоциированных с заболеваниями полиморфизмов, по результатам исследований GWAS, располагается в некодирующих областях генома, потенциально такие варианты способны выступать в качестве маркеров экспрессионных локусов количественного признака, eQTL [Cheung *et al.*, 2005]. Секвенирование транскриптома показало свою эффективность также в определении профилей специфичных полиморфизмов (SNPs) в транскрибируемых кодирующих и некодирующих РНК (мРНК и нкРНК), хотя некоторые варианты, приводящие к потере продукта гена, не могут быть выявлены. Совместный анализ результатов генотипирования и данных RNA-seq предоставляет уникальную возможность для определения и сопоставления генетических вариаций и уровня экспрессии генов в ассоциированных локусах при развитии заболевания [Majewski, Pastinen, 2011; Marriage *et al.*, 2014]. Секвенирование пула кДНК (RNA-seq) позволяет также аннотировать новые белок-кодирующие гены, и альтернативные сплайс-варианты генов,

играющие роль в развитии комплексных заболеваний [Licatalosi, Darnell, 2010; Wang, Cooper, 2007]. Так, доказано участие ретинальных изоформ генов *RPGR* и *BBS3* [Kirschner *et al.*, 1999; Pretorius *et al.*, 2010] и мутаций в генах, кодирующих компоненты сплайсосомы - *PRPF31*, *PRPF3*, *PRPF8* [Mordes *et al.*, 2006], в развитии дегенеративных заболеваний сетчатки. Большую ценность представляет и возможность проведения базовых исследований разнообразных функций некодирующих РНК в норме и в патологических процессах с помощью технологий NGS [Deo *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2014; Soreq *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2007]. Так, показано, что инактивация *DICER1*, эндонуклеазы, необходимой для производства и функционирования зрелых микроРНК, оказывает влияние на процессы дегенерации сетчатки [Damiani *et al.*, 2008], а токсичность РНК Alu играет роль в развитии ВМД [Kaneko *et al.*, 2011].

Принципиально важно, что технологии NGS сделали осуществимой идентификацию редких аллелей предрасположенности. Фактически, реализацией проектов «1000 геномов» [Abecasis *et al.*, 2012] и NHLBI Exome Sequencing Project [Fu, O'Connor, Akey, 2013] была открыта новая эра ассоциативных исследований комплексных заболеваний. Так, направленное ре-секвенирование локусов GWAS в соответствии с гипотезой о том, что редкие генетические варианты, влияющие на развитие комплексного признака, могут быть колокализованы с распространенными аллелями [Gibson, 2011], привело к идентификации ассоциированных с ВМД редких кодирующих вариантов: R1210C в гене *CFH* [Raychaudhuri *et al.*, 2011] и G119R в гене *CFI* [Koolwijk van *et al.*, 2012]. Однако, несмотря на огромный объем данных и широкие границы масштабируемости, массовое параллельное секвенирование остается дорогостоящей технологией, с достаточно высокими требованиями к планированию и контролю качества на каждом этапе эксперимента [Ratnapriya, Swaroop, 2013; Yang *et al.*, 2015].

Результаты межвидового анализа экспрессии генов, даже с учетом принадлежности генов к определенному семейству, совместимы с центральной гипотезой функциональной аннотации геномов, которая утверждает, что при одном уровне расхождения последовательности функционально ортологичные гены более схожи, чем паралогичные [Chen, Zhang, 2012]. Возможно, функциональное сходство гомологичных генов в первую очередь определяется их «сетевыми» взаимодействиями, а не эволюционной историей [Rogozin *et al.*, 2014]. Установлено, что экспрессия генов часто консервативна, и между транскрипционными профилями одной и той же ткани человека и мыши, возможно, больше сходства, чем между транскрипционными профилями разных тканей в пределах одного вида [Ala *et al.*, 2008; Bergmann, Ihmels, Barkai, 2004; Tsaparas *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2007]. А вот набор преимущественно используемых альтернативных изоформ транскриптов между видами разительно отличается [Barbosa-Morais *et al.*, 2012; Merkin *et al.*, 2012]. Эти данные были дополнительно подтверждены анализом ассоциированных гистоновых меток [Lin *et al.*, 2014].

По данным транскриптомных исследований на микрочипах показано, что глобальные сети дифференциально экспрессирующихся генов, характерных, в частности, для мозга, достаточно консервативны у различных биологических видов [Bergmann, Ihmels, Barkai, 2004], и – что особенно ценно – позволяют выделить маркерные гены даже для доклинических стадий заболевания. Так, при анализе транскриптома 5XFAD трансгенных мышей в возрасте, предшествующем образованию характерных внеклеточных депозитов амилоидного пептида, были определены специфические функциональные аннотации для дифференциально экспрессирующихся генов фронтальной коры, повреждающейся при развитии БА, и мозжечка, который, как правило, патологические изменения не затрагивают [Kim *et al.*, 2012].

Интересно, что межвидовые различия транскрипционных профилей могут давать представление об отдельных генах, контролирующих развитие заболевания. Так, было показано, что ген пресенилина 1 (*PSEN1*) в сильной степени ко-экспрессируется с маркерами олигодендроцитов у человека, но не у мыши [Miller, Horvath, Geschwind, 2010]. Исследователи предполагают, что с эволюционными изменениями в экспрессии форм *PSEN1* в контексте нейрон-олигодендроцитных взаимодействий могут быть связаны различия патологических изменений, выявляемые при развитии БА у человека и моделировании заболевания с использованием мышей. Однако, основные модули высоко-коэкспрессирующихся у мыши генов были выявлены в этом исследовании и у человека.

Известно о существовании расовых различий в распространенности заболеваний человека, в частности ВМД [Bressler *et al.*, 2008], глаукомы [Quigley, Broman, 2006] и болезни Бехчета [Zouboulis, 1999], а также о линейных различиях в биологических реакциях, таких как индуцированная гибель фоторецепторных клеток [Matsumoto *et al.*, 2014] и ангиогенез [Rohan *et al.*, 2000] у мыши, что свидетельствует о влиянии различных генетических факторов. Поэтому при использовании в транскриптомном исследовании модельных животных (по крайней мере, трансгенных мышей) возможно, требуется проводить комплексный одномоментный анализ с использованием нескольких групп линейных животных.

### **1.3 Роль метаболического состояния мозга в нейродегенеративных процессах**

Нарушения метаболического состояния мозга и нейрональной пластичности считаются одной из ведущих причин развития психических расстройств и нейродегенеративных заболеваний [Kondo *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2010; Stork, Renshaw, 2005; Wood *et al.*, 2009; Yildiz-Yesiloglu, Ankerst, 2006]. В качестве неинвазивных инструментов визуализации метаболитов используются методы магнитно-резонансной спектроскопии [Kondo *et al.*, 2011; Maddock, Buonocore, 2012], и протонного магнитного резонанса, (1)H-MRS [Chen *et al.*, 2012], в том числе в сочетании со стандартными тестами на когнитивные функции. Показано, что изменения соотношения содержания определенных метаболитов можно рассматривать в



качестве надежных диагностических маркеров различных патологических процессов. Так, снижение энергетического метаболизма в головном мозге больного является одним из наиболее документированных отклонений при БА, а снижение метаболизма глюкозы используется для прогнозирования развития в будущем когнитивных нарушений [Landau *et al.*, 2011; Shokouhi *et al.*, 2013; Yamane *et al.*, 2014]. Показано, что у людей, страдающих БА, повышение содержания креатинфосфата (КФ) в тканях мозга сопровождается прогрессирующее слабоумие. Достоверная взаимосвязь обнаружена также между значением соотношения концентраций КФ/неорганический фосфат и результатами нейропсихологических тестов [Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000]. Некоторые исследователи связывают увеличение отношения содержания миоинозитола к содержанию креатина (mI/Cr) - с возникновением  $\beta$ -амилоидных бляшек при развитии БА [Murray *et al.*, 2014], причем изменение этого параметра регистрируются на более ранних стадиях заболевания, чем изменения содержания метаболитов *N*-ацетиласпартата (NAA).

Важной особенностью является то, что АТФ, по крайней мере, в некоторых областях головного мозга, генерируется в результате расходования пула креатинфосфата (КФ) в результате креатин-киназных реакций [Tsuji *et al.*, 1995], таким образом, значение отношения КФ/АТФ может указывать на возможность регенерации запасов АТФ [Perings *et al.*, 2000; Rabchevsky *et al.*, 2003]. При этом система КФ/креатин/изоферменты креатинкиназы выступает в качестве системы, буферизирующей энергию и осуществляющей транспорт энергии от сайтов ее производства к сайтам активного потребления [Jost *et al.*, 2002; Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000], в том числе при реализации синаптической передачи. В качестве показателя доступности трифосфатов для клеток ткани может выступать фосфатный потенциал – соотношение содержания АТФ/(АДФ\*НФ). Энергетическое состояние мозга, таким образом, отражается в обеспеченности высокоэнергетическими соединениями, в особенности АТФ и КФ [Nakai *et al.*, 2000; Plaschke *et al.*, 1999], которые необходимы для поддержания энергозатратных клеточных функций: активного транспорта, белкового синтеза, фосфорилирования и процессинга белков, поддержания внутриклеточного ионного гомеостаза, регуляции градиентов ионных концентраций, задействованных в генерации аксонного потенциала. Доказательством того, что метаболизм креатина непосредственно задействован в процессах высшей умственной деятельности, может считаться экспрессия большинства изоферментов креатинкиназы в гиппокампе и лобной коре [Kaldis *et al.*, 1996]. В качестве одной из вероятных причин развития метаболических нарушений, наблюдающихся при нейродегенеративных процессах, называется окислительный стресс. В частности показано, окислительная модификация сульфгидрильных групп активного центра изоферментов креатинкиназы снижает эффективность

креатинкиназных реакций вплоть до полного ингибирования активности фермента [Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000].

Важная, порой критическая роль состояния энергетического метаболизма мозга в развитии и прогрессии возрастных изменений памяти и патогенезе нейродегенеративных заболеваний подтверждается исследованиями, показывающими, что соединения, увеличивающие резерв энергии, могут служить нейропротекторами. Увеличение способности генерирования АТФ в ходе расходования пула КФ способно отсрочить истощение запасов АТФ, таким образом, защищая мозг от губительного влияния ишемии, гипоксии или аноксии. Так, введение креатина крысам в течение трех дней перед содержанием их в условиях гипоксии повышало в мозге отношение концентраций КФ/трифосфаты, снижало количество приступов и смертей, индуцированных гипоксией, ускоряло восстановление пула КФ и АТФ в мозге после гипоксии [Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000]. Интересно, что у здоровых добровольцев, низкий уровень КФ был ассоциирован с более высокой производительностью при решении познавательных задач, связанных с активным функционированием лобной коры, возможно также в результате эффективного восстановления резервов АТФ [Volz *et al.*, 1998]. При развитии нейродегенеративных процессов, сопровождающихся дисфункцией митохондрий, нейроны переключаются на менее эффективный, трудозатратный механизм гликолиза. Предполагается, что регистрируемые в таких ситуациях метаболические изменения, связанные со значительным увеличением образования в мозге нейропротекторных метаболитов (в т.ч. креатина и таурина), представляют компенсационный механизм, используемый нейронами для поддержания энергетического гомеостаза [Kondo *et al.*, 2014; Stork, Renshaw, 2005]. Так, в простейшей трансгенной модели БА – у мышей Tg2576, - снижение когнитивных функций регистрируется начиная с возраста 6 мес, а отложения амилоидного пептида в форме бляшек – к возрасту 10 мес. При этом показано, что уже в возрасте 1-3 мес, задолго до манифестации поведенческих нарушений, во всех проанализированных районах мозга (за исключением фронтальной коры) трансгенных мышей выявляются многочисленные метаболические нарушения по сравнению с контрольной группой дикого типа [Lalande *et al.*, 2014]. Интересно, что изменения в метаболизме креатина ассоциированы с функциональным полиморфизмом гена важного медиатора синаптической пластичности -нейротрофического фактора мозга (*BDNF*), приводящего к замене валина на метионин в 66 кодоне [Dincheva, Glatt, Lee, 2012]. Таким образом, возможно, существуют генетические факторы предрасположенности к изменениям в энергетическом метаболизме мозга, наблюдаемым при развитии нейродегенеративных заболеваний.

#### **1.4 Общность и различия патогенетических механизмов развития нейродегенеративных заболеваний в мозге и в сетчатке на примере болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД)**

На сегодняшний день установлен ряд универсальных механизмов нейродегенерации как при естественном старении, так и при развитии заболеваний [Pahnke *et al.*, 2014; Sivak, 2013; Xie *et al.*, 2014]. При этом многие исследования направлены на разрешение актуальной проблемы, связанной с установлением диагноза на самых ранних стадиях заболевания, когда клинические симптомы еще не проявляются [Jicha, Carr, 2010; Sperling, Mormino, Johnson, 2014]. Несмотря на заметное различие клинических картин и патологических особенностей нейродегенеративных заболеваний, показано, что в их развитии и прогрессии помимо нарушения фолдинга белков с их агрегацией [Bolshette *et al.*, 2014], задействованы одни и те же процессы, в том числе изменения многочисленных сигнальных каскадов [Bowles, Jones, 2014; Cruz e Silva da *et al.*, 2010], нарушения функций системы убиквитин-зависимой деградации белка [Zhang *et al.*, 2014a] и шаперон-опосредованной защиты [Blair *et al.*, 2015; Ou *et al.*, 2014], окислительный стресс [Thanan *et al.*, 2015], нарушения процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях [Cavallucci, Nobili, D'Amelio, ; Celardo, Martins, Gandhi, 2014], гиперпродукция оксида азота [Virarkar *et al.*, 2013], перегрузка нейронов кальцием [Brini *et al.*, 2013; Zündorf, Reiser, 2011], активация микроглии [Guillot-Sestier, Town, 2013; Mosher, Wyss-Coray, 2014; Perry, Holmes, 2014], избирательная апоптотическая гибель нейронов. В то же время в исследовании на 10-ти различных животных моделях, охватывающих все основные группы наследственной дегенерации сетчатки, было показано, что апоптоз играет лишь незначительную роль в нейродегенеративных процессах [Arango-Gonzalez *et al.*, 2014], в отличие от альтернативных механизмов клеточной гибели, имеющих общие особенности для основных модельных мутаций.

Высказано предположение о том, что вероятным триггером развития спорадических форм нейродегенеративных заболеваний являются некодирующие РНК, в частности, микроРНК [Hébert *et al.*, 2009; Hébert, Strooper De, 2009; Savvateeva-Popova *et al.*, 2008]. Важными патофизиологическими событиями, способствующими возникновению и развитию нейродегенеративных заболеваний, являются также воспаление и активация иммунной системы [Hickman, Houry El, 2014; Latta, Brothers, Wilcock, 2015; Serpente *et al.*, 2014], причем данное представление поддерживается и данными комплексных исследований [Crespo *et al.*, 2012]. В серии исследований с привлечением лабораторных животных было убедительно продемонстрировано, что индукция воспаления в мозге может приводить к развитию патоморфологических и клинических симптомов, аналогичных симптомам нейродегенеративных процессов, а экзогенные и эндогенные противовоспалительные факторы

оказывают нейропротекторное действие [Lista, Dubois, Hampel, 2015; Sabharwal, Wisniewski, 2014]. При сравнении результатов количественной оценки генной экспрессии с данными полногеномного ассоциативного исследования было показано, что во многих случаях развитие нейродегенеративных заболеваний связано с чрезмерно повышенной или, наоборот, недостаточной активностью определенных генов [Zou *et al.*, 2012]. Ниже общие черты и различия в патогенетических механизмах развития нейродегенеративных заболеваний рассматриваются на примере болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД).

#### 1.4.1 Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, признанное на сегодняшний день одной из самых распространенных причин старческого слабоумия. По прогнозируемым данным, в связи со старением населения Российской Федерации количество пациентов с БА к 2020 г. увеличится на 28% и приблизится к 1% населения страны [Кадыков А.С., 2009]. Нарушения когнитивных функций существенно снижают качество жизни пациентов и их родственников. С учетом ограниченных возможностей диагностики, лечения и социальной помощи больным, очевидно, что связанные с болезнью Альцгеймера экономические затраты общества огромны.

Характерным патоморфологическим изменением является диффузное распространение в головном мозге белковых агрегатов: экстраклеточных «сенильных» амилоидных бляшек [Tiraboschi *et al.*, 2004a; Tiraboschi *et al.*, 2004b] и нейрофибриллярных клубков в цитоплазме нейронов [Hernández, Avila, 2007]. Гистологические исследования показывают значительное уменьшение числа нейронов коры мозга, гиппокампа, а также базального ядра Мейнерта и голубого пятна ствола мозга. У пациентов с диагностированной БА наблюдается церебральная атрофия с уменьшением объема и массы мозга, атрофией и сужением извилин коры головного мозга, углублением борозд, а также расширением желудочковой системы. Отмечается дегенерация синапсов и дендритов сохранившихся нейронов. На ранних стадиях заболевания изменения выявляются в энторинальной коре (медиобазальные отделы лобных долей), затем распространяются на структуры гиппокампа, базальные ганглии и височную кору [Braak, Braak, 1991; Braak, Braak, 1998; Jicha, Carr, 2010; Riley, Snowden, Markesbery, 2002]. Клинически нарушение связей между энторинальной корой и гиппокампом выражается нарушениями кратковременной памяти [Kirkby, Higgins, 1998; Triarhou, 2008]. Дальнейшее распространение процессов нейродегенерации с вовлечением структур, ответственных в том числе за осуществление связей между корой и другими отделами центральной и периферической нервной системы, проявляется более грубыми нарушениями когнитивных функций [Haj El *et al.*, 2015] и приводит к полной деградации личности. Таким образом,

биологическое распространение патологических процессов предшествует и определяет развитие клинического фенотипа заболевания от первой до конечной стадии [Gomez-Isla *et al.*, 2008]. Специфический патологический процесс в мозге неизбежно развивается на фоне действия ряда неспецифических патологических факторов, в частности атеросклероза сосудов головного мозга и недостаточности антиоксидантных систем. Следует отметить, что у когнитивно-сохранных людей пожилого возраста могут присутствовать гистопатологические изменения, неотличимые от наблюдаемых при БА [Nelson *et al.*, 2012; Price, Morris, 1999]. Кроме того, в мозге пациентов с диагностированной БА могут выявляться сосудистые нарушения [Bell, Zlokovic, 2009; Hommet *et al.*, 2011; la Torre de, 2002] и участки гиперинтенсивности белого вещества [Kandiah *et al.*, 2015], которые - согласно принятым на сегодняшний день стандартам - не являются патогномичными особенностями БА [Nelson *et al.*, 2012].

Определенный успех в выяснении механизмов развития БА связан с генетическими исследованиями. Так называемые «семейные» формы заболевания, составляющие лишь около 10% случаев БА, характеризуются ранним началом (условно до 65 лет, но чаще в возрасте 40–55 лет) и аутосомно-доминантным характером наследования. В настоящее время идентифицированы три гена, мутации которых приводят к возникновению аутосомно-доминантных форм БА: ген амилоидного предшественника (*APP*) на 21-й хромосоме; а также гены, кодирующие ферменты метаболизма амилоида: пресенилин-1 (*PSN1*) - на 14-й; и пресенилин-2 (*PSN2*) - на 1-й хромосоме человека [Chouraki, Seshadri, 2014; Hardy, Selkoe, 2002; Tanzi, 2013]. Носители мутаций в гене *APP* встречаются в 3–5% всех семей; мутации в гене *PSN1* - в 60–70% всех случаев семейной формы БА и характеризуются полной пенетрантностью. Мутации в гене *PSN2* характеризуются неполной пенетрантностью и встречаются намного реже [Zou *et al.*, 2014]. Впоследствии было показано, что пресенилины участвуют в процессинге *APP*, и мутации в соответствующих генах приводят к увеличению продукции амилоидогенной формы A $\beta$ 42 [Borchelt *et al.*, 1996]. Среди множества выявленных генетических факторов, ассоциированных с предрасположенностью к спорадическим формам БА, наиболее сильным и единственным четко доказанным эффектом обладает аллель  $\epsilon 4$  гена аполиipoproteина E, *APOE*, продукт которого является компонентом сенильных бляшек [Kleiman *et al.*, 2006]. *APOE* кодирует один из ключевых белков метаболизма липопротеинов и холестерина, участвующий в образовании и секреции липопротеинов [Swertfeger, Hui, 2001], и, предположительно, в процессах клеточного роста, а также регенерации тканей [Rebeck *et al.*, 1993]. *ApoE* имеет три распространенные изоформы (E2-4), кодируемые тремя аллелями гена ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , и  $\epsilon 4$ , соответственно) в локусе 19q13.2, причем аллели различаются по частоте распространения в популяции. Хотя во многих

независимых исследованиях было подтверждено, что аллель  $\epsilon 4$  гена *APOE* у больных с поздней формой БА встречается чаще, чем у людей пожилого возраста без признаков деменций, в то же время в ряде этнических групп такая ассоциация слабо выражена [Duara *et al.*, 1996; Hendrie *et al.*, 1995; Sayi *et al.*, 1997]. При этом до 75% носителей одной копии  $\epsilon 4$  не заболевают БА, и до 50% пациентов с диагностированной БА не несут ни одной аллели  $\epsilon 4$ . Было отмечено, что при развитии БА у носителей генотипа  $\epsilon 4\epsilon 4$  количество амилоидных отложений на 20-30% выше, чем у носителей генотипов  $\epsilon 3\epsilon 4$  и  $\epsilon 3\epsilon 3$  [Corder *et al.*, 1993], возможно вследствие влияния аллели  $\epsilon 4$  на процессы агрегации белка. Исследования на клеточных моделях и трансгенных животных показывают, что мутантные формы генов пресенилинов, *APP* и *APOE* изменяют чувствительность клеток различного типа, в том числе нейронов, к апоптозу и внутриклеточный  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз, могут влиять на различные системы сигнальной трансдукции, на процессинг белка-предшественника амилоида *APP* и аккумуляцию наиболее нейротоксичных форм  $\text{A}\beta$ . Впрочем, хотя белок-предшественник амилоида, несомненно, играет значительную роль в патогенетических процессах при развитии БА, сведения о генетических сетях, регулирующих его эффекты, ограничены [Wang *et al.*, ].

Согласно данным исследований GWAS, риск развития спорадических форм БА может быть ассоциирован с генами, продукты которых участвуют в липидном метаболизме (*APOE*, *CLU*, *PICALM* и *ABCA7*), в гомеостазе клеточной мембраны (*SORL1*, *BIN1*, *CD2AP*), в иммунных процессах (*TREM2*, *CR1*, *CD33*, *MS4A4A*, *MS4A6A*, *MS4A6E*), и процессах нейрогенеза (*EPHA1*) [Bertram *et al.*, 2007]. Их влияние на риск развития заболевания, в основном, гораздо слабее, чем у аллелей *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *APOE* [Chouraki, Seshadri, 2014], при этом выявляется синергическое взаимодействие эффекта некоторых полиморфизмов с эффектом аллельного варианта *APOE* [Barral *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2010]. В ряде исследований установлено, что полиморфизмы ядерного гена митохондриального фактора транскрипции А (*TFAM*), ассоциированы с риском БА [Alvarez *et al.*, 2008; Belin *et al.*, 2007; Günther *et al.*, 2004]. Мутация *TREM2* R47H выявляется редко, и ее наличие не означает стопроцентной вероятности развития БА, однако эффект сравним с эффектом аллельной вариации  $\epsilon 4$  гена *APOE* [Guerreiro *et al.*, 2013]. Следует отметить, что известные ограничения метода геномных ассоциаций часто не позволяют получать убедительные данные, подтверждаемые в независимых исследованиях.

Несмотря на огромный объем накопленных в последние десятилетия знаний о биологических основах болезни Альцгеймера, этиология заболевания до сих пор остается неясной. Более 20 лет ведущей гипотезой в области исследования БА оставалась «амилоидная» гипотеза, согласно которой формирование амилоидных бляшек и является основной причиной, вызывающей гиперфосфорилирование тау-белка с последующим образованием нейрофибриллярных клубков, разрушением синапсов, гибелью нейронов и, как следствие,

прогрессирующей когнитивной дисфункцией. С появлением новых экспериментальных данных положения «амилоидной» гипотезы подвергаются ревизии. Так в настоящее время формами амилоида, проявляющими наибольшую токсичность, принято считать растворимые амилоидные олигомеры, содержащие в основном A $\beta$ 42 (см. ниже). В рамках амилоидной гипотезы белок-предшественник амилоида APP подвергается в несколько этапов протеолитическому процессингу либо по амилоидогенному пути, либо по неамилоидогенному с участием различных ферментов-секретаз. Амилоидогенный путь процессинга APP инициируется под действием  $\beta$ -секретазы BACE1 с расщеплением белка-предшественника по специфическому внеклеточному домену. Далее в результате действия  $\gamma$ -секретазного комплекса образуются амилоидные пептиды длиной от 36 до 42 аминокислотных остатков. Принято считать, что именно увеличение соотношения A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 приводит к разворачиванию патологического каскада. Альтернативный неамилоидогенный путь инициирует  $\alpha$ -секретаза, в этом случае в итоге образуются более короткие пептиды P3 длиной 24 или 26 аминокислотных остатков и растворимый фрагмент APP- $\alpha$ . В норме амилоидный пептид принимает участие в регуляции процессов роста нейритов, их ветвления, в аксональном наведении, синаптогенезе и функционировании синапсов, пролиферации и дифференцировке клеток, миграции и выживаемости нейронов, поддержании синаптической пластичности, регулирование функций NMDA рецепторов гиппокампа, долговременной потенциации и пространственной памяти, и большую часть этих функций, по-видимому, выполняет APP $\alpha$  [Lazarov, Demars, 2012], но и сам белок-предшественник может выступать в роли рецептора, участвующего в модулировании роста нервных окончаний. Т.о. функции белковых продуктов генов, вовлеченных в патогенез БА, могут быть совершенно не связаны с их патогенетическими свойствами.

Образование нейрофибриллярных клубков связано не столько с мутациями, как в случае отложений амилоида, сколько с модуляцией активностей ферментов: ненормальной активацией киназ и снижением активности фосфатазы. Важную роль в процессах аномального фосфорилирования играют циклин-зависимая киназа 5 (CDK5) и PIN1 (последующее направленное фосфорилирование по Ser/Thr-остаткам). Конформационные изменения, катализируемые PIN1, влияют на процессинг и белка-предшественника амилоида, и тау-белка. Интересно, что у мышей-нокаутов по *Pin1* была выявлена активация амилоидогенного пути процессинга белка-предшественника амилоида с сопутствующим накоплением A $\beta$ 42, а также аномальное фосфорилирование тау-белка, дегенеративные изменения популяций нейронов и нарушения в моторной и поведенческой сферах [Pastorino *et al.*, 2006]. Способность тау-белка стабилизировать микротрубочки отчасти объясняется наличием у него нескольких фосфатных групп, однако гиперфосфорилированный тау-белок не способен выполнять свою функцию, в результате нарушается аксональный транспорт. Агрегаты фосфорилированного тау формируют

парные спиральные нити, которые в дальнейшем объединяются в нерастворимые клубки. Его токсическое действие усиливается благодаря изолированию нормального тау. Вопрос о связи амилоидной и тау-патологий пока остается открытым, хотя экспериментальные данные свидетельствуют о том, что молекулярные механизмы токсичности отложений амилоидного пептида и гиперфосфорилированного тау-белка тесно связаны между собой, в том числе участием уже упомянутых киназ PIN1 и CDK5, гликоген синтазы-киназы 3 бета (GSK3 $\beta$ ), пептидилпролил цис/транс изомеразы и регулятора кальциейрина 1, RCAN1 [Lloret *et al.*, 2015].

В пользу амилоидной гипотезы свидетельствует тот факт, что мутации в генах *PS1* и *PS2*, а также аллель  $\epsilon 4$  *APOE* способствуют образованию наиболее «амилоидогенной» формы бета-амилоида, и приводят к избыточному накоплению амилоидного пептида в тканях мозга ещё до наступления клинических симптомов. Патологические признаки, свойственные болезни Альцгеймера, проявляются также у трансгенных животных, экспрессирующих мутантные формы человеческого гена *APP* [Bilkei-Gorzo, 2014; Dewachter *et al.*, 2000]. Амилоидная и тау-патология успешно воспроизводятся в исследованиях по 3D культивированию клеток нервной системы человека [Choi *et al.*, 2014]. С другой стороны, больные с некоторыми мутациями в генах *PSEN1* и *PSEN2* характеризуются отложением лишь «диффузных» непатогенных форм амилоидных бляшек. Кроме того, в спектре патологических мутаций гена *APP* существуют так называемая «лондонская» мутация [Talarico *et al.*, 2010], вызывающая сравнительно небольшое увеличение уровня А $\beta$  при раннем начале БА, и так называемая «шведская» мутация [Almkvist *et al.*, 2002], ассоциированная с более существенным увеличением содержания А $\beta$ , но с поздней манифестацией БА. Выявлена также мутация *APP*, носители которой с вероятностью в 7,5 раз большей, чем люди, у которых она отсутствует, достигают возраста 85 лет, не страдая когнитивными расстройствами [Jonsson *et al.*, 2012]. Она расположена в непосредственной близости от сайта рестрикции  $\beta$ -секретазы 1 (BACE1) и снижает эффективность работы фермента.

Всё чаще выдвигаются альтернативные модели, в которых отложения бета-амилоида включаются в общую картину заболевания в качестве следствия иных процессов, в частности изменения активности сигнальных путей инсулина в мозге [Talbot *et al.*, 2012], или же их нейротоксичность может распространяться в соответствии с прионоподобными механизмами [Yin *et al.*, 2014]. Многие исследователи связывают появление нейрофибриллярных клубков и амилоидных бляшек, а также связанные с этим модификации нейрального цитоскелета при болезни Альцгеймера и других родственных патологиях ЦНС с действием компенсаторных механизмов. В частности, избыточное фосфорилирование тау-белка может способствовать поддержанию функций мембран нейронов [Wang, Liu, 2008]. Показано, что определенное



участие в развитии нейродегенеративных изменений при развитии БА принимают белки теплового шока [Lu *et al.*, 2014; Ou *et al.*, 2014]. Установлено, что в патогенетических механизмах участвуют процессы воспаления [Nägga *et al.*, 2014], нарушения во внутриклеточном транспорте и локализации белка-предшественника амилоида и секретаз [Agostinho *et al.*, 2015], изменения липидного метаболизма [Sagin, Sozmen, 2008], а также структуры и функции митохондрий [Swerdlow, Burns, Khan, 2014]. Тем не менее, молекулярные медиаторы и причинно-следственные связи, задействованные в нейродегенеративных процессах, в значительной степени остаются неисследованными. В попытке приблизиться к созданию наиболее универсальной модели заболевания, было предложено рассматривать болезнь Альцгеймера как патогенетический «триплекс» (по Рогаеву, 1999), основными группами действующих факторов которого являются:

- 1) мутации в генах амилоидного предшественника и пресенилинов 1 и 2, и связанные с ними механизмы развития агрессивных «семейных» форм БА;
- 2) эволюционно-онтогенетические факторы, связанные со специфическими для человека изменениями в структурных или регуляторных генах (например, *APOE*), которые могут объяснить специфичность проявлений заболевания по отношению к определенным отделам мозга;
- 3) индивидуальные факторы, принимающие участие в патогенезе спорадических форм БА с поздним началом или в формировании разнообразия клинических форм БА у носителей мутаций в «главных» генах. В качестве индивидуальных факторов выступают: трофические факторы (цереброваскулярные, липопротеиновые факторы, метаболизм глюкозы, факторы роста нервов); индивидуальные особенности мозга (определяемые совокупностью генетических факторов, а также связанные с условиями раннего развития, образования, интеллектуальной деятельности); эпигенетические факторы риска БА (в том числе депрессии в анамнезе).

К настоящему времени не разработано терапевтических схем, позволяющих излечить болезни Альцгеймера или, по крайней мере, остановить ее развитие. Одной из основных причин такой ситуации обоснованно считается позднее начало терапии. Клинические проявления когнитивных нарушений подразумевают существование уже значительного количества повреждений, что делает лечение малоэффективным. Средняя продолжительность жизни после установления диагноза составляет около 7 лет. Закономерно, что ключевая роль в разработке стратегии борьбы с нейродегенерацией отводится выявлению предикторов и маркеров для максимально ранней диагностики патологического процесса. Их выявление, как и разработку эффективных способов профилактики, затрудняет неполнота знаний этиологии и патогенеза БА.

К сожалению, подходы к прижизненной постановке диагноза, базирующиеся на визуализации головного мозга с использованием методов магнитно-резонансной томографии (МРТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), ограничены в чувствительности и разрешении [Jack *et al.*, 2011; Jack, 2012; Schmand, Huizenga, Gool van, 2010]. В связи с этим широко обсуждается возможность использования для предсказания развития и прогрессии деменции изменений сенсорных и моторных систем, присутствующих у многих людей уже на ранних стадиях БА. Показано, что изменения обоняния, слуха, циркадианных ритмов и даже скорости ходьбы могут наблюдаться за 5-15 лет до первых регистрируемых когнитивных нарушений и являются значимыми факторами риска деменции альцгеймеровского типа [Hu *et al.*, 2013a; Panza, Solfrizzi, Logroscino, 2015]. Многие аспекты зрительных функций, в том числе острота зрения, цветовосприятие, контрастная чувствительность, восприятие глубины и движения, длительная адаптация к темноте также нарушаются с возрастом, причем некоторые - более избирательно в подгруппах пациентов с БА, чем в контрольных подгруппах когнитивно-сохраненных людей соответствующего возраста [Cronin-Golomb *et al.*, 1991; Risacher *et al.*, 2013]. В работах последних лет, посвященных изучению БА, в качестве альтернативного доступного и неинвазивного (по сравнению с анализом спинномозговой жидкости) маркера для изучения патологических процессов в головном мозге рассматривается сетчатка. Наиболее часто сопоставляется с патогенезом БА патогенез глаукомы [Janssen *et al.*, 2015] и возрастной макулярной дегенерации [Sivak, 2013].

#### **1.4.2 Возрастная макулярная дегенерация**

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся поражением центральной зоны сетчатки (макулы), которое становится основной причиной нарушения и необратимой потери зрения людьми пожилого возраста в развитых странах [Ratnapriya, Chew, 2013; Yonekawa, Miller, Kim, 2015]. Социально-медицинская значимость этой патологии обусловлена быстрой потерей центрального зрения и утратой общей работоспособности и отсутствием методов профилактики развития необратимых стадий заболевания.

При классификации прогрессивных стадий ВМД большинство офтальмологов выделяют «влажную», или экссудативную, и «сухую», или неэкссудативную, формы заболевания [Lookeren Campagne van *et al.*, 2014]. Основным проявлением «влажной» формы заболевания является неоваскуляризация с прорастанием сосудов из хориоидеи в сетчатку, экссудацией из новообразованных сосудов, последующим развитием отека и дегенеративных изменений с образованием фиброзного рубца [Davis *et al.*, 2005]. «Сухая» форма ВМД, встречающаяся примерно у 90% пациентов [Gehrs *et al.*, 2006], характеризуется атрофическими изменениями тканей глазного дна, в том числе обширной атрофией клеток ретинального пигментного

эпителия, миграцией пигмента, атрофическими и склеротическими изменениями хориоидеи, утолщением мембраны Бруха и прогрессивным образованием токсичных субретинальных внеклеточных отложений в форме друз [Nowak].

На сегодняшний день картировано 33 локуса, ассоциированных с ВМД [Swaroop *et al.*, 2009] и, по разным оценкам, от 33 до 50 генов, полиморфизмы в которых ассоциированы с предрасположенностью к развитию ВМД. Функциональная роль большинства выявленных вариантов в развитии ВМД остается неисследованной, однако среди кандидатных генов можно выделить перекрывающиеся группы, связанные с иммунной системой (в т.ч. *C2*, *C3*, *Cfb*, *Cfh*, *Cfd*, *Cfhr1*, *Cx3cr1*, *Hla-C*, *Il8*, *Plekha1*, *Rora*, *Serping1*, *Tlr3*, *Tlr4*), внеклеточным матриксом и клеточной адгезией (*Ace*, *Arms2*, *Col8a1*, *Col110a1*, *Cst3*, *Cxcr1*, *F13b*, *Fbln5*, *Hmcn1*, *Htra1*, *Mmp9*, *Robo1*, *Timp3 et al.*), метаболизмом липидов (*Lipc*, *ApoE*, *Abca1*, *Abca4*, *Cetp*, *Elovl4*, *Lrp6*, *Lpl*, *Vldlr et al.*), ангиогенезом (*Ace*, *Col10A1*, *Col8A1*, *Cst3*, *Fbln5*, *Gdf6*, *Htra1*, *Lrp6*, *Vegfa*, *Serpinf1*), и клеточным стрессом (*Abca4*, *ApoE*, *Arms2*, *Cst3*, *Gstm1*, *Gstp1*, *Gstt1*, *Sod2*, *Tf*, *Tlr3*, *Tlr4*) [Gorin, 2012; Miller, 2013]. Среди выявленных локусов наиболее широко представлены в различных популяциях и имеют самый сильный эффект (отношение шансов для индивидуального аллельного варианта >3) варианты *CFH* и *ARMS2/HTRA1* [Edwards *et al.*, 2005; Haines *et al.*, 2005; Jakobsdottir *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005]. Остальные генетические факторы риска, выявленные в исследованиях GWAS, в основном обладают умеренным эффектом на риск развития ВМД [Chen *et al.*, 2010b; Yu *et al.*, 2011], при этом некоторые локусы (в том числе *CFH*, *C3*, *LIPC*, *DDR1*) имеют по несколько [Fritsche *et al.*, 2013] независимо ассоциированных с риском развития заболевания аллельных вариантов. Считается, что аллели  $\epsilon 2$  и  $\epsilon 4$  гена *APOE* ассоциированы с увеличением и уменьшением риска ВМД, соответственно [McKay *et al.*, 2011]. Тем не менее не все исследования смогли подтвердить эти ассоциации [Schultz *et al.*, 2003], возможно вследствие влияния фактора возраста [Adams *et al.*, 2012].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению сложной этиологии ВМД, на сегодня ни одна из концепций не может быть принята в качестве основной [Miller, 2013]. Получены свидетельства участия в патогенетических процессах окислительного стресса, дисфункции митохондрий, сосудистых патологий, накопления токсических соединений, аутофагии и других (Damico *et al.*, 2012). По очевидным причинам исследование сетчатки у больных ВМД при БА и модельных животных является перспективной попыткой изучить механизмы возникновения и развития нейродегенеративных заболеваний, их маркеры, а также попыткой найти методы, предотвращающие гибель нейронов [Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011]. Тем не менее, на сегодняшний день число публикаций по данной проблеме невелико (в т.ч. Harvey and Durant 2014; Logue et al. 2014; Nolan et al. 2014; Ohno-Matsui 2011; Sivak 2013; Vladan and Panfoli 2012).

### 1.4.3 Общность происхождения мозга и глаза

Среди причин, позволяющих строить предположения о схожести патологических процессов, протекающих в сетчатке и головном мозге, следует назвать, прежде всего, их происхождение из одного эмбрионального зачатка. На стадии замыкания нейропоры передний конец нервной трубки (одного из эмбриональных источников нервной системы) расширяется, и его боковые стенки утолщаются, с образованием зачатков трех мозговых пузырей, один из которых, располагающийся краниально, является зачатком структур переднего мозга. По обеим сторонам переднего мозга появляются выпячивания, которые после закрытия нейропоры образуют глазные пузыри, соединенные с помощью глазных стебельков с эмбриональным мозгом. К 14-му дню эмбрионального развития крысы глазное яблоко уже хорошо различимо. Инвагинация внутренней стенки глазного пузыря приводит к формированию двухслойного глазного бокала, стенка которого является анатомическим продолжением развивающегося головного мозга и дифференцируется на все слои сетчатой оболочки. Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) развивается из наружного листка глазного бокала, нейросенсорная часть - из внутреннего его листка. Вокруг организующего центра – РПЭ - формируются все оболочки глаза. Их клеточный состав определяется миграцией эмбриональных клеток нервного гребня, диэнцефалона, переднего и промежуточного мозга. К моменту рождения сетчатка крыс состоит из 7ми слоев. К первому постнатальному месяцу формируется 10 слоев, аналогичных слоям сетчатки человека. Интересно, что в раннем своем развитии ретинальные клетки демонстрируют способность к регенерации аксональных отростков *in vitro* [Skaper, 2012]. Эта способность с возрастом уменьшается и полностью теряется у крыс к моменту открытия глаз. Можно предположить, что тесное анатомо-физиологическое единство глаза и мозга создают предпосылки для развития сходных нейродегенеративных процессов в структурах мозга пациентов с болезнью Альцгеймера и сетчатке больных ВМД.

### 1.4.4 Эпидемиологические и клинические исследования БА и ВМД

ВМД и БА относятся к группе комплексных возраст-зависимых заболеваний [Chakravarthy *et al.*, 2010; Sindi, Mangialasche, Kivipelto, 2015], возникающих в результате взаимодействия генетических и средовых факторов. В число последних входят васкулярные факторы риска, в частности, артериальная гипертензия [Kennelly, Lawlor, Kenny, 2009], атеросклероз [Casserly, Topol, 2004], курение [Anstey *et al.*, 2007], этническая принадлежность. Фактором риска для ВМД является низкий уровень липопротеинов высокой плотности (холестерола ЛПВП), а для обоих заболеваний – повышенные концентрации холестерина в сыворотке крови [Kivipelto *et al.*, 2001], хотя данная ассоциация подтверждается не всеми исследователями [Reitz *et al.*, 2004]. Некоторые авторы утверждают, что несмотря на

существование общих средовых факторов риска и перекрытие молекулярных механизмов заболеваний, не существует генетических факторов, которые бы одновременно повышали риск развития БА и ВМД [Keenan, Goldacre, Goldacre, 2014]. Более того, обнаружено, что больным разными формами возрастной деменции лечение макулярной дегенерации назначается в 20 раз реже по сравнению с общей популяцией. Однако во многих исследованиях выявлены ассоциации между поздними стадиями ВМД и развитием когнитивных нарушений [Clemons, Rankin, McBee, 2006; Lindekleiv *et al.*, 2013; Mandas *et al.*, 2014].

Плотность и размер друз в целом коррелируют с тяжестью центральной потери зрения и риском развития неоваскулярной формы ВМД [Seddon *et al.*, 2011; Sisternes de *et al.*, 2014], однако есть данные о том, что корреляции не наблюдается [Friberg, Bilonick, Brennen, 2012]. Описано накопление амилоидного пептида в форме бляшек в сетчатке пациентов с БА [Ho *et al.*, 2014], а также в сетчатке трансгенных модельных животных [Parnell *et al.*, 2012], в частности, у мышей APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9, коэкспрессирующих мутантный ген пресенилина (PS) 1 $\Delta$ E9 и ген APP человека с двойной шведской мутацией, в сравнении с контрольной группой [Ding *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Ning *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2009]. А $\beta$ -положительные бляшки у мышей APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 были выявлены между ганглионарным и внешним ядерным слоями сетчатки. Поскольку число и размер бляшек коррелировали со стадией патологического процесса в мозге, метод был рекомендован к использованию в диагностической практике доклинических стадий болезни Альцгеймера [Koronyo *et al.*, 2012; Koronyo-Namaoui *et al.*, 2011]. Накопление амилоидного пептида и снижение толщины сетчатки также характерны для трансгенных крыс TgF344-AD, причем у животных регистрируются проявления воспалительного ответа - инфильтрация внутренних слоев сетчатки клетками микроглии и накопление компонента комплемента C3 у мембраны Бруха (признак активации комплемента) [Tsai *et al.*, 2014]. Впрочем, некоторые исследователи отмечают, что месторасположение отложений амилоидного пептида в сетчатке при развитии ВМД и БА различается [Parisi *et al.*, 2001]. Кроме того, показано, что некоторое количество А $\beta$  накапливается в клинически здоровых мозге и сетчатке (прежде всего, на границе раздела между пигментным эпителием и мембраной Бруха), а количество этих отложений увеличивается с возрастом [Chételat *et al.*, 2013; Hoh Kam, Lenassi, Jeffery, 2010]. Таким образом, для решения вопроса о том, каким образом трактовать отложения амилоида для оценки вероятности развития в будущем БА необходимы дальнейшие исследования.

### 1.4.5 Молекулярное сходство между депозитами: друзы и сенильные бляшки

Как отражено в таблице 1, предпосылки для проведения параллелей между ВМД и БА дает также сравнение молекулярного состава специфичных депозитов [Johnson *et al.*, 2002; Sivak, 2013].

**Таблица 1. Особенности депозитов, характерных для БА и ВМД.**

Признак	БА	ВМД
Локализация поражений в сетчатке	Ганглионарный слой, слой нервных волокон макулярной зоны	РПЭ, фоторецепторные клетки
Локализация отложений бета-амилоида (Аβ)	Основной компонент сенильных бляшек	Компонент субретинальных друз
Локализация отложений фосфорилированного тау-белка	Компонент нейрофибриллярных клубков	Ассоциации с друзами не выявлено

Согласно данным многочисленных исследований, в сложном молекулярном составе друз в сетчатке больных ВМД [Booij *et al.*, 2010; Bowes Rickman *et al.*, 2013; Crabb *et al.*, 2002; Curcio *et al.*, 2011; Mullins *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010] и сенильных бляшек в мозге пациентов с диагностированной БА [Armstrong, 2009; Güntert, Döbeli, Bohrmann, 2006] помимо амилоидного пептида обнаружено множество общих компонентов: ионы металлов (Fe, Cu, Zn), медиаторы воспаления, протеазы (включая убиквитин), α2-макроглобулин, холинэстеразы (включая ацетилхолинэстеразу), аполипопротеин Е, структурные белки мембран. В состав и друз и сенильных бляшек входят активаторы, регуляторные белки и компоненты системы комплемента [Ohno-Matsui, 2011].

### 1.4.6 Генетические факторы риска развития БА и ВМД

Полиморфизм по гену аполипопротеина Е по-разному модулирует риск развития ВМД и БА, и, возможно, процессы протеолиза Аβ. Аллель *APOE ε4* является сильнейшим и единственным доказанным фактором риска развития спорадической формы БА, в то же время аллель *APOE ε2* ассоциирована с пониженным риском развития и более умеренными клиническими проявлениями заболевания [Serrano-Pozo *et al.*, 2015]. В случае ВМД была обнаружена противоположная ассоциация [Baird *et al.*, 2004a]. Стоит отметить, что некоторые исследования не смогли обнаружить связь между генотипом по *APOE* и риском развития ВМД [Schultz *et al.*, 2003]. Гипотезы разнонаправленного влияния различных аллелей *APOE* на процессы обновления мембран, основываются на доказанном участии *APOE* в метаболизме холестерина и липидов [Phillips, 2014], и его потенциального влияния на функциональную

целостность мембраны Бруха [Ong *et al.*, 2001]. Показано также, что изоформы белка АРОЕ, соответствующие различным аллелям гена, различаются эффективностью связывания с липопротеиновым рецептором низкой плотности (LDL - рецептором) [Johnson *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013a].

Наиболее распространенными генетическими факторами риска для ВМД являются полиморфизмы в генах альтернативного пути комплемента - *CFH* (Y420H (rs1061170) и интронный SNP rs1410996); *ARMS2* (rs10490924); фактора комплемента 2 и В (*C2-CFB* locus); *C3* (rs2230199). Известно, что аллели *CFH*, *ARMS2*, и *C3* оказывают индивидуальные аддитивные эффекты, увеличивающие риск заболевания ВМД от 2х до 9ти раз, при этом в 74% случаев ВМД зарегистрировано у людей с отсутствием *C2-CFB* протективных аллелей [Gold *et al.*, 2006; Maller *et al.*, 2006]. В этиологии БА задействованы варианты другого регулятора альтернативного пути комплемента, гена рецептора комплемента 1 (*CR1*) [Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009]. Показано, что взаимодействие между аллелями *CFH* T1277C и *APOE-ε4* может быть ассоциировано с одновременным развитием ВМД и БА [Zetterberg *et al.*, 2008]. Тем не менее, некоторые исследователи считают вклад аллелей фактора комплемента Н в патогенез БА в принципе недоказанным [Fur Le *et al.*, 2010], как и влияние полиморфизма в гене *HTRA1* [Turunen *et al.*, 2011]. Таким образом, исследования показывают, что нейродегенеративные процессы при развитии ВМД и БА, возможно, до некоторой степени, имеют общие генетические механизмы [Logue *et al.*, 2014], и между развитием заболеваний существует эпидемиологическая связь. Тем не менее, известные на сегодняшний день гены-кандидаты БА не являются бесспорными кандидатами для ВМД [Keenan, Goldacre, Goldacre, 2014; Proitsi *et al.*, 2012]. Следует отметить, что большинство исследований используют небольшие наборы данных.

#### **1.4.7 Основные молекулярные механизмы, задействованные в патогенезе БА и ВМД**

##### **1.4.7.1 Хроническое воспаление с вовлечением системы комплемента**

Система комплемента - система гуморальной защиты, участвующая в реализации иммунного ответа организма. В центре пути комплемента стоит протеолитический каскад, который может быть активирован с помощью классического (специфический иммунный ответ), лектинового, или альтернативного (неспецифический иммунный ответ) путей активации. Поздние этапы по молекулярным механизмам являются общими для обоих путей активации системы: С3-конвертаза гидролизует ключевой компонент комплемента С3, белок острой фазы воспаления. В результате образуются С3а и С3b пептиды и активируется каскад дальнейшего гидролиза элементов системы комплемента. Для инициации классического пути необходима активация комплекса С1 при помощи связывания с иммуноглобулинами классов М и G,

связанными с антигенами. В каскаде дальнейшего гидролиза задействованы протеазы C1R, C1s, C4, C2; в результате образуется C3-конвертаза классического пути, C4b2a, что приводит к расщеплению C3 на C3a и C3b. C3b образует вместе с C2a и C4b C5-конвертазу классического пути. C5 расщепляется на фрагменты C5a и C5b, последний остается на мембране и соединяется с комплексом C4b2a3b. После к комплексу присоединяются компоненты C6, C7, C8 и C9, происходит полимеризация с образованием комплекса атаки мембраны (membrane attack complex, MAC), формирующего в мембранах клеток-мишеней «пору», способствующую их осмотическому лизису [Merle *et al.*, 2015; Morgan, 2015]. Фрагменты C3a, C5a и C4a, известные как анафилотоксины, стимулируют воспалительную реакцию. Альтернативный путь комплемента также приводит к образованию комплекса MAC, его активация происходит без участия первых компонентов комплемента — C1, C2, C4, а активаторами могут служить бактериальные полисахариды, липополисахариды и вирусные частицы.

Хотя вопрос о том, способны ли нестероидные противовоспалительные препараты предотвратить или уменьшить риск развития БА [Szekely, Zandi, 2010] или ВМД [Christen *et al.*, 2009], остается спорным, процессы хронического воспаления задействованы в патогенезе обоих заболеваний [Cameron, Landreth, 2010; Mandrekar-Colucci, Landreth, 2010], и все большее количество исследователей отводят особую роль в их развитии активации системы комплемента [Anderson *et al.*, 2010]. Продемонстрировано, что концентрации продуктов активации комплемента в плазме у больных ВМД, особенно маркеров хронической активации Ва и C3D, значительно выше по сравнению с контрольной группой, и некоторые исследователи отмечают, что с развитием ВМД может быть ассоциирована системная активация комплемента [Scholl *et al.*, 2008; Warwick *et al.*, 2014]. Экспериментальные данные подтверждают способность A $\beta$  к активации комплемента в друзах при ВМД и в процессах нормального старения сетчатки [Johnson *et al.*, 2002; Seth *et al.*, 2008]. Было показано, что комплексы MAC образуются на границе ретинального пигментного эпителия и хориоидеи сетчатки. Таким образом, активация комплемента на уровне мембраны Бруха, нарушение целостности которой связано с развитием «влажной» формы ВМД, возможно, является ключевым процессом в формировании друз [Hageman *et al.*, 2005]. Данные многочисленных иммуногистохимических, генетических и биохимических исследований позволяют предположить, что в патогенез ВМД главным образом вовлечен альтернативный путь комплемента (см. обзор [Charbel Issa, Chong, Scholl, 2011]). Причем отложения фактора комплемента Н, ингибитора альтернативного пути активации, отмечено вдоль поверхности амилоидных депозитов [Hageman *et al.*, 2005], что позволяет предположить эффективное ингибирование его действия. Показано, что клетки РПЭ сетчатки человека и мыши экспрессируют компоненты альтернативного пути активации комплемента [Chen, Forrester, Xu, 2007; Luo *et al.*, 2013]. При этом увеличение продукции



фактора комплемента В в клетках РПЭ может происходить в результате воздействия цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , продуцируемых клетками микроглии [Hageman *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009a]. Показано также, что непосредственное связывание с А $\beta$  не влияет на функцию фактора Н, однако ингибирует способность фактора I расщеплять С3b и инактивировать iС3b, что приводит к хроническому воспалению в сетчатке [Wang *et al.*, 2008a]. В совокупности данные свидетельствуют о том, что накопление амилоидного пептида может способствовать развитию ВМД в результате активации системы комплемента в субретинальном пространстве.

В случае БА связь не столь очевидна, а публикаций, посвященных активации системы комплемента при развитии заболевания, значительно меньше. Факторы комплемента экспрессируются в головном мозге, и их активация возрастает в структурах, затрагиваемых БА [Veerhuis, Nielsen, Tenner, 2011]. Иммуногистохимические исследования [Rogers *et al.*, 1992] и исследования с использованием трансгенных мышей [Fonseca *et al.*, 2004], показывают, что при развитии БА А $\beta$  может связывать С1q, при этом активируется классический каскад комплемента. Так, было показано, что и нейрофибриллярные клубки, и сенильные бляшки четко маркируются компонентами классической составляющей комплемента, С4d и С3d [McGeer *et al.*, 1989]. У пациентов с БА также повышены концентрация компонентов С3 и С4 в сыворотке и содержание CFH-предшественника в плазме крови [Song *et al.*, 2009]. Тем не менее, в некоторых исследованиях показано, что А $\beta$  способен активировать альтернативные пути комплемента. Так, содержание компонентов комплемента В, Вb, Ва и CFH было увеличено в головном мозге пациентов с БА по сравнению с контрольной группой [Strohmeier *et al.*, 2002; Strohmeier, Shen, Rogers, 2000], а в фибриллярных отложениях амилоидного пептида у С1q-/- мышей присутствовали продукты расщепления С3 [Zhou *et al.*, 2008]. Тот факт, что активация комплемента имеет нейротоксические последствия, был подтвержден иммуногистохимической демонстрацией наличия комплексов MAC на дистрофических нейронах в мозге больных БА [Kolev *et al.*, 2009].

#### 1.4.7.2 Активация микроглии

Исследования показывают, что первичные иммунные клетки нервной системы, клетки микроглии, играют важнейшую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Активация этих клеток в головном мозге может привести к воспалению и гибели нейронов, и тому найдены многочисленные экспериментальные подтверждения. Содержание биохимических маркеров активированных клеток микроглии и реактивных астроцитов в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера повышено. Эти клетки окружают места расположения сенильных бляшек [Wyss-Coray, Mucke, 2002]. Показано, что агрегаты амилоидного пептида являются эффективными активаторами клеток-фагоцитов ЦНС, которые поглощают А $\beta$ . Однако хроническая активация клеток микроглии со временем приводит к высвобождению хемокинов

и цитокинов, в частности IL-1, IL-6 и фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$  (Akiyama et al. 2000). Аналогично сосудистым клеткам, клетки микроглии экспрессируют рецепторы конечных продуктов гликозилирования (RAGEs), которые связываются с A $\beta$ , тем самым повышая генерацию цитокинов, глутамата и оксида азота NO [Li et al., 2003]. Представляется, что в целом нейровоспалительные процессы участвуют в токсичном цикле с положительной обратной связью. Активированные клетки микроглии высвобождают нейротоксичные медиаторы – факторы, усугубляющие повреждения нейронов, в то время как повреждение нейронов будет и далее стимулировать воспалительную реакцию [Gao et al., 2008].

Апоптоз и гибель клеток постоянно происходят в физиологических условиях, в основном без индукции хронического воспаления [Green et al., 2009]. Тем не менее, в ситуации системного воспаления, апоптоз, может еще более усугубить патологические процессы [Sankowski, Mader, Valdés-Ferrer, 2015; Zitvogel, Kepp, Kroemer, 2010]. При развитии апоптотического процесса активируются каскады протеолитических ферментов, специфичные для первичного стимула [Friedlander, 2003], причем активация некоторых каспаз имеет решающее значение и для активации инфламмосомы, специфического белкового комплекса, запускающего реакцию воспаления. Так, было показано, что при развитии БА, NLRP3-инфламмосома служит специфическим сенсором содержания A $\beta$ , и уровень таких ее компонентов, как активированная каспаза 1, повышен в постмортальных образцах мозга пациентов с БА [Martinon, Burns, Tschopp, 2002; Martinon, Tschopp, 2004]. Интересно, что делеция гена *CASP1* или *NLRP3* приводила к нормализации фенотипа APP/PS1 трансгенных мышей [Heneka et al., 2013]. Периферические макрофаги и клетки микроглии мозга способны секретировать компоненты инфламмосомы (каспазу-1, IL-1 $\beta$ , IL-18) в составе микровезикул, и присутствие индукторов воспаления (например, астроцитарного АТФ) является достаточным для массовой секреции микровезикул и опосредованной воспалительной нагрузкой нейротоксичности [Bianco et al., 2005; Gulinelli et al., 2012; Sarkar et al., 2009]. При БА микровезикулы, секретлируемые активированными клетками микроглии, способствуют генерации нейротоксичных растворимых форм A $\beta$  [Joshi et al., 2014]. В то же время было показано, что дегенеративные изменения клеток микроглии могут предшествовать потере нейронов, что осложняет разработку терапевтических стратегий.

Клетки микроглии в норме располагаются во внутренних слоях сетчатки, однако активно транслоцируются и накапливаются в субретинальном пространстве в непосредственной близости к слою РПЭ при развитии ВМД у людей и моделировании заболевания на животных [Ma et al., 2009]. При этом показано, что клетки микроглии сетчатки экспрессируют рецептор хемокинов CXС3, CXС3CR1, гомозиготность по аллели M280 которого ассоциирована с нарушением миграции клеток и увеличением риска развития ВМД [Combadière et al., 2007]. У

мышей, дефицитных по CX3CR1, количество клеток микроглии в субретинальном пространстве увеличивалось с возрастом, а также после лазерной коагуляции, стимулирующей дегенерацию сетчатки. Морфологически клетки микроглии сетчатки у пациентов с ВМД характеризуются амебоидной формой, указывающей на их активированное состояние [Luibl *et al.*, 2006]. Эксперименты по определению влияния активированных клеток микроглии сетчатки на клетки РПЭ проводились как при совместном культивировании, так и *in vivo*, в частности на модели мышей, которым клетки микроглии были трансплантированы в субретинальное пространство [Ma *et al.*, 2009]. Исследователи показали, что клетки микроглии индуцируют: а) изменения в структуре и распределении клеток РПЭ; б) усиление экспрессии и секреции провоспалительных, хемотаксических и проангиогенных молекул, а также VEGF, MMP2 и MMP9; и в) неоваскуляризацию в субретинальном пространстве *in vivo*. Можно предположить, что миграция клеток микроглии в субретинальное пространство на ранних стадиях ВМД индуцирует значительные изменения в клетках РПЭ, что способствует аккумуляции микроглии и прогрессии процессов воспаления в наружных слоях сетчатки, способствует созданию благоприятных условий для неоваскулярных изменений, и в конечном итоге приводит к прогрессированию заболевания.

#### 1.4.7.3 Ангиогенез

Известно, что ангиогенез служит отличительной чертой «влажной» формы ВМД, также называемой неоваскулярной, и мишенью для многочисленных терапевтических схем [Smith, Kaiser, 2014]. Было показано, что пациенты с диагнозом БА имеют повышенный уровень TGF-beta и VEGF в цереброспинальной жидкости по сравнению с контрольной группой (Kalaria *et al.* 1998; Tarkowski *et al.* 2002). VEGF также локализован в составе сенильных бляшек [Yang *et al.*, 2004], а А $\beta$  проявляет ангиогенный потенциал как *in vivo*, так и *in vitro* [Boscolo *et al.*, 2007]. Биоптаты головного мозга пациентов с БА были исследованы на предмет иммунореактивности к интегрину  $\alpha v \beta 3$ , димерному гликопротеину, который экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток, в частности не родительских, но новообразованных сосудов [Desai *et al.*, 2009]. Результаты показали, что некоторые области мозга пациентов с БА имели повышенную  $\alpha v \beta 3$ -иммунореактивность по сравнению с контролем, но только в гиппокампе ангиогенез привел к увеличению васкулярной плотности. На основании этого авторы пришли к выводу о том, что ангиогенез ассоциирован исключительно с повреждаемыми регионами мозга. Следует отметить, что многочисленные данные, свидетельствующие в пользу того, что нейрососудистая дисфункция является неотъемлемой частью патогенетических механизмов развития БА [la Torre de, 2002; la Torre de, 2010], подтверждаются исследованиями на биологических моделях [Kuznetsova, Schliebs, 2013].

#### 1.4.7.4 Окислительный стресс

Состояние окислительного стресса является результатом дисбаланса между системами генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК) и играет важную роль в патогенезе как ВМД [Brennan, Kantorow, 2009; Khandhadia, Lotery, 2010], так и БА [Darvesh *et al.*, 2010; Querfurth, LaFerla, 2010], что подтверждается эпидемиологическими и генетическими исследованиями.

Вероятность развития окислительного стресса в сетчатке, в том числе в клетках РПЭ, особенно высока с учетом высокого потребления кислорода [Rattner, Nathans, 2006]; постоянного воздействия света; высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах внешних сегментов фоторецепторных клеток; присутствия в клетках РПЭ и нейроретине фотосенсибилизирующих агентов, и постоянно протекающих процессов фагоцитоза, и с возрастом только растет на фоне ослабления системы антиоксидантной защиты и увеличения генерации АФК [Blasiak *et al.*, 2014; Jarrett, Boulton, 2012]. Активация свободнорадикального окисления вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, и мембранных липидов, в результате чего накапливаются специфические эпитопные маркеры (малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль, продукты гликолиза). Так, показано, что уровни многих маркеров окислительного стресса повышены в сыворотке крови пациентов с ВМД [Totan *et al.*, 2009; Venza *et al.*, 2012]. Это накопление приводит к патологической активации иммунной системы [Handa, 2012], и нарушению целостности комплекса фоторецепторов и пигментного эпителия сетчатки. Одним из характерных признаков окислительного стресса является накопление липофусцина, конечного продукта окисления внутриклеточных липидов и белков, в лизосомах клетках РПЭ. С возрастом липофусцин накапливается также и в других постмитотических клетках, в т.ч. в нейронах [Keller *et al.*, 2004], причем фармакологическое ингибирование его токсичных производных является клинически проверенной стратегией лечения «сухой» формы ВМД [Petrukhin, 2013]. Также показано, что олигомерные формы А $\beta$  приводят к нарушению активности и функции митохондрий и окислительному стрессу и в сетчатке [Ratnayaka, Serpell, Lotery, 2015], и в мозге [Butterfield, Boyd-Kimball, 2004; Viola, Klein, 2015]. Однако, хотя показано, что депозиты А $\beta$  в сетчатке инициируют провоспалительные и проангиогенные изменения, их воздействие может не индуцировать апоптоз *in vitro* [Bruban *et al.*, 2009].

Мозг, как и сетчатка, имеет высокий уровень потребления кислорода, а также содержит повышенное количество липидов с ненасыщенными жирнокислотными радикалами и – по сравнению с другими органами – имеет сниженные показатели антиоксидантной защиты [Clark *et al.*, 2010]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс является одним из первых регистрируемых нарушений при развитии БА и способен нарушать

процессинг белка-предшественника амилоида, активируя различные сигнальные пути [Shukla, Mishra, Pant, 2011]. Показано, что экспрессия чувствительного маркера окислительного стресса – гемм-оксигеназы-1 (HO1), увеличена в мозге пациентов с диагностированной БА [Barone *et al.*, ]. Некоторые исследователи полагают, что индукция HO1 в клетках глии может служить ключевым преобразователем раздражителей окружающей среды (факторов риска) при развитии различных дегенеративных заболеваний ЦНС [Schipper, Song, 2015]. Окислительный стресс и нарушение функций митохондрий, возможно, объясняют повышенный риск развития БА у пациентов с синдромом Дауна [Wilcock *et al.*, 2015; Wiseman *et al.*, 2015]. Гены *APP* и супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*), фермента антиоксидантной защиты, катализирующего превращение супероксид-анионов в молекулярный кислород и пероксид водорода, расположены близко друг к другу на 21й хромосоме человека, и могут триплицироваться при синдроме Дауна. Увеличение экспрессии *SOD1* может приводить к смещению равновесия процессов восстановления супероксида [Gulesserian *et al.*, 2001]. Для фибробластов с трисомией по 21 хромосоме характерно увеличение уровня генерации АФК, уменьшение активности протеинкиназы А, связанное с сокращением базальных уровней цАМФ, и соответственное снижение активности комплекса I, связанное со снижением цАМФ-зависимого фосфорилирования 18 кДа субъединицы [Valenti *et al.*, 2011]. Интересно, что полиморфизм rs2070424 гена *SOD1* ассоциирован с развитием БА в польской популяции, причем аллель G и генотипы AG/GG являются протекторными [Spisak *et al.*, 2014]. Показано, что именно окислительный стресс активирует киназу Cdk5, и в результате аномальной активности Cdk5/p25 происходит гиперфосфорилирование тау-белка, нейрофиламентов и других белков цитоскелета при развитии БА [Hashiguchi *et al.*, 2002; la Monte de *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000]. Исследования на клеточных культурах показали, что токсичность, обусловленная действием Аβ и глутамата приводит к Cdk5-опосредованному повреждению митохондрий и активации p38 за счет увеличения генерации АФК [Chang *et al.*, 2010]. В мозге пациентов с БА наблюдается значительное повышение уровня p25 и активности Cdk5 и p38 [Pei *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001]. Деполяризация мембран митохондрий приводит к еще более активной продукции АФК и высвобождению ионов Ca<sup>2+</sup>, что в конечном итоге способствует активации Cdk5 [Patrick *et al.*, 1999; Shea *et al.*, 2004]. Таким образом, гиперактивность Cdk5 задействована в патогенезе БА по механизму обратной петли, в качестве и регулятора, и эффектора митохондриальной дисфункции [Sun *et al.*, 2008].

#### 1.4.7.5 Нарушения структуры и функции митохондрий

Структурные и функциональные изменения митохондрий играют важную роль в развитии патологических процессов и при развитии ВМД [Terluk *et al.*, 2015], и при развитии БА [Cabezas-Opazo *et al.*, 2015; Hroudová, Singh, Fišar, 2014]. В тканях мозга пациентов с БА наблюдается значительное увеличение содержание митохондриальной ДНК (мтДНК) в цитоплазме нейронов, и в вакуолях, ассоциированных с накоплением липофусцина [Kotelevtsev *et al.*, 1989], предположительно вследствие деградации митохондрий путем аутофагии. Огромное количество экспериментальных данных указывает на то, что митохондриальные изменения находятся в каскаде патологических событий «выше», чем амилоидная и тау-патологии. По крайней мере, при развитии БА они регистрируются раньше [Swerdlow, Burns, Khan, 2010; Swerdlow, Burns, Khan, 2014]. Накопление повреждений митохондриального генома в клетках РПЭ ассоциировано с возрастом и прогрессированием ВМД [Barot, Gokulgandhi, Mitra, 2011; Kenney *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011], хотя в данном вопросе исследователи снова сталкиваются с противоречивыми результатами изучения статистической ассоциации. Существенно увеличивается частота крупномасштабных перестроек и делеций мтДНК [Karunadharma *et al.*, 2010; Kenney *et al.*, 2010] как в крови, так и в сетчатке пациентов с ВМД. Была продемонстрирована как протективная роль полиморфизма гена параоксоназы 1 (*PON1*) GLN192Arg в случае влажной формы ВМД [Pauer *et al.*, 2010], так и отсутствие такой ассоциации [Baird *et al.*, 2004b]. Для вариантов супер-оксиддисмутазы 2 (*SOD2*), связь с риском развития ВМД так и не была подтверждена [Brión *et al.*, 2011]. Исследования прогностической ценности генетического тестирования мтДНК при ВМД часто направлены на изучение ассоциации специфических митохондриальных гаплотипов с прогрессирующими стадиями заболевания [SanGiovanni *et al.*, 2009; Udar *et al.*, 2009]. Особо можно выделить группу исследований, сообщающих об ассоциации ВМД с редко встречающимися митохондриальными полиморфизмами, например, *MTND2\*LHON4917G* [Canter *et al.*, 2008].

Нарушение гомеостаза кальция с увеличением его уровня в цитоплазме может приводить к инициации скачка митохондриальной проницаемости с последующим запуском каскадов апоптоза и некроза [Du, Yan, 2010], а также к росту генерации АФК. Существуют данные о том, что рост образования АФК инициирует протеолиз APP по амилоидогенному пути [Hernández-Zimbrón, Rivas-Arancibia, 2015]. Активация процессов перекисного окисления липидов приводит, прежде всего, к изменению структурной организации мембран (их фосфолипидного состава, вязкости и ионной проницаемости), нарушению функций мембраносвязанных ферментов и рецепторов, повреждению митохондриальных белков и вследствие этого к дефициту энергии в клетке [Rhein *et al.*, 2009]. При этом нарушение продукции АТФ и дисфункция митохондрий при развитии БА далеко не всегда связаны с

нарушением функции непосредственно ферментов цепи переноса электронов [Heuvel van den, Smeitink, Rodenburg, 2004], и хорошо воспроизводятся на биологических моделях. Так, биолюминисцентное исследование выявило сниженное содержание АТФ в мозге и цельной крови трансгенных мышей (B6.Cg-Tg) по сравнению с контрольными животными дикого типа в различных возрастных группах [Zhang, Rissman, Feng, 2015].

С другой стороны, в мозге *in vivo* и на изолированных митохондриях показано, что непосредственно Аβ способен оказывать мощное токсическое действие на митохондрии [Ferrer, 2009; Priller *et al.*, 2006]; ингибировать основные митохондриальные ферменты, нарушая процессы электронного транспорта, генерации АТФ, и поддержания мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ). Как олигомерные, так и фибриллярные формы β-амилоида способны вызывать снижение митохондриального трансмембранного потенциала [Eckert *et al.*, 2008]. Способность ингибировать долговременную потенциацию доказана только для олигомерных форм Аβ [Knobloch *et al.*, 2007]. Показано, что Аβ способен ингибировать импорт белков, синтез которых проходит вне митохондрий [Sirk *et al.*, 2007], поступая через митохондриальную транслоказу внешней митохондриальной мембраны. Потенциальным подтверждением этой гипотезы можно считать выявляемое в различных клеточных моделях БА и у модельных трансгенных животных изменение уровня экспрессии и активности комплекса IV дыхательной цепи [Bobba *et al.*, 2013]. Интересно, что у мышей SAMP8 выявлена мутация A11181G в высоко консервативном сайте гена *mt-ND4*, кодирующем одну из субъединиц комплекса I цепи переноса электронов, однако у трансмитохондриальных цибридов регистрируется нормальная дыхательная функция. Таким образом, нарушения в дыхательной цепи, выявляемые у мышей SAMP8 можно связать непосредственно с токсическим действием накапливающегося в тканях Аβ [Imanishi *et al.*, 2011].

Тот факт, что Аβ способен накапливаться в митохондриях, был доказан экспериментально, причем показано, что внутримитохондриальное накопление амилоидных форм предшествует внеклеточному. Во-первых, протеолиз белка-предшественника амилоида, зафиксированного при помощи TIM/TOM комплекса транслоказ внешней и внутренней митохондриальной мембран, под действием локализованной в митохондриях γ-секретазы приводит к накоплению амилоидного пептида в межмембранном пространстве. Во-вторых, Аβ может транспортироваться в митохондрии; с участием процессов везикулярного транспорта, либо эндоцитоза, либо при участии ассоциированных с митохондриями мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) [Pinho, Teixeira, Glaser, 2014]. Показано, что площадь контакта мембран ЭР и митохондрий у пациентов с диагностированной БА и модельных животных увеличена [Hedskog *et al.*, 2013]. Дегградация амилоидных и прочих неструктурированных пептидов длиной от 10 до 65 аминокислотных остатков внутри

митохондрий происходит исключительно при участии металлопротеазы PreP, локализованной в митохондриальном матриксе. Показано, что активность PreP в височной доле у больных БА и трансгенных модельных мышей значительно ниже, чем в контрольной группе [Alikhani *et al.*, 2011], возможно вследствие увеличения продукции АФК. Считается, что увеличение активности и/или экспрессии PreP – потенциально перспективное направление для разработки новых терапевтических стратегий [Fang *et al.*, 2015]. В целом, нарушение функций митохондрий мозга приводит к росту образования А $\beta$  и к накоплению амилоидного пептида митохондриями, что вызывает каскад дегенеративных изменений.

Следует отметить, что, вопрос о том, играет ли апоптоз критическую роль в патогенетических механизмах развития БА и ВМД, остается спорным [Adler *et al.*, 1999; Obulesu, Lakshmi, 2014]. Однако многие компоненты пути апоптоза специфически изменены в мозге больных БА [Silva *et al.*, 2014], что может быть ассоциировано с дисфункцией митохондрий, играющих в ключевую роль в апоптотических процессах [Mattson, Gleichmann, Cheng, 2008]. Приводящие к клеточной гибели митохондриальные процессы: открытие митохондриальных пор с набуханием митохондрий, увеличение проницаемости митохондриальной мембраны с высвобождением апоптотических факторов (в том числе *cyt c* и вторичного активатора каспаз Smac), высвобождение каспаз-независимого эффектора клеточной смерти, фактора AIF, инициирующего конденсацию хроматина и деградацию ДНК), тесно взаимосвязаны [Aronis *et al.*, 2003]. При этом митохондрии подвергаются фрагментации до того, как происходит активация каспазных каскадов [Lu, 2009]. В апоптотических клетках снижение внутреннего потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) сопровождается увеличением продукции АФК. Нарушения митохондриального гомеостаза могут возникнуть также в результате нарушения баланса в путях биогенеза митохондрий и митофагии, причем такой дисбаланс, характерен для ряда нейродегенеративных заболеваний [Calkins *et al.*, 2011]. В частности, показано, что гиперпродукция амилоида приводит к нарушению баланса митохондриальных белков слияния/деления (fission/fusion): снижению содержания DLP1, OPA1, Mfn1 и Mfn2, и повышению содержания Fis1 [Wang *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2009b], а в итоге - к дисфункции нейронов.



### 1.5 Животные модели в свете современных теорий этиопатогенеза БА

Создание и использование адекватных животных моделей имеет принципиальное значение как для понимания природы нейродегенеративных заболеваний, так и для поиска эффективных средств терапии. За последние несколько десятков лет получено множество трансгенных (в связи с очевидными преимуществами, как правило, мышей) и нетрансгенных животных моделей, которые с разной степенью точности воспроизводят БА [Saraceno *et al.*, 2013]. Трансгенных животных получают введением в геном мутантных форм человеческих генов, кодирующих APP, пресенелины и тау-белок, в различном сочетании и под высокоактивными в коре и гиппокампе промоторами (в соответствии с современными представлениями о патогенетических механизмах развития семейных форм БА). Картина заболевания лучше всего воспроизводится у трансгенных мышей 3xTg-AD, экспрессирующих мутантные APP, PS1 и тау; у которых наблюдается накопление амилоида, опережающее по срокам образование нейрофибрилярных клубков гиперфосфорилированного тау, с повреждением тех же, что и у человека, структур мозга [Giménez-Llort *et al.*, 2007]. К сегодняшнему дню появились интересные работы на современных животных моделях БА, посвященные анализу проявлений заболевания в глазах, что уже было упомянуто в данном обзоре литературы. Так, на двойной трансгенной модели мышей Tg2576 показано, что отложения амилоидного пептида с образованием бляшек отмечается в гиппокампе, мозжечке и коре, а также в сетчатке экспериментальных животных, в том числе в ганглионарном слое, в РПЭ и в слое фоторецепторных клеток [Chiu *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2013]. Было показано, что амилоидные бляшки у трансгенных животных регистрируются вначале в сетчатке и хориоиде, а в дальнейшем — в сосудах головного мозга. Однако, трансгенное моделирование имеет определенные недостатки при переносе в клиническую практику. Используемые модельные животные могут нести редкие мутации, или не воспроизводить основополагающие характеристики патологических процессов при БА. Так, ни у простых, ни у двойных трансгенных мышей, несущих мутации в генах APP и PS1, несмотря на накопление депозитов Аβ в тканях мозга, не наблюдается массивной гибели нейронов [Takeuchi *et al.*, 2000]. Животные, демонстрирующие гибель нейронов, получены в потомстве от скрещивания мышей, несущих специфические мутации в последовательности гена PS1, и мышей, осуществляющих суперэкспрессию человеческого гена APP. Но такая модель снова не учитывает всей сложности регуляторных процессов организма, тем более при возрастных изменениях. Нетрансгенные животные модели считаются более адекватными спорадическим формам болезни Альцгеймера. При этом патология по типу БА без дополнительного введения препаратов в желудочки мозга возникает только у мышей сублинии SAMP8.

### 1.6 Преждевременно стареющие мыши SAMP8 – биологическая модель БА

В 1968 г. группа японских исследователей из Университета Киото получила в распоряжение несколько пар мышей линии AKR/J. Линия поддерживалась инбридингом, однако по истечению некоторого времени в нескольких клетках были обнаружены мыши, которые приобрели различные патологические фенотипы, достаточно устойчиво наследующиеся последующими поколениями. В 1975 г. мыши с признаками серьезных отклонений от нормы стали родоначальниками 9ти так называемых сублиний «с признаками ускоренного старения» (senescence-prone или P series); мыши, процесс старения которых оставался нормальным, дали начало 3м сублиниям, «устойчивым к старению» (senescence-resistant или R series). С этих пор инбридинг вели внутри выбранных групп, основываясь на данных о продолжительности жизни, скорости старения и проявлении патологических фенотипов. Данные, полученные при исследовании 17 биохимических и 10 иммуногенетических маркеров, показали, что в каждой сублинии SAM представлен по крайней мере один генотип, отличающий ее от аутентичной линии AKR/J [Kitado, Higuchi, Takeda, 1994; Takeda *et al.*, ]. При этом, несмотря на инбредность сублиний для их поддержания требуется постоянный контроль [Carter *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, ], очевидно, в связи с тем, что формирование уникального фенотипа контролируется комплексом факторов.

Сублиния SAMP8 характеризуется необратимым ускоренным старением, имеющим общие характеристики с возраст-зависимыми процессами у людей. Средняя продолжительность жизни мышей SAMP8 составляет 299 дней (9,7 месяцев), что существенно ниже показателей мышей сублинии SAMR1 - 568 дней (16,3 месяцев). Для мышей SAMP8 характерны лордоз, выпадение волос, снижение показателей физической активности, повышенное содержание биомаркеров окислительного стресса в тканях, дисфункция митохондрий, нарушения в системах антиоксидантной защиты, микрососудистые дефекты в головном мозге и нарушения функции гематоэнцефалического барьера, нарушения иммунного ответа. При помощи разнообразных подходов у мышей сублинии SAMP8 были выявлены многие особенности, характерные для пациентов с БА, в том числе когнитивные и поведенческие нарушения [Nakagomi, Shudo, Nakatani-Pawlak, 2013], невропатологические признаки (уменьшение количества нейронов и дендритных отростков, холинергические дефициты в переднем мозге), образование депозитов A $\beta$  по типу сенильных бляшек, гиперфосфорилирование тау-белка и образование депозитов по типу нейрофибриллярных клубков (см. обзоры [Cheng, Zhou, Zhang, 2014; Pallas *et al.*, 2008]). При этом нуклеотидная последовательность гена *App* в гиппокампе мышей SAMP8 не несет мутации, аналогичной тем, которые были зарегистрированы в семейных формах БА, а последовательность кДНК гена *Psen1* идентична кДНК мышей с нормальным фенотипом. Интересно, что с возрастом у мышей SAMP8 подвергаются

дегенеративным изменениям практически все слои сетчатки [Hosokawa, Ueno, ], с утолщением мембраны Бруха, накоплением друзоподобных отложений, липофусциновых гранул в клетках РПЭ [Majji *et al.*, 2000].

Некоторые исследователи полагают, что гранулы, накапливающиеся в гиппокампе мышей SAMP8, не содержат амилоидных пептидов и тау-белка, и, более того, увеличение содержания А $\beta$  не коррелирует с увеличением числа гранул [Manich *et al.*, 2011; Manich *et al.*, 2014], а следовательно, формирование этих гранул у мышей сублинии SAMP8 должно быть вызвано иными патологическими механизмами, чем при развитии БА. Тем не менее, по совокупности данных можно предположить, что мыши SAMP8 воспроизводят патологическую картину спорадических форм БА более адекватно, чем прочие животные модели, с учетом влияния неизбежных возрастных изменений. Использование подобной модели позволяет исследователям подробно рассмотреть возможные молекулярные, структурные, функциональные последствия схем лечения и профилактики БА и ВМД, со всей возрастной спецификой заболеваний. В настоящее время в качестве аналогичной модели для комплексного исследования связанных со старением заболеваний могут выступать только крысы OXYS.

## **1.7 Крысы OXYS**

### **1.7.1 История создания линии**

Первое сообщение о создании сублинии, полученной инбридингом крыс Wistar, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы, появилось в 1970х гг. Сообщалось, что кормление крыс Wistar галактозой в течение 5 поколений привело к наследуемому снижению активности галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы [Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., 1975]. Предполагалось, что у животных была повышена активность транспортера сахаров, приводящая к усиленному накоплению гексоз в клетках, но это свойство строго не было доказано.

Несмотря на значительное сходство в строении молекул глюкозы и галактозы, превращение последней в глюкозу требует последовательного протекания в цитоплазме нескольких ферментативных эволюционно-консервативных реакций (известных под названием пути Лелуара). Накопление в тканях избыточного количества галактозы, а также токсических продуктов ее метаболизма, в том числе образующихся в результате альтернативных метаболических путей (галактозо-1-фосфата и галактитола), считается основным патогенетическим фактором, обуславливающим большинство клинических проявлений такой болезни накопления, как галактоземия, и формирование отсроченных осложнений. Так, в хрусталике глаза избыток галактитола способствует формированию катаракты [Takamuga *et al.*, 2003]. Для крыс Wistar, чувствительных к галактозе, оказались характерными множественные

патологические состояния - катаракты, эмфиземы, кардиомиопатии, предраковые состояния, нарушения памяти, а также низкие рождаемость и продолжительность жизни, которые в последующих поколениях развивались уже без нагрузки диеты галактозой. Поэтому в 1977 г. сублиния W/SSM (Вистар Салганик-Соловьева-Морозкова) была заявлена, как модель наследственной галактоземии, после чего в последующие десять лет интерес к ней постепенно сошёл на нет. Ситуация кардинально изменилась в начале 90-х, когда в гомогенатах печени и миокарда этих животных методом ЭПР была показана способность к повышенному образованию радикалов кислорода в ответ на добавление перекиси водорода [Salganik *et al.*, 1994]. В 1996 году животные были зарегистрированы в международной базе данных как линия OXYS (Rat genome. 1996.V.2. N 2.P.52-54. Inbred Strains of Rats). Ключевой характеристикой при регистрации линии стала врожденная гиперпродукция кислородных радикалов. В дальнейшем было показано, что у крыс OXYS проявляются далеко не все исходно заявленные свойства, так – не проявляются биохимические признаки, характерные для аутосомно-рецессивного нарушения обмена углеводов (галактоземии) человека. Максимальная продолжительность жизни крыс OXYS снижена на 28% по сравнению с крысами Wistar: 24,6±6 и 36,8±5 месяцев, соответственно. Для стабилизации фенотипических признаков крыс OXYS в 58-63 поколениях было проведено усиление инбридинга со строгим отбором производителей по признаку ранней спонтанной катаракты, что привело к устойчивому развитию у животных уже в молодом возрасте комплекса признаков, который может рассматриваться как синдром преждевременного старения [Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А. Ж., 2014]. С помощью микросателлитного анализа генома крыс OXYS, проведенного нашими коллегами из лаборатории структуры генома Института цитологии и генетики СО РАН, были выявлены ассоциации нескольких маркеров 1-й хромосомы, локализованных в непосредственной близости от генов *Ace* и *Ren*, с фенотипом крыс OXYS (неопубликованные данные, И.Б. Хворостов). Анализ был проведен по 25 локусам (15 из которых были анонимны), локализованным на семи хромосомах (4 – на первой хромосоме; 2 - на второй; 4 – на третьей; 1 – на пятой; 11 – на десятой; 2 – на тринадцатой; 1 – на четырнадцатой).

### **1.7.2 Функциональные и морфологические особенности крыс OXYS как биологической модели преждевременного старения и связанных с ним заболеваний**

Показано, что катаракта, в возрасте 3 мес регистрируемая у 100% крыс OXYS, соответствует сенильной катаракте человека. Развитие катаракты у крыс OXYS, как и у людей, связано со снижением транскрипционной активности генов  $\alpha$ -кристаллинов, кодирующих основные структурные белки хрусталика, обеспечивающие его прозрачность [Rumyantseva *et al.*, 2008]. Однако на доклинических стадиях – в возрасте 20 дней - уровень мРНК генов  $\alpha$ -кристаллинов в хрусталиках крыс OXYS и содержание восстановленного

глутатиона, центрального функционального звена коэнзиматической антиоксидантной защиты в хрусталике, повышены по сравнению с одновозрастными крысами Wistar. Комплексные исследования [Markovets, Fursova, Kolosova, 2011; Neroev *et al.*, 2008; Жданкина А.А., Фурсова А.Ж., Логвинов С.В., 2008] показали, что развитие катарактальных изменений у крыс OXYS происходит на фоне раннего развития ретинопатии, которая по клиническим и морфологическим проявлениям аналогична ВМД у людей. При этом по клиническим признакам выделяются два основных периода развития ретинопатии: от 1,5 до 3 месяцев - возраст манифестации первых признаков, и от 9 до 12 месяцев – период формирования ярко выраженных патологических изменений. К возрасту 12-14 месяцев животные характеризуются наличием выраженных стадий заболевания [Markovets, Fursova, Kolosova, 2011]. Согласно данным гистологических исследований у крыс OXYS подвержены патологическим изменениям все структурные компоненты сетчатки: мембрана Бруха, РПЭ, фоторецепторы, ассоциативные и ганглионарные нейроны. Причем первые признаки структурно-функциональных нарушений клеток РПЭ выявляются уже в возрасте 20 дней при отсутствии клинических проявлений ретинопатии [Жданкина А.А., Фурсова А.Ж., Логвинов С.В., 2008; Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А. Ж., 2014]. К возрасту 24 месяца патологические изменения в сетчатке крыс OXYS нарастают и приводят к тотальной гибели фоторецепторов [Neroev *et al.*, 2008; Сапрунова В.Б., Пилипенко Д.И., Алексеевский А.В., Фурсова А.Ж., Колосова Н.Г., 2010], и обширным дегенеративным изменениям, с уменьшением толщины наружного и внутреннего сетчатого слоев, и изменениями синаптических контактов [Жданкина А.А., Кон Г.А., Плотников М.Б., Варакута Е.Ю., Логвинов С.В., Просенко А.Е., 2013]. В сосудистом русле хориоидеи крыс OXYS выявляются морфологические изменения, свидетельствующие об ухудшении кровообращения в сетчатке и развитии тканевой гипоксии и ишемии – возможной причины повреждения клеток сетчатки. Показано, что у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar достоверно увеличена удельная площадь тромбированных сосудов со стазом и сладжем форменных элементов, при этом у 100% животных наблюдаются сужение калибра артерий (Фурсова А.Ж. 2009). Характерные для хронической ишемии изменения были зарегистрированы и в мозге 12ти месячных крыс OXYS методами МРТ [Agafonova *et al.*, 2007]. Наши исследования показали, что возможной причиной гипоксического состояния может быть задержка формирования микроциркуляторного русла в ранний постнатальный период становления мозга крыс OXYS. Митотическая активность эндотелия сосудов пиальной оболочки больших полушарий мозга крыс OXYS снижена в 1,5 раза по сравнению с крысами Wistar [Korbolina E., Agafonova I., Sergeeva S., Trofimova N., Mishenko N., 2007]. Прогрессирование цереброваскулярной недостаточности является фактором риска развития когнитивных нарушений, в том числе - болезни Альцгеймера [Lee *et al.*, 2014].

Манифестация ретинопатии и катаракты у крыс OXYS совпадает по времени с другими проявлениями преждевременного старения, а именно: развитием кардиомиопатии [Непомнящих Л.М., Семёнов Д.Е., Соловьёва Н.А., 1994], артериальной гипертензии [Bobko *et al.*, 2005], проявлений остеопороза: нарушения минерализации костной ткани, снижения её минеральной плотности на фоне снижения уровня Ca в сыворотке крови и его повышенной экскреции [Muraleva *et al.*, 2012; Muraleva, Sadovoi, Kolosova, 2010], возрастных изменений иммунной системы, в частности ранней, с возраста 2-3 мес инволюции тимуса [Obukhova, Skulachev, Kolosova, 2009; Маркова Е.В., 2003]. В возрасте 3 мес у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar снижен объем коркового, мозгового вещества и соединительнотканной стромы тимуса; уменьшена плотность расположения лимфоидных клеток в корковом и мозговом веществе, снижено количество бластов в субкапсулярной зоне коркового вещества тимуса. Было показано, что в дальнейшем гипоплазивные изменения приводят к более низким пиковым показателям массы, размеров и клеточности, а также дисбалансу субпопуляций Т-лимфоцитов [Obukhova, Skulachev, Kolosova, 2009; Обухова Л. А., В. Б. Вайс, Л. Е. Бакеева, С. В. Сергеева, 2013]. Сопутствующее снижение активности Т-клеточного звена иммунной системы, проявляется в подавлении реакции гиперчувствительности замедленного типа [Маркова Е.В., 2003]. Можно предположить, что дисбаланс иммунной системы может создать определенную метаболическую основу для развития проявлений ускоренной старения крыс OXYS и их прогрессирования. Это предположение находит подтверждение в результатах анализа транскриптома сетчатки крыс [Kozhevnikova *et al.*, 2013a], проведенного методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq). Было выявлено значительное снижение экспрессии генов участвующих в функционировании иммунной системы, в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar в возрасте 3 и 18 мес, причем в список дифференциально экспрессирующихся генов вошли многие регуляторы иммунитета - маркеры лейкоцитов, хемокины, цитокины, компоненты системы комплемента, интерферон-индуцируемые белки и гены комплекса гистосовместимости МНС.

Уже с возраста 3 месяцев у крыс OXYS наблюдаются изменения в когнитивной и эмоциональной сферах, характерные для стареющих людей и животных: снижено моторно-исследовательское поведение, повышена тревожность [Markova *et al.*, 2005; Stefanova *et al.*, 2011; Stefanova, Fursova, Kolosova, 2010; Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А. Ж., 2014]. Для крыс OXYS характерны нарушения памяти и способности к обучению, дифференциально регистрируемые при исследовании в различных тестах (пассивного избегания, распознавание объектов, 8-лучевой радиальный лабиринт, и водный лабиринт Морриса). Так, в 8-лучевом радиальном лабиринте нарушения способности крыс OXYS к обучению выявляются уже в возрасте 3 мес [Stefanova *et al.*, 2015b]. В мозге крыс

OXYS методами световой микроскопии и магнитно-резонансной томографии выявляются признаки протекающих нейродегенеративных процессов [Stefanova *et al.*, 2014a], причем регистрация первых обширных очагов демиелинизации возможна уже у 3х месячных животных, гораздо раньше, чем у крыс Wistar и в возрасте манифестации поведенческих нарушений. Протекание демиелинизационных процессов характерно как для нормального старения, так и для патогенеза БА, однако интенсивность в этих случаях различается [Carmeli *et al.*, 2013]. Площадь поперечного сечения боковых желудочков мозга на средневзвешенных срезах, отражающая изменения их объема, начиная с возраста 3 мес у крыс OXYS также больше, чем у Wistar, что может быть следствием дисбаланса между производством и ресорбцией спинномозговой жидкости, характерного для нейродегенеративных состояний [Chaarani *et al.*, 2013; Lepore *et al.*, 2013]. Анализ нейрональных популяций в областях CA1, CA3 и зубчатой извилине гиппокампа крыс OXYS выявил прогрессирующую с возрастом гибель нейронов [Stefanova *et al.*, 2014a; Stefanova *et al.*, 2015a]. Интересно, что в возрасте 5 мес у крыс OXYS, по сравнению с контрольной линией Wistar, количество нейронов в этих областях гиппокампа наоборот увеличено. Это может быть объяснено активацией нейрогенеза в рамках эндогенного компенсаторного процесса, или же активной продукцией незрелых нейронов в гиппокампе крыс OXYS. Потеря нейронов, прогрессирует с возрастом, и у 11-ти месячных крыс OXYS гиппокампальных нейронов уже значительно меньше по сравнению с крысами Wistar. В головном мозге трансгенных животных, частично имитирующих патогенез БА, наблюдаются изменение активности процессов нейрогенеза [Verdaguer *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014]. Среди возможных причин ограниченного потенциала участия нейрогенеза репарационных процессах в мозге при развитии БА можно назвать слишком высокие скорости гибели нейронов, неэффективность новообразованных нейронов ввиду их неполной зрелости (или неспособности к интеграции), токсичность микроокружения [Jin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2011]. Так или иначе, несбалансированный нейрогенез может со временем способствовать ухудшению когнитивных функций.

Результаты гистологического исследования гиппокампа крыс OXYS в различные сроки жизни отражают выраженные структурные изменения нейронов, имеющие необратимый характер, в регионах CA1, CA3, зубчатой извилине гиппокампа, выраженные уже в возрасте 5 мес, в период активной манифестации признаков ускоренного старения мозга, и нарастающие к возрасту 15 мес. Значимое снижение средней площади тела, ядер пирамидных нейронов в указанных областях свидетельствует о более низком уровне метаболизма и недостаточности компенсаторно-приспособительных реакций пирамидных нейронов у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar [Stefanova *et al.*, 2015a].

Показано, что нарушение функционирования синапсов, зачастую предшествующее массовой гибели нейронов, способствует потере памяти при БА, хотя механизмы синаптической дисфункции при развитии нейродегенеративных заболеваний остаются во многом непонятными [Karim *et al.*, 2014]. Тем не менее, плотность синаптических контактов сильно коррелирует с прогрессией когнитивных нарушений при развитии БА [Baliotti *et al.*, 2013]. При сравнении содержания маркера синаптических везикул синапсина-1 и пост-синаптического маркера PSD-95 в гиппокампе и префронтальной коре крыс OXYS и Wistar методом вестерн-блот анализа было показано, их сниженное содержание в гиппокампе крыс OXYS по сравнению с одновозрастными крысами Wistar в возрасте 4 и 18 месяцев [Stefanova *et al.*, 2015b]. Нарушение пространственного обучения у крыс OXYS связано также с изменениями синаптической пластичности в гиппокампе, в том числе, с нарушениями долговременной потенциации [Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В., 2011].

Другой важной характеристикой патологических нейродегенеративных процессов, протекающих в мозге крыс OXYS, является гиперфосфорилирование тау-белка. Значительное увеличение содержания тау-белка и его фосфорилирования в коре и гиппокампе было обнаружено уже в мозге 3-месячных крыс OXYS по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Оба эти параметра были повышены в дальнейшем и в возрасте 13 и в возрасте 23 мес [Stefanova *et al.*, 2014a; Stefanova *et al.*, 2015a]. Момент манифестации тау-патологии в мозге крыс OXYS совпадает с проявлением первых признаков нейродегенеративных изменений, дисфункции митохондрий, и формированием поведенческими отклонений. Аномальное фосфорилирование тау приводит к разрушению транспортных систем нейрона, потере синапсов и, в конечном счете, к гибели клеток и снижению когнитивных функций [Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2013]. Вполне вероятно, что ранняя потеря синапсов и нейронов у крыс OXYS еще в молодом возрасте связана с нарушением клеточного транспорта. Однако, что же именно становится спусковым крючком патогенетического каскада событий остается неясным. Манифестация усиленного по сравнению с крысами Wistar накопления амилоидного пептида в мозге крыс OXYS, так называемой амилоидной патологии, происходит намного позже других наблюдаемых патологических изменений. Согласно данным иммуногистохимического исследования в возрасте 15-24 мес в коре (наиболее значительно), гиппокампе, таламусе, гипоталамусе, и сосудах мозга (однако не в мозжечке) крыс OXYS наблюдаются амилоид-реактивные депозиты, регистрируемые с использованием  $A\beta_{1-42}$ - и MOAB-2-специфичных антител [Stefanova *et al.*, 2014a; Stefanova *et al.*, 2015a]. В-основном, эти отложения амилоидного пептида сформированы в диффузные бляшки, окрашиваемые красителем конго красный. При этом согласно данным иммуноферментного исследования (ELISA) и количественного вестерн-блот анализа значительное накопление  $A\beta_{1-42}$  в головном мозге



(гиппокампе и префронтальной коре) крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar происходит в возрасте около 7 месяцев.

Согласно нашим данным, ключевую роль в ускоренном старении мозга крыс OXYS и в развитии нейродегенеративных изменений могут играть нарушения структуры и функции митохондрий. Выраженные ультраструктурные изменения митохондрий (сокращение количества крист и образование внутри митохондрий областей, вовсе лишенных крист) обнаружены у крыс OXYS уже в возрасте 4 месяцев. У 18-месячных животных митохондриальная структура практически полностью разрушена, что было подтверждено количественно при изучении ультраструктурных характеристик митохондриального аппарата пирамидальных нейронов в области CA1 гиппокампа крыс OXYS и Wistar.

Длительный приём антиоксидантов способен предупредить развитие признаков преждевременного старения крыс OXYS [Loskutova, Kolosova, 2000; Stefanova *et al.*, 2014b]. Эффективность препаратов оказалась тесно связанной с их способностью предотвращать снижение дыхательной активности митохондрий, но не была связана напрямую со снижением содержания окислительных повреждений белков и липидов. При этом содержание продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов с возрастом в мозге крыс OXYS растет, но более высоким, чем у крыс Wistar, становится значительно позже, чем регистрируются нарушения когнитивных функций (Kolosova *et al.* 2006, 2003). Это позволяет предположить, что нарушения функций митохондрий крыс OXYS обусловлены в основном другими механизмами. Определённая неоднозначность полученных результатов продиктовала необходимость поиска новых, современных подходов в выяснении механизмов ускоренного старения мозга крыс OXYS, тем более что состояние биоэнергетических процессов ранее исследовалось только в печени животных.

В целом результаты наших исследований позволяют заключить, что крысы OXYS соответствуют не только критериям генетической модели ВМД [Pennesi, Neuringer, Courtney, 2012], но перспективной нетрансгенной модели для изучения механизмов нейродегенеративных процессов при развитии БА [Stefanova *et al.*, 2014a; Stefanova *et al.*, 2015a].

В качестве одной из возможных причин преждевременного старения крыс OXYS с середины 90-х годов прошлого века рассматриваются нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий [Salganik *et al.*, 1994; Shabalina *et al.*, 1995]. Однако вопрос о причинно-следственной связи между нарушением энергетического метаболизма и «запуском» процессов преждевременного старения на момент постановки задач настоящего исследования оставался открытым. Поэтому первая часть настоящего исследования была посвящена сравнению состояния энергетического метаболизма мозга крыс OXYS и Wistar (контроль) методами  $P^{31}$ ЯМР-спектроскопии.

Принципиально важно, что манифестация фенотипических признаков преждевременного старения происходит у крыс OXYS практически одновременно в молодом возрасте, что позволяет рассматривать этих животных как уникальную модель для исследования молекулярно-генетических механизмов преждевременного старения и связанных с ним заболеваний. Для определения характера наследования катаракты, ретинопатии и характерных поведенческих признаков крыс OXYS нами были проведены гибринологические скрещивания [Korbolina *et al.*, 2012]. Анализ гибридов от скрещиваний крыс OXYS с крысами контрольной инбредной линии WAG не выявил единообразия популяции гибридов F<sub>1</sub> по заболеваемости ранней катарактой и ретинопатией. Заболевание развивалось преимущественно у самок, что в принципе соответствует общей тенденции в человеческой популяции [Rudnicka *et al.*, 2012; Zetterberg *et al.*, 2008]. В популяции гибридов F<sub>2</sub> расщепления по классическому Менделевскому закону также не было выявлено, что исключает моногенное аутосомно-доминантное и рецессивное наследование комплекса фенотипических признаков крыс OXYS.

В настоящей работе был проведен поиск на первой хромосоме локусов количественного признака, ассоциированных с развитием у крыс OXYS ряда признаков преждевременного старения (поведенческих, ранней катаракты и ретинопатии) методом QTL-анализа. С целью доказательства влияния выявленных QTL-локусов на развитие катаракты и ретинопатии для каждого локуса была сконструирована конгенная линия крыс на основе генома крыс WAG, (контрастных по совокупности исследуемых фенотипических признаков) и проведена фенотипическая характеристика конгенных животных. С целью выявления генов, которые могут быть ассоциированы с развитием ранних нейродегенеративных изменений сетчатки у крыс OXYS был проведен анализ изменений транскриптома сетчатки конгенных животных в сравнении с крысами OXYS на доклинической стадии развития ретинопатии при помощи методов массового параллельного секвенирования (RNA-seq).

## Глава 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы, использованные в работе

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: акриламид, N,N-метиленабисакриламид, аммония персульфат, бромистый этидий, борная кислота, трис(гидроксиметил)аминометан ((НОСН<sub>2</sub>)<sub>3</sub>СNH<sub>2</sub>) и трис(оксиметил)аминометан гидрохлорид, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), магния хлорид (MgCl<sub>2</sub>), аммония сульфат ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), натрия хлорид (NaCl), натрия ацетат (NaAc), аммония ацетат (NH<sub>4</sub>Ac), натрия гидроксид (NaOH), натрия додецилсульфат (SDS), сахароза, фенол, хлороформ, этанол, изопропанол, бромфеноловый синий (реактивы марки о.с.ч. и х.ч., «Реахим», Россия), фосфатно-солевой буфер (PBS, «Медиген», Россия), глицерин («Serva», Германия), Tween 20 («Ferak», Германия), минеральное масло («Медиген», Россия), протеиназа К («Boehringer Mannheim GmbH», Германия), TEMED («Reanal», Венгрия); Taq-ДНК-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, Dctp), маркер молекулярного веса ДНК pUC19/MspI (13 фрагментов от 26 п.н. до 501 п.н.) («СибЭнзим», Россия); парафармальдегид (Panreas, Испания); TRIZOL<sup>®</sup> Reagent («Invitrogen», США), RNAlater («Ambion», США). Праймеры для ПЦР (см. соответствующий раздел главы 2 «Материалы и методы») были синтезированы в ООО «Биосинтез» (Новосибирск) на автоматическом синтезаторе АСМ-2000 Н-фосфонатным методом и очищены хроматографически на колонках Centri-Sep («Princeton Separations», США).

### 2.2 Животные

Работа выполнена на крысах-самцах линий OXYS, Wistar, WAG, и конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2, а также животных гибридной популяции F<sub>2</sub> (самцах и самках), полученной от реципроктного скрещивания крыс OXYS и WAG, на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. С возраста 4 недель животных содержали группами по 5 особей в клетках размером 57×36×20 см при температуре 22±20°С в условиях фиксированного режима освещения (12 ч свет /12 ч темнота) при свободном доступе к воде и пище - стандартному гранулированному корму для лабораторных животных («Чара», ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия).

### 2.3 Забор, первичная пробоподготовка и хранение биологических образцов

Крыс наркотизировали СО<sub>2</sub>, декапитировали, головы немедленно помещали на чашку Петри, заранее охлажденную на снегу. Для исследования методом световой микроскопии забой животных проводился непосредственно после офтальмологического осмотра. После извлечения глаз, проводимого на снегу, материал фиксировали в жидкости Карнуа (этанол

абсолютный:хлороформ:ледяная уксусная кислота 6:3:1) в течение 2,5 часов. По окончании времени фиксации материал промывали в нескольких сменах (15 мл) 96% спирта до полного исчезновения запаха уксусной кислоты, заднюю стенку глаза фиксировали в растворе 12% нейтрального формалина в течение суток. Затем, после длительной отмывки (в течение нескольких часов) в проточной воде, проводили проводку материала в спиртах нарастающей концентрации: 50%, 60%, 70%, 80%, 100% (абсолютный спирт). Последний получали из 96% спирта путем его обезвоживания медным купоросом. Уплотнение материала достигалось пропиткой кусочков парафином путем проводки сначала в смеси спирта с ксилолом (1:1), потом в двух - трех сменах чистого ксилола, далее - в смеси ксилола с парафином при температуре 55 - 56°C. Далее материал заливали в парафин в металлических формочках по стандартной методике. **При выделении хориоретинального комплекса для массового параллельного секвенирования** немедленно извлекали глаза животного, дальнейшие операции проводились также на чашке Петри, помещенной на снег и заранее охлажденной. Проводили надрез глазного яблока по линии лимба. После удаления передней части глаза и хрусталика, с внутренней поверхности задней части склеры скальпелем собирали хориоретинальный комплекс, который немедленно помещали в объем 1 мл реагента RNAlater (Ambion) для индивидуальных образцов, или в 1,5мл реагента RNAlater для пулированных образцов. Образцы инкубировали в реагенте RNAlater (Ambion) 6 часов при +4°C, после чего убирали на хранение при -70°C. **При заборе образцов мозга для P<sup>31</sup>-ЯМР-спектроскопического анализа** животное подвергалось быстрой декапитации; голову немедленно замораживали и хранили в жидком азоте. Извлечение мозга из черепной коробки и его гомогенизацию проводили в фарфоровой ступке при постоянном охлаждении жидким азотом. Дальнейшая пробоподготовка проводилась незамедлительно. **Для выделения геномной ДНК** образец большой доли печени животного забирали в охлажденную пробирку и замораживали в жидком азоте. Для получения геномной ДНК животных - потенциальных производителей у живой крысы усекали, помещали в охлажденную пробирку и замораживали в жидком азоте кончик хвоста (1,0-1,2 см). Остановка кровотечения осуществлялась с приложением к ране холодного компресса (со снегом). Биологические образцы хранились при -70°C.

## **2.4 P<sup>31</sup>-ЯМР-спектроскопическое исследование кислотных экстрактов мозга**

### **2.4.1 Экстракция органических и неорганических фосфатов мозга**

Исследование метаболитов проводилось на крысах OXYS и Wistar (в общей сложности n=48) в возрасте 2, 3, 4 и 12 недель. Экстрагирование фосфатов мозга хлорной кислотой проводилось в соответствии со стандартной методикой [Glonek *et al.*, 1982; Pettegrew *et al.*, 1990] с незначительными изменениями. Стандартную навеску порошка гомогенизированного

мозга крысы, отобранную на предварительно охлажденной фольге, немедленно помещали в охлажденную на льду пластиковую центрифужную пробирку, содержащую стандартную аликвоту 6% хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ), также охлажденной на льду, из расчета 3,25 мл кислоты на 1 г растертой ткани, и тщательно перемешивали, давая нагреться до пастообразной консистенции. Затем смесь немедленно центрифугировали при 4800 об/мин в течение 10 мин при температуре  $+2^\circ\text{C}$  на центрифуге Eppendorf 5804R. Супернатант отбирали в новую, охлажденную на льду, центрифужную пробирку и немедленно титровали на льду холодным раствором 5Н КОН до значения рН смеси 10,5. Образующийся в результате титрования хлорат калия удаляли повторным центрифугированием при тех же условиях, что и первое. Супернатант отбирали в охлажденный пенициллиновый флакон, замораживали в жидком азоте на стенках флакона, высушивали методом лиофилизации, и хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$  до анализа.

#### **2.4.2 $\text{P}^{31}$ -ЯМР-спектроскопический анализ**

Исследование проводили на базе Международного томографического центра СО РАН (МТЦ СО РАН) с использованием спектрометра DRX AVANCE -200 NMR (Bruker), в сотрудничестве с профессором Е.Г. Багрянской. Лиофилизированный порошок перхлорного экстракта мозга растворяли в 650 мкл  $\text{D}_2\text{O}$  (99,95 %) в присутствии  $10^{-4}$  М этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) для лучшего разделения индивидуальных пиков в спектре. Пробирки с растворенным экстрактом фосфатов мозга центрифугировали при 20 Гц. Фосфорные спектры регистрировали при 81 МГц, количестве сканирований – 10000, времени накопления - 2,5 сек., времени задержки - 0,1 сек.; с использованием 1Н развязки. Химические сдвиги назначались относительно внешнего сигнала 85%-ной фосфорной кислоты. Относительная интенсивность сигнала метаболита были представлены в виде процентных долей от общего  $\text{P}^{31}$ -интегрального сигнала (% от общего объема зарегистрированных фосфосодержащих соединений).

#### **2.5 Офтальмологические осмотры**

Состояние глазного дна животных оценивали с помощью прямого офтальмоскопа «Beta» (Германия) после расширения зрачков 1% раствором тропикамида. Для оценки наличия и степени выраженности патологических изменений сетчатки использовали классификацию AREDS, Age-Related Eye Disease Study (<http://eyephoto.opth.wisc.edu>). Оценка проводилась в баллах, соответствующих основным стадиям развития ВМД и катаракты:

0 баллов – изменения сетчатки отсутствуют/хрусталик прозрачный;

1 балл – 1 неэкссудативная стадия ретинопатии (появление точечных кровоизлияний, отеков, друз в заднем полюсе глаза, дефектов и перераспределения пигмента в РПЭ)/ наличие очаговых «нежных» помутнений хрусталика;

2 балла – 2 экссудативная стадия ретинопатии (сопровождающаяся экссудативной отслойкой РПЭ и нейроретины, атрофией хориокапиллярного слоя и пигментного эпителия)/ множественные очаги помутнения в хрусталике;

3 балла – 3 стадия ретинопатии (наблюдается экссудативно-геморрагическая отслойка РПЭ и нейроретины, неоваскуляризация и рубцевание)/ интенсивное помутнение коры или ядра хрусталика.

## **2.6 Морфологический и морфометрический анализ методом световой микроскопии**

Эксперимент выполнен на крысах OXYS, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в возрасте 8-10 месяцев (n=5) и 12 месяцев (n=3). С помощью ротационного микротомата готовили срезы парафиновых блоков толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр и фотографирование препаратов проводили на микроскопе AxioScop 2 Plus (Zeiss, Germany).

## **2.7 Исследование поведения животных в стандартных тестах**

Группы крыс OXYS, WAG, и конгенных линий (n=11-15), а также животные гибридной популяции F<sub>2</sub> (n=77) были охарактеризованы по моторно-исследовательской активности в тесте «открытое поле», и тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», в возрасте 3 мес, к которому у крыс OXYS формируется пассивный поведенческий стереотип и повышенная тревожность на фоне появления нейродегенеративных изменений в головном мозге. Крысы групп OXYS, WAG и конгенные животные (n=7-8 из групп, участвовавших в тестировании на предыдущем этапе) прошли обучение в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» в возрасте 5 мес. В возрасте 12-ти месяцев, после исследования поведения, часть животных (n=8-15) прошла томографическое исследование. Тестирование проводили в одно и то же время суток, в период с 10 до 14 часов, в зависимости от стандартной методики. Для гистологического исследования у части животных (n=6) выделяли глазные яблоки.

### **2.7.1 Тест «открытое поле»**

Для исследования поведения животных в тесте «открытое поле» использовали квадратную камеру (100 × 100 см) с прозрачными стенками из оргстекла высотой 40 см. Полем служил лист пластика, на котором черной краской нанесена решетка, делящая поле на 100 равных квадратов (10×10 см), с особо выделенными квадратами в центре поля. Освещение производилось переносной бестеневой лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100см над центром поля. Длительность тестирования составляла 5 минут. Тестирование каждого животного проводили однократно. При проведении теста фиксировались следующие

параметры: количество пересеченных квадратов, вертикальных стоек, груминговых реакций, фиксировали латентный период выхода в центр. Для определения степени эмоционального напряжения регистрировали количество фекальных болюсов.

### **2.7.2 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»**

Уровень тревожности определяли в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Метод основан на страхе открытого пространства и падения с высоты. Установка представляет собой 4 рукава, скрепленных друг с другом под прямым углом – два противоположных рукава имеют непрозрачные боковые стенки высотой 20 см (закрыты), два других открыты. Лабиринт поднят над уровнем пола на высоту 0,5 м. Освещение производилось переносной бестеневой лампой мощностью 100 Вт, расположенной на высоте 100 см над центром установки так, чтобы освещались только открытые рукава и центральная платформа. Животное приносилось в затемненную комнату с установкой в индивидуальной маленькой клетке. Каждая попытка начиналась с помещения животного на центральную площадку, мордой по направлению к одному и тому же закрытому рукаву. Длительность тестирования составляла 5 минут. Тестирование каждого животного проводили однократно. Оценивали латентный период начала движения, время нахождения в открытом пространстве – центре и открытых рукавах, в закрытых рукавах, количество выходов в открытые рукава, в центр и заходов в закрытые рукава, а также количество вертикальных стоек, выглядываний, реакций груминга.

### **2.7.3 Тест «радиальный восьмирукавный лабиринт»**

Для оценки пространственной рабочей и референтной памяти крыс использовали установку «радиальный восьмирукавный лабиринт» (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Установка представляет собой центральную октагональную платформу (диаметром 26 см), поднятую на 15 см от уровня пола, от которой радиально расходятся 8 рукавов (67×10×20 см), открытых сверху. В конце каждого рукава под полом скрыт магнит, удерживающий кормушку с центральной выемкой (3 мм глубиной) для предотвращения визуального распознавания гранулы корма из центра лабиринта. Дверь экспериментальной комнаты, рельеф стен и потолка, а также положение экспериментатора в белом лабораторном халате, постоянное в течение всего обучения, служили дополнительными визуальными метками. Согласно стандартной вариации теста [Manahan-Vaughan, Schwegler, 2011] обучение проводилось в течение 10 дней, с предварительной 2х дневной габитуацией (привыканием крыс к лабиринту) дважды в сутки в течение 10 мин. с интервалом между сессиями 2 часа. При этом корм был рассыпан во всех рукавах. В качестве пищевого подкрепления использовались сухие зерновые шарики массой ~ 5 г. (ОАО Любятово, Россия). За два дня до начала габитуации и на весь период обучения количество корма, находящегося в свободном доступе в клетках участвующих в эксперименте

животных, было снижено до 10-15% обычного объема (20 гр/животное в сутки). Тогда же в рацион вводились зерновые шарики в количестве 2х штук индивидуально каждому животному в сутки в целях ознакомления. Вода предоставлялась *ad libitum*. Во время обучения пищевое подкрепление предъявляли в кормушках 4 из 8 рукавов лабиринта. Расположение «подкрепленных» пищевым стимулом рукавов оставалось постоянным в течение 10 дней обучения. Животное приносилось в комнату с установкой в индивидуальной маленькой клетке. В каждой сессии крысу помещали в центр установки с закрытыми перегородками рукавами, давали ей освоиться в течение 20 сек., затем перегородки убирали и наблюдали поведение животных в течение 15 мин. или пока крыса не войдет во все подкрепляемые кормом рукава. Регистрировалось расположение посещенных животным рукавов (согласно заранее присвоенному номеру от 1 до 8); количество посещений каждого рукава; время, проведенное в рукавах с кормом и в рукавах без корма; количество вертикальных стоек, актов груминга и актов дефекации – суммарно за попытку. Для каждого сеанса обучения регистрировали: число ошибок референтной памяти (RME, reference memory error) - заходы в неподкрепляемые рукава или заходы в подкрепленные рукава без поедания гранулы корма; число ошибок рабочей памяти (WME, working memory error) - повторные заходы в подкрепляемые рукава в течение одного сеанса, а также общее число входов в рукава (моторно-исследовательская активность). Повторный заход в рукав с пустой кормушкой засчитывался как двойная ошибка рабочей и долговременной памяти (DWRME, «double» working and reference memory error) согласно стандартной вариации методики [Crusio, Schwegler, Brust, 1993; Mizumori *et al.*, 1987]. Для оценки референтной памяти данные считали по следующей формуле:  $RME (\%) = RME / TN * 100\%$ , где RME (%) – процент ошибки референтной памяти, RME – число входов в неподкрепляемые рукава, TN – общее число входов в рукава [Manahan-Vaughan, Schwegler, 2011]. За исключением первого дня обучения, показатели рабочей и референтной памяти были объединены по три сессии для каждого животного (2-4 дни, 5-7 дни, 8-10 дни обучения) с целью получения более стабильных результатов [Crusio, Schwegler, Brust, 1993]. Данные для первого дня обучения обсчитывались отдельно, поскольку отражают первичное ознакомление с установкой.

## **2.8 Морфометрическое исследование мозга методом магнитно-резонансной томографии**

Исследование проводилось на крысах-самцах родительских (OXYS, WAG) и конгенных (WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2) линий в возрасте 12 месяцев (n=7-8, n=4 в случае WAG/OXYS-1.1) в центре коллективного пользования Института цитологии и генетики СО РАН на томографе («BioSpec 117/16», Bruker, Germany, работа с прибором - к.б.н. А.Е. Акулов)



методом спинного эха с многосрезовым сканированием - MSME (Multi Slice Multi spin Echo). Предварительная наркотизация проводилась внутрибрюшинным введением натрия тиопентала (0.1 гр на 1 кг массы тела в физиологическом растворе). При обработке данных пользовались программами ParaVision 5,0. Рассчитывали площадь аксиального среза мозга и удельную площадь его структур. На всех аксиальных срезах подсчитывали количество очагов демиелинизации, которые визуализировались как гиперинтенсивные точки на T<sub>2</sub>-взвешенных изображениях.

## **2.9 Поиск на 1-й хромосоме генетических локусов, ответственных за развитие у крыс OXYS ранней катаракты, ретинопатии и проявление характерных для этих животных поведенческих признаков**

Исследование проводили на крысах (самцах и самках) гибридной популяции F<sub>2</sub>, полученной от реципроктного скрещивания крыс OXYS и WAG (демонстрирующих нормальные темпы старения). В возрасте 3-4 месяца анализировали совокупность параметров поведения животных в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», а также заболеваемость ретинопатией и катарактой по результатам офтальмологических осмотров. Для выявления характерных для каждого животного аллелей микросателлитных маркеров проводили выделение тотальной геномной ДНК из печени крыс гибридной популяции методом фенол-хлороформной экстракции, ПЦР на геномной ДНК с использованием специфичных праймеров, затем анализ аллелей микросателлитов после электрофореза в ПААГ и анализ сцепления QTL с использованием доступных программных пакетов.

### **2.9.1 Выделение геномной ДНК из печени крыс методом фенол-хлороформной экстракции**

Приблизительно 50 мг ткани гомогенизировали в стерильном стеклянном гомогенизаторе в растворе, содержащем 500 мкл 0,5% SDS, 800 мкл фенола, насыщенного 1× буфером TE (10 mM трис-HCl, pH 7,4, 1mM ЭДТА, pH 8,0), 120 мкл (1/10 от общего объема смеси) 2M NaAc, pH 4,0. Гомогенат переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 50 мкл хлороформа, тщательно перемешивали, после чего смесь инкубировали на льду в течение 5 мин и проводили первое центрифугирование на центрифуге Eppendorf-5414 в течение 15 мин на 16000 об/мин при комнатной температуре. Водную фазу аккуратно отбирали в чистую пробирку, добавляли фенол, насыщенный 1× буфером TE, pH 8,0, и хлороформ (по 50% от объема аликвоты водной фазы); тщательно перемешивали, инкубировали смесь на льду в течение 5 мин и проводили второе центрифугирование при тех же условиях, что и первое. Вторично отбирали водную фазу в чистую пробирку, добавляли к ней хлороформ (100% от

объема аликвоты водной фазы); инкубировали смесь на льду в течение 5 мин и проводили третье центрифугирование при тех же условиях. Водную фазу отбирали в чистую пробирку. ДНК осаждали изопропанолом (100% от объема водной фазы) в течение 20 минут при комнатной температуре. Далее проводили центрифугирование на центрифуге Eppendorf-5414 в течение 15 мин на 16000 об/мин при комнатной температуре; осадок промывали 3 раза 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 200-300 мкл деионизированной воды. Концентрацию выделенной ДНК определяли на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer ( $\lambda = 260$  нм).

### **2.9.2 Выделение геномной ДНК из хвостов крыс с помощью протеиназы К**

Небольшой кусок замороженного хвоста (срез толщиной 3-5 мм от 1,0-1,2 см замороженного кончика хвоста данного животного) помещали в пластиковую пробирку Eppendorf, содержащую 500 мкл лизирующего буфера (10 mM трис-HCl, pH 8,0; 33,3 mM ЭДТА, pH 8,0; 10 mM NaCl; 1% SDS; 60 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол; 0,5 мг/мл протеиназы К), размалывали скальпелем, встряхивали на Vortex и инкубировали в течение 16 часов при 55°C с постоянным перемешиванием. Затем добавляли NaAc до конечной концентрации 0,4 M, тщательно перемешивали на Vortex и проводили фенол-хлороформную экстракцию, как описано выше. ДНК осаждали изопропанолом (100% от объема водной фазы). Полученный осадок промывали 3 раза 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50-100 мкл деионизированной воды. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer ( $\lambda = 260$  нм).

### **2.9.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на геномной ДНК крыс**

ПЦР проводили в смеси, содержащей 1 $\times$  ПЦР-буфер (67 mM трис-HCl, pH 8,9; 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,01% Tween-20; 10 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол), 200 мкМ каждого из четырех dNTP; 0,05 е.а./мкл Taq-ДНК-полимеразы; 3 нг/мкл каждого праймера; 5-10 нг/мкл ДНК. Поверх реакционной смеси наслаивали минеральное масло (по 5 мкл на реакцию) для предотвращения испарения. ПЦР осуществляли в объеме 10 мкл на амплификаторе Biometra T3 Thermocycler по следующей схеме: начальная денатурация 95°C – 5 мин; 38 циклов амплификации: денатурация при 95°C – 15 сек, отжиг праймеров – 20 сек (температура отжига подбиралась для каждой пары праймеров отдельно), элонгация при 72°C – 20 сек; конечная элонгация после циклов при 72°C – 5 мин. Для определения температуры отжига праймеров каждой пары ориентировались на данные базы RatMap [Petersen *et al.*, 2005] и результаты предварительных экспериментов по тестированию праймеров. Ожидаемые длины ПЦР-продуктов определялись по базам данных свободного доступа (<http://www.genome.wi.mit.edu>, <http://www.well.ox.ac.uk>). В работе были использованы праймеры к микросателлитным маркерам 1-ой хромосомы, см. таблицу 2).

**Таблица 2. Анонимные микросателлитные маркеры первой хромосомы крысы, используемые в работе. База используемых праймеров любезно предоставлена О.Е. Рединой.**

Маркер	Отжиг, °C	Праймеры, 5' → 3'	Положение на 1-ой хромосоме, Mb	Ожидаемая длина ПЦР- фрагмента
D1Rat150	64	AGAGGCAATGAAGTCCCTGA ATCCAGTGTCAACSTTTGGC	15.8	238
D1Rat234	62	GGGTACACTGGACTGGGAAA GCTGCCATTTAGTCTGGCTT	41.2	152
D1Rat196	62	TGCTTTTCAGATTCTCCTCC TACTGAGTCAATTTCTCTTGG	55.1	177
D1Rat224	58-64	AAAGCAATCTGTTTAAAAACAGTCA GCGTTTTCTCTGTGCGCAATT	90.3	167
D1Rat30	64	AATTTCTGTCCCACATTTCCC TTCCAGGGACAAGCTACCTG	100.6	223
D1Rat183	64	CAGAAGCAAGCACACCAGTC TGTATTGGCTGGGAAGTTGG	131.2	226
D1Rat131	64	TCTGCGACTACCTTGGGTTT CCAGCAATTGAAATAACATTTTCA	145.7	176
D1Rat54	64	CTGACGGAAAAAAGGACAGG GTCTGCCTGCTGGGATTAAG	168.0	173
D1Rat219	60-58	GGAAGGGATCACATTGCATT GCAAAGGACCTGTTGAAGC	188.0	248
D1Rat287	62-60	GTGCTATGGTGGGCAAGTTT GGGCGTGACCAGGTTACTTA	190.3	211
D1Rat168	64	AAGGAGCCACTAACTGTTCCC TCTCAAAGCGGCTGAGTAT	204.8	210
D1Rat117	64	CCATGAGTTGCCATGGCTAT AATGCCACACAGAGAAGGGT	219.8	125
D1Rat76	64	GAAAGAGTGTGCGTGTGCAT CTTCTGTCTCCTCGCCAATC	230.6	144
D1Rat81	64	TGGTTCCAATGGATACCCATA TGAAGACTGAATCCCCAAC	250.4	169
D1Rat86	64	AATACATGATGCTGTGGATTGG ACCCATTCCCACACCTGTAC	259.4	143
D1Wox19	58-70	TGTAATGGAATCTGATGCC GGGCTCTATAGATAGGAGGTTTTAT	185.7	160
D1Arb31	68	AGAATTAAGTGGGAGGCTGGGC AGAGGATAAAGGAAGGGCGTGG	64.2	294
D1Mco17 (Atp1a3)	66	TGAGCTTCTGGTTGAAGGATCG CTCCACATATAACCACAAAGGC	80.3	165
D1Rat1	60	GCAATGCCATGGGTTTACTC AAAAGTTATCCCCTTCCCC	10.6	129
D1Rat15	62-60	TGGAATGAAGGGGCTTACTG GTACAGGATGGCACTCGGTT	37.8	157
D1Rat27	60	TCTCTCCAGCTGCAGGATTT GGGCAAGCAAAGTACATGGT	90.3	177

D1Rat173	60-58	GATGGAGGCAGTTTTTCCAA GATCCCTTGACAAGCATGGT	145.3	156
D1Rat259	62	GTGGAACAGAGGGACTGCTT GCTTCCCTTCTCTGTGTGAA	77.15	203
D1Rat28	60	ATGCACTCTATGATTGGCCC TGTCAGGACACATTCCTGCT	88.9	148
D1Mgh9	62-66	TGACCTCCACACGTGCTAAG AGAATGCTCAGGAAAAGTTAGGG	176.9	140
D1Rat195	58-60	CCCAGCATCAACCTCTTCC TTAACCTGCTTGGTTTTGGG	264.8	210

#### 2.9.4 Электрофорез продуктов ПЦР в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез продуктов ПЦР на геномной ДНК крыс проводили в 6% полиакриламидном геле (ПААГ) – 4,5 мл 5×TBE (5,4 г трис, 2,75 г борной кислоты, 2 мл ЭДТА, рН 8,0, дистиллированной воды до 0,1 л); 0,285 мл 10% персульфата аммония; 31,195 мл дистиллированной воды; 9 мл 30% раствора акриламида (смесь 1 г бисакриламида, 29 г акриламида доводили дистиллированной водой до объема 100 мл); 20 мкл ТЕМЕД. В течение 45 мин гель оставляли для полимеризации, после чего помещали в камеру для вертикального гель-электрофореза и проводили префорез в 0,5×буфере TBE при напряженности 10 В/см в течение 30 минут. При нанесении в карманы к каждой пробе добавляли глицерин, содержащий красители бромфеноловый синий и ксиленцианол (электрофоретические маркеры) до концентрации 10%. Для нанесения на гель отбирали аликвоту пробы с добавленным красителем (5мкл) из-под слоя минерального масла. Для электрофореза использовали источник питания постоянного тока. Электрофорез проводили при комнатной температуре в 0,5×буфере TBE при напряженности 13,5 В/см. Для визуализации фрагментов ДНК после электрофореза гель обрабатывали раствором бромистого этидия (в концентрации 0,5 мкг/мл) и наблюдали в УФ свете на трансиллюминаторе T13 Wartman (Biometra).

#### 2.9.5 Анализ локусов количественного признака (QTL-анализ)

Поиск локусов, влияющих на развитие исследуемых фенотипических признаков, проводился путем выявления ассоциаций с пятью анонимными микросателлитными маркерами 1-й хромосомы, полиморфными в исследуемой гибридной популяции (D1Rat196, D1Rat224, D1Rat30, D1Rat219, D1Rat81). Соответствие наблюдаемого в гибридной популяции F<sub>2</sub> расщепления фенотипического признака моногибридному расщеплению 1:2:1 проверяли с помощью критерия  $\chi^2$ . Полученные для каждого животного гибридной популяции данные – значения фенотипических признаков и принадлежность к микросателлитному классу (гомо- или гетеро-зигот, см. приложение 1) – обрабатывались программами для анализа сцепления и

поиска локусов количественного признака: MAPMAKER/QTL и MAPMAKER/EXP (WhiteheadInstitute, Cambridge, MA, <http://www.wi.mit.edu>).

С помощью программы MAPMAKER/QTL была построена карта 1-й хромосомы, для пересчета расстояний на карте использовалась математическая формула, выведенная Дж.Б.С. Холдейном [Felsenstein, 1979]. Для преобразования полученного значения % рекомбинации в сМ использовали функцию Косамби. Полученные данные по фенотипическому анализу интегрировали в существующую базовую карту, созданную для популяции F<sub>2</sub>. Достоверность взаимосвязи между выявленными локусами и полиморфизмом по тому или иному фенотипическому признаку оценивали на основе порогового значения отношения правдоподобия логарифма шансов (logarithm of odds, LOD score). Во внимание принимались только локусы с  $LOD \geq 3,0$  ( $p \text{ value} < 0,001$ ) и  $2,5 < LOD < 3,0$  ( $p \text{ value} < 0,01$ ). Для каждого признака проводился отдельный QTL-анализ. Программой MAPMAKER/EXP выявлены QTL и рассчитаны LOD scores для каждого из них, построены графики в координатах LOD score – позиция маркера на карте 1-й хромосомы.

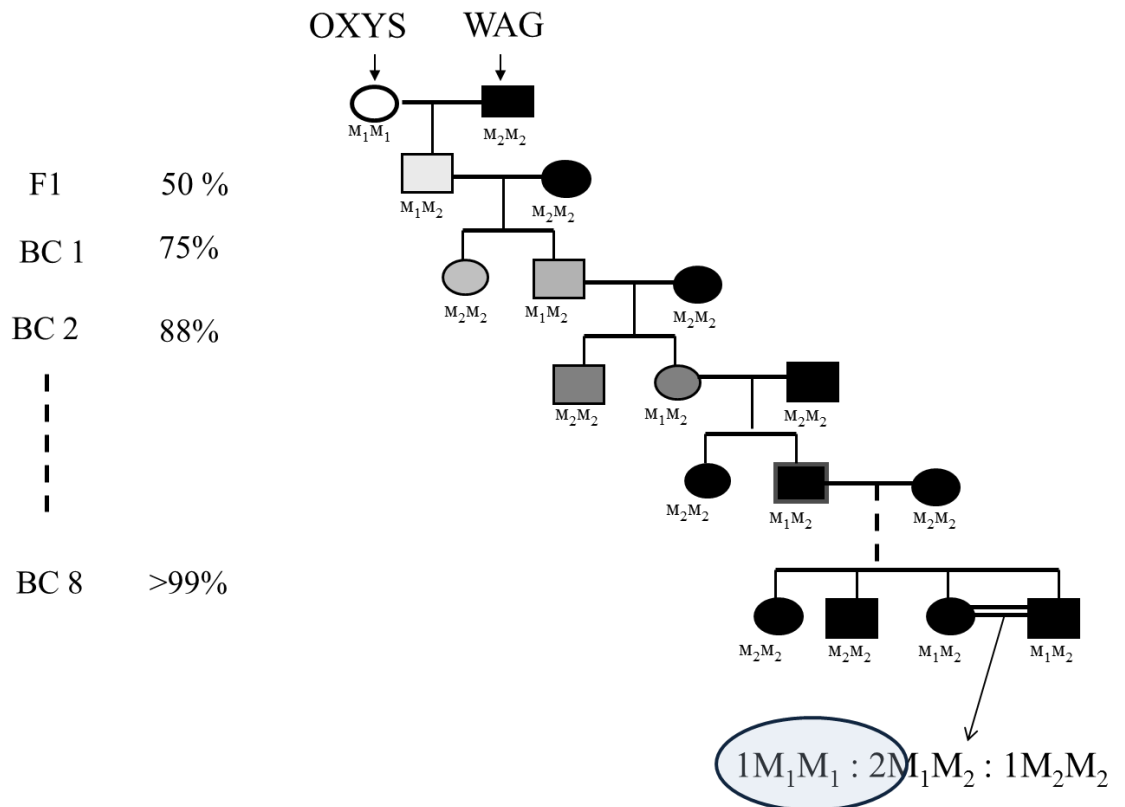
### 2.10 Конструирование конгенных линий крыс

Схема, использованная при конструировании конгенных линий крыс, приведена на рисунке 1. Для генотипирования животных каждого поколения в процессе получения конгенных линий крыс выделяли ДНК из хвостов крыс (с помощью протеиназы К). Для выявления характерных для каждого животного аллелей микросателлитных маркеров проводили ПЦР на геномной ДНК с использованием специфичных праймеров, затем анализ аллелей микросателлитов после электрофореза в ПААГ. Потомство каждого поколения тестировалось для выявления аллелей микросателлитов по структуре 13 полиморфных микросателлитных маркеров 1-й хромосомы: 5-ти маркеров с двумя аллелями (D1Rat196, D1Rat224, D1Rat30, D1Rat219 (см. таблицу 1), D1Rat81), 6-ти маркеров с тремя аллелями (D1Rat183, D1Rat54, D1Rat168, D1Rat117, D1Rat76, D1Rat86), и 2-х малополиморфных маркеров (D1Rat150, D1Rat131). При возвратных скрещиваниях использовались животные, имеющие наибольшую долю ДНК WAG вне переносимого от OXYS локуса [Jeffs *et al.*, 2000].

### 2.11 Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq) на платформе Illumina

Выделенные образцы хориоретинального комплекса были переданы в ОАО «Геноаналитика» для выделения тотальной РНК и выполнения секвенирования на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в соответствии со стандартными протоколами, рекомендуемыми производителем (Illumina, mRNA-Seq Sample Prep Kit, Cat. 1004816). Поли-А фракция РНК (мРНК) была очищена при помощи магнитных шариков (Sera-Mag Magnetic Oligo (dT) beads) и фрагментирована. В реакции обратной транскрипции с использованием Random праймеров

была синтезирована кДНК, которая была обработана Т4 ДНК полимеразой и ДНК полимеразой Кленова. К 3' тупому концу фосфорилированного ДНК фрагмента добавлялось основание аденина, после чего к нему лигировали адаптер Illumina с довеском одиночного тимина на 3' конце. После реакции лигирования адаптеров полученные библиотеки кДНК были амплифицированы и секвенированы на приборе Genome Analyzer IIx с использованием реактивов Single-Read Cluster Generation Kit v2 Sequencing by synthesis (SBS) (Illumina, Cat. FC-940-4001). Каждый образец был просеквенирован на отдельной дорожке ячейки. Для каждого образца было получено около 40 млн. прочтений (ридов) длиной 50 нуклеотидов.



**Рисунок 1. Схема скрещиваний, использованная при конструировании конгенных животных.** M1, M2 – аллели маркеров, характерные для родительских линий, F<sub>1</sub> – гибридные животные первого поколения, BC 1-8 – поколения возвратного скрещивания. Геном линии-донора указан пустым символом, геном линии-реципиента – закрашенным. Последовательное увеличение процентной доли генома линии-реципиента в геноме потомства с каждым следующим поколением возвратного скрещивания показано затемнением соответствующих символов. Слева от схемы цифрами указан теоретически ожидаемый процент генома реципиента в геноме потомства (основная схема приведена в соответствии с диаграммой, опубликованной в обзоре Джона Раппа, Rapp *et al.*, 2000).

## 2.12 Биоинформатический анализ данных RNA-seq

### 2.12.1 Картирование и анализ дифференциальной экспрессии

Оценка качества прочтений проводилась после удаления последовательностей баркодов с использованием программы FastQC. Прочтения картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* Rnor, v5,0,76 (Ensemble release 75) с помощью программы Bowtie 2 или TopHat (v2,0,10) в режиме “b2-sensitive” [Kim *et al.*, 2013a]. Количество прочтений, картированных на регионы конкретных генов, было посчитано с помощью программного пакета HTseq-count (HTSeq2), итоговые таблицы были составлены с использованием параметра MAQ>10. Оценку качества секвенирования мы проводили с использованием программы Trimmomatic для удаления адаптерных последовательностей и нуклеотидов низкого качества. Различия в экспрессии оценивались с помощью программного пакета DESeq, использующего статистическую модель отрицательного биномиального распределения [Anders, Huber, 2010]. Одновременно, такой же анализ выполнялся и для картирований, прошедших через удаление потенциальных ПЦР-дубликатов с помощью программы PicardTools, с целью отследить и исключить возможную систематическую погрешность, привнесенную на этапе амплификации библиотек. Уровень значимости изменения экспрессии рассчитывали с учетом поправки для множественных сравнений Бенжамини-Хохберга ( $p < 0,1$ ). При сравнении транскриптома сетчатки крыс двух конгенных линий (WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2) мы составляли также список генов, наиболее вариабельных по экспрессии ( $p < 0,05$  без поправки на множественные сравнения).

### 2.12.2 Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов

Определение функционального контекста данных массового параллельного секвенирования транскриптома проводили с помощью биоинформатических систем DAVID, free Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery [Dennis *et al.*, 2003] и WebGestalt, WEB-based Gene Set Analysis Toolkit [Wang *et al.*, 2013; Zhang, Kirov, Snoddy, 2005], при значении обогащения (EASE)  $p < 0,05$ .

### 2.12.3 Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-calling)

Однонуклеотидные полиморфизмы, характерные для уникальных выровненных прочтений по отношению к референсной последовательности, выявляли с использованием функции наложения в программном пакете SAMtools v. 0,1,17 [Li *et al.*, 2009]. С помощью стандартных фильтрующих команд было предсказано положение всех SNP, имеющих интегральную оценку качества (Quality) не менее 100 ( $pvalue < 10^{-5}$ ). VCF файлы были конвертированы в таблицы MySQL при помощи оригинальных сценариев Perl. Сравнительный анализ SNP, специфичных для последовательности кДНК крыс OXYS, WAG/OXYS-1.1 и

WAG/OXYS-1.2 проводили с использованием системы запросов в программном пакете MySQL 5,0, Oracle Corporation. Данные RNAseq, полученные для пулированного образца хориоретинального комплекса крыс WAG, использовались в качестве дополнительной группы сравнения. Такой подход позволил повысить достоверность определения SNP. Для финального процессинга и визуализации данных были использованы возможности свободного языка программирования R.

#### **2.12.4 Анализ фенотипического эффекта выявленных полиморфизмов (SNP)**

Поскольку крысы WAG демонстрируют нормальные темпы старения, мы предположили, что с развитием комплекса признаков преждевременного старения потенциально ассоциированы именно те однонуклеотидные полиморфизмы, которые представлены в последовательности кДНК крыс соответствующей конгенной линии (WAG/OXYS-1.1 или WAG/OXYS-1.2) и/или крыс OXYS, но не представлены в последовательности кДНК крыс WAG. Предсказание эффекта, оказываемого несинонимичной заменой в аминокислотной последовательности на функцию итогового белкового продукта, проводили с использованием алгоритма SIFT [Ng, Henikoff, 2001] при помощи веб-инструмента the Variant Effect Predictor (VEP, ENSEMBL, [McLaren *et al.*, 2010]. Предсказание классифицировалось как «существенное влияние» («deleterious») при значении  $0 < \text{SIFT score} < 0,05$ , и как «умеренное влияние» («tolerated») при значении  $0,05 < \text{SIFT score} < 1$ .

#### **2.13 Статистический анализ**

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA (версия 6,0). Полученные данные были проанализированы с использованием факторного дисперсионного анализа (ANOVA/MANOVA) с post-hoc сравнением групповых средних в тесте Ньюмена-Кейлса (Newman-Keul test). Независимыми факторами служили генотип и возраст животных. При оценке параметров поведения и способности к обучению использовали зависимые парные сравнения. Во всех тестах  $p < 0,05$  рассматривалось как статистически значимое. Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$



## Глава 3: РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Оценка метаболического состояния мозга крыс методом

#### $P^{31}$ ЯМР-спектроскопии

Для оценки возможной связи преждевременного старения крыс OXYS с нарушениями энергетического метаболизма исследовали его состояние в мозге крыс OXYS методами  $P^{31}$  ЯМР-спектроскопии в ранний постнатальный период и в период активной манифестации признаков ускоренного старения мозга – формирования пассивного стереотипа поведения и нарушения способности к обучению.

Работа выполнена на крысах-самцах ( $n=48$ ) линий OXYS и Wistar (контроль) в возрасте  $14\pm 1$  дней (2 недели),  $20\pm 2$  дня (3 недели),  $30\pm 2$  дня (4 недели) и 3 месяцев (12 недель). Количество животных в каждой возрастной группе составляло от 5-ти до 12-ти. Для оценки состояния энергетического метаболизма мозга были проанализированы  $P^{31}$  ЯМР-спектры кислотных экстрактов мозга крыс, показательный спектр представлен на рисунке 1. Идентифицируются резонансные пики, соответствующие фосфорным моноэфирам (ФМЭ):  $\alpha$ -глицерол фосфату ( $\alpha$ -ГФ), L-фосфосерину (ФС), фосфоэтаноламину (ФЭ) и фосфохолину (ФХ); неорганическому фосфату (НФ); фосфодиэфирам: глицерол-3-фосфоэтаноламину (ГФЭ), и глицерол-3-фосфохолину (ГФХ); креатинфосфату (КФ); нуклеозид трифосфатам (в основном  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ АТФ); нуклеозид дифосфатам  $\alpha$ - и  $\beta$ АДФ); динуклеотидам (ДН, в т.ч. никотинамидадениндинуклеотиду); а также комплексный резонансный пик, отражающий присутствие дифосфопроизводных нуклеозидов и цитидина (в частности, уридиндифосфосахаров, цитидиндифосфохолина, цитидиндифосфоэтанолamina) [Glonek *et al.*, 1982; Pettegrew *et al.*, 1990]. Содержание каждого исследуемого соединения было рассчитано как доля от общего количества экстрагированных фосфатов. Были вычислены показатели, характеризующие доступность (относительное содержание) высокоэнергетических соединений – КФ и АТФ, - отношения КФ/НФ и АТФ/АДФ\*НФ (фосфатный потенциал). Кроме того, оценивалась способность генерирования АТФ в ходе расходования пула КФ – отношение КФ/ $\beta$ АТФ (см. главу 1 «Обзор литературы»).  $P^{31}$ -профиль кислотных экстрактов мозга крыс для возрастных групп 3 и 4 недели представлен в таблице 3. Как показал факторный ANOVA-анализ, на содержание неорганического фосфата (НФ) в мозге генотип животных значимо не влиял, но на него влиял возраст. И у крыс Wistar, и у крыс OXYS в возрасте 4 недель содержание НФ было в 2 раза выше, чем у 20-ти дневных животных ( $F(1,27)=6,9$ ;  $p<0,014$ ). Содержание  $\beta$ АТФ в мозге также зависело только от возраста животных ( $F(1,25) = 5,2$ ,  $p = 0,033$ ), и у крыс обеих линий в возрасте 4 недель было выше, чем в 3 недели.

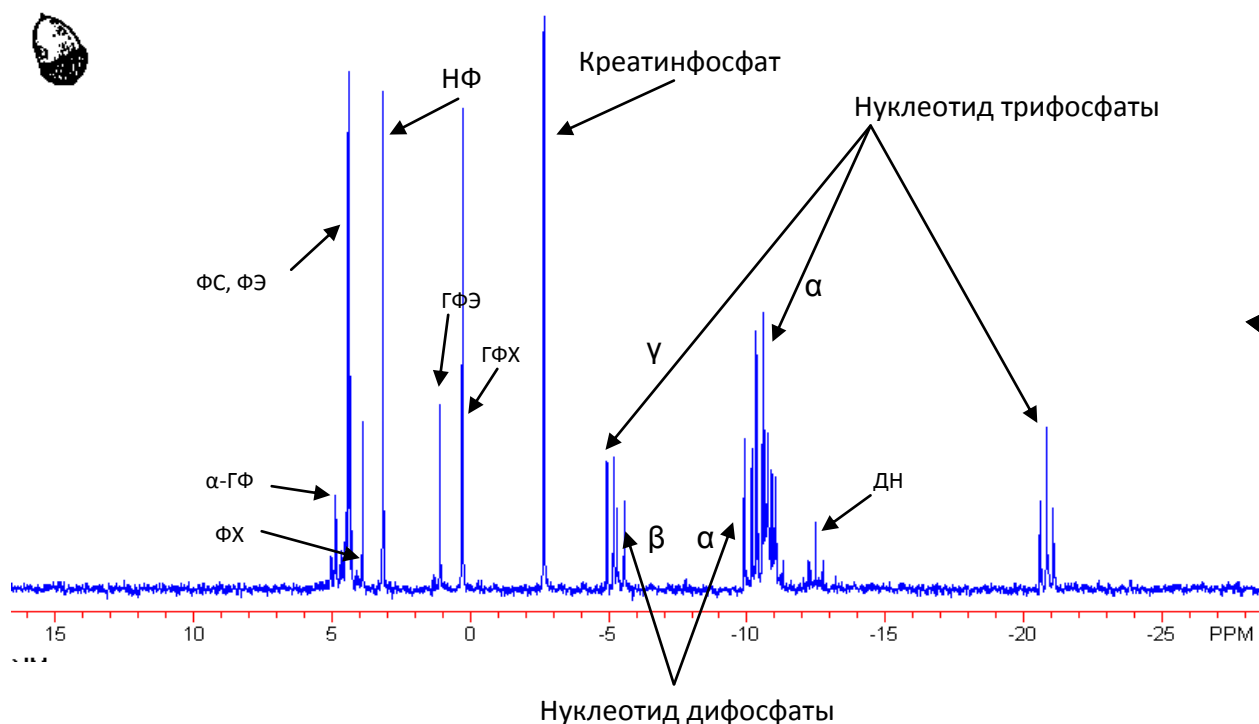


Рисунок 2. Показательный  $P^{31}$  ЯМР спектр перхлорного экстракта мозга крысы.

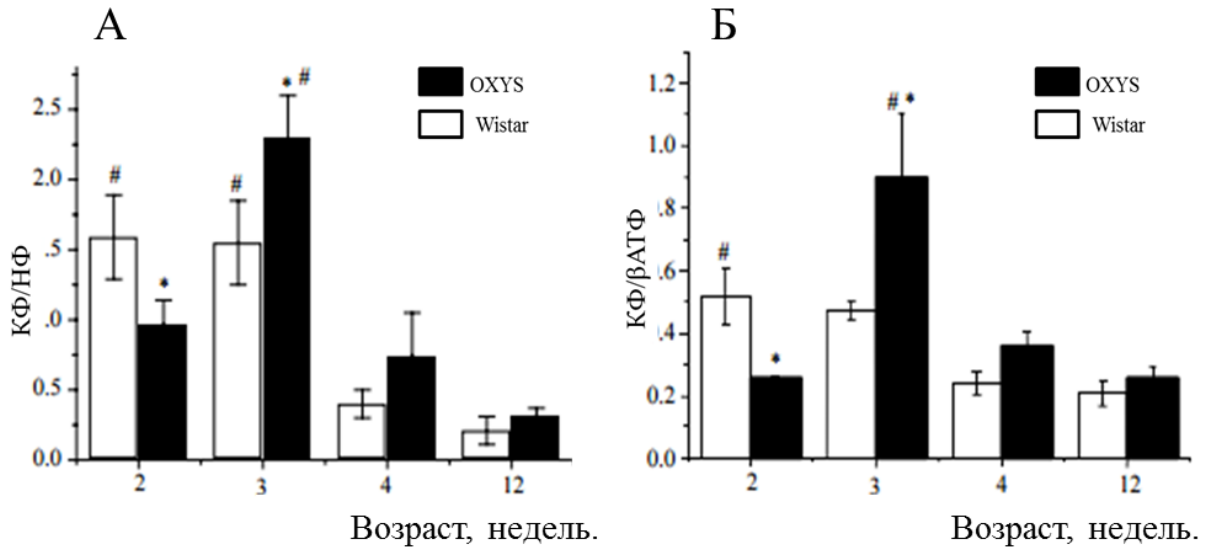
Таблица 3.  $P^{31}$ -профиль кислотных экстрактов мозга крыс линий OXYS и Wistar в возрасте 20 дней и 30 дней (3 и 4 недели), где n - количество особей в каждой группе, ♦ - достоверные возрастные различия, выявляемые при парных сравнениях. Содержание соединений дано в доле от общего количества экстрагированных фосфатов с указанием ошибки среднего.

Показатель	Wistar		OXYS	
	20 дней (n = 5)	30 дней (n = 12)	20 дней (n = 4)	30 дней (n = 10)
НФ	0,074±0,0085	0,155±0,024 p=0,053	0,059±0,006	0,136±0,018♦ p=0,0026
КФ	0,105±0,006	0,062±0,010♦ p=0,025	0,141±0,022	0,079±0,006♦ p=0,002
ГФЭ	0,017±0,004	0,023±0,008	0,016±0,0016	0,023±0,0036
ГФХ	0,038±0,010	0,023±0,008	0,038±0,004	0,042±0,0136
γАТФ	0,061±0,008	0,043±0,008	0,059±0,005	0,050±0,007
βАДФ	0,053±0,010	0,096±0,009	0,040±0,011	0,066±0,009
αАДФ	0,126±0,053	0,096±0,0097	0,182±0,068	0,093±0,008

$\alpha$ АТФ	0,087±0,018	0,107±0,009	0,066±0,038	0,113±0,006
ДН	0,114±0,020	0,083±0,028	0,135±0,010	0,089±0,026
$\beta$ АТФ	0,084±0,015	0,061±0,010	0,075±0,012	0,071±0,0105
КФ/НФ	1,129±0,037	0,494±0,128	2,13±0,26	0,836±0,021
ФМЭ	-	0,316±0,048	-	-
ФДЭ	-	0,204±0,106	-	-
АТФ/АДФ*НФ	0,106±0,022	0,188±0,023♦ p=0,039	0,079±0,034	0,181±0,025♦ p=0,045
КФ/ $\beta$ АТФ	1,08±0,25	1,170±0,312	2,23±0,71	1,515±0,0421

В мозге, как и в мышцах, креатинфосфат (КФ) служит резервным источником высокоэнергетических фосфатных групп и при отсутствии других источников используется для синтеза АТФ в обратной креатинкиназной реакции. Как показал факторный ANOVA-анализ, на содержание КФ в мозге влияли как генотип животных ( $F(1,27) = 5,6$ ,  $p = 0,026$ ), так и их возраст ( $F(1,27) = 10,3$ ,  $p = 0,003$ ). В мозге крыс OXYS содержание КФ было выше, чем у крыс Wistar: в 1,35 раз в возрасте 3 недель, и в 1,27 раза в возрасте 4 недель. При этом у крыс каждой линии содержание КФ в мозге в период от 3 до 4 недель снижалось в 1,7 раза.

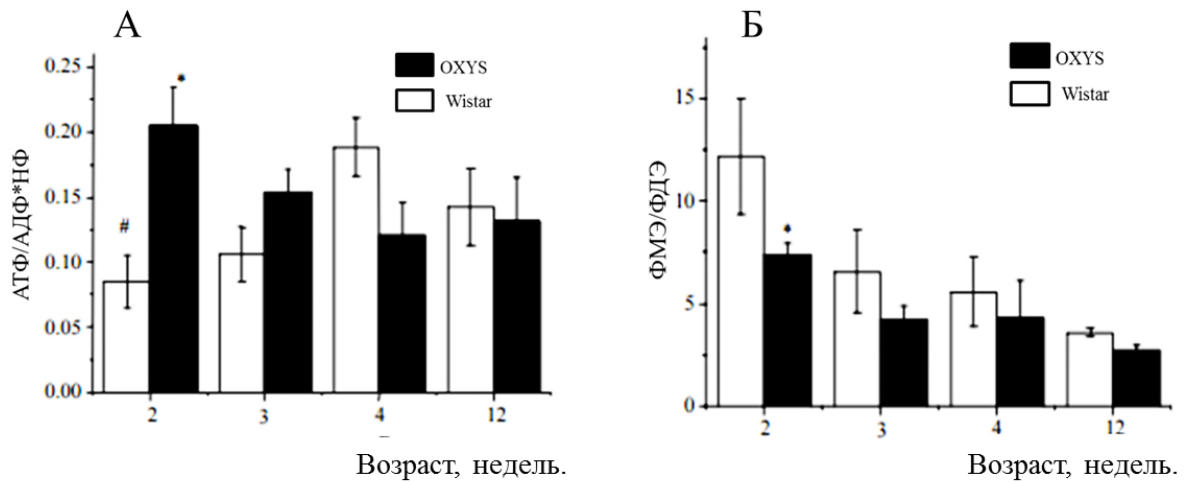
При сравнении всех исследуемых возрастных групп (2, 3, 4, и 12 недель) двухфакторный ANOVA-анализ выявил влияние фактора «возраст» на отношение КФ/НФ ( $F(3, 37)=19,6$ ;  $p<0,0001$ ) (см. рисунок 3А). Влияния фактора «генотип» выявлено не было, что обусловлено различиями в изменении отношения КФ/НФ с возрастом как у крыс Wistar, так и у крыс OXYS. Соотношение КФ/НФ в мозге крыс Wistar в период от 2 до 3 недель жизни достоверно не изменялось, но затем значительно понижалось к возрасту 4 недель и оставалось на том же уровне у 12-недельных животных. В мозге крыс OXYS в возрасте 2 недель соотношение КФ/НФ было значительно ниже, чем у крыс Wistar ( $p < 0,035$ ), к возрасту 3 недель существенно возрастало до более высокого, чем у крыс Wistar уровня, а затем, как и у крыс Wistar, снижалось.



**Рисунок 3. Соотношения содержания КФ/НФ (А) и КФ/βАТФ (Б) в кислотных экстрактах мозга крыс (n=5-12).** Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$  \* - достоверные межлинейные различия; # - достоверные различия по сравнению с возрастной группой 4 недель.

Отношение КФ/βАТФ также зависело от возраста животных, но на него не влиял генотип (см. рисунок 3Б). При этом факторы «возраст» и «генотип» взаимодействовали ( $F(3,33)=3,4$ ;  $p<0,028$ ), что указывает на различия в изменении этого параметра с возрастом у крыс исследуемых линий. Действительно, post hoc сравнения показали, что у крыс OXYS отношение КФ/βАТФ в возрасте 2 недель было ниже, а в возрасте 3 недель – выше, чем у крыс Wistar. У крыс Wistar отношение КФ/βАТФ имело максимальные значения в возрасте 2 недель и с возрастом уменьшалось ( $p<0,023$ ,  $p<0,010$  и  $p<0,014$  для возраста 3, 4 и 12 недель, соответственно). У крыс OXYS, напротив, значения отношения КФ/βАТФ в возрасте 3-х недель были выше, чем в возрасте 2-х ( $p<0,016$ ), 4-х ( $p<0,013$ ) и 12-ти недель ( $p<0,019$ ).

ANOVA-анализ выявил влияние фактора «возраст» и на отношение АТФ/АДФ\*НФ - фосфатный потенциал ( $F(3, 34)=2,86$ ;  $p<0,050$ ), причем динамика изменения этого параметра с возрастом в мозге крыс OXYS и Wistar была различной (см. рисунок 4А). У крыс OXYS значение фосфатного потенциала с возрастом незначительно понижалось, у крыс Wistar - напротив, существенно повышалось в период от 2 до 4 недель. Групповые сравнения выявили достоверные межлинейные различия, но только в возрасте 2 недель: у крыс OXYS в этом возрасте значение фосфатного потенциала было достоверно выше, чем у крыс Wistar ( $F(1,6)=5,49$ ;  $p<0,06$ ).



**Рисунок 4. Значения фосфатного потенциала АТФ/АДФ\*НФ (А) и значение отношения ФМЭ/ФДЕ (Б) в кислотных экстрактах мозга крыс (n=5-12). Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$  \* достоверные межлинейные различия; # - достоверные различия по сравнению с возрастной группой 4 недель.**

Как показал двухфакторный ANOVA-анализ, отношение ФМЕ/ФДЕ в мозге крыс - показатель интенсивности обмена фосфолипидов - зависело от возраста животных ( $F(3,27) = 3,85, p < 0,0205$ ) и на него не влиял генотип. Однако при помощи парных сравнений были выявлены достоверные различия в значениях отношения ФМЕ/ФДЕ между 2-недельными крысами OXYS и Wistar ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок 4Б). У крыс Wistar отношение ФМЕ/ФДЕ с возраста 2 до 3 недель жизни существенно снизилось, а затем снижалось незначительно вплоть до 12-недельного возраста. При этом в мозге 2-недельных крыс Wistar отношение ФМЕ/ФДЕ было значительно выше, чем в мозге одновозрастных крыс OXYS. Это позволяет предполагать, что в мозге крыс OXYS процессы катаболизма мембранных фосфолипидов протекают активнее, чем их синтез. В пользу этого предположения свидетельствует также более высокое содержание ФДЕ в мозге крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar в возрасте 2 недель.

Таким образом, исследование состояния энергетического метаболизма с помощью методов ЯМР-спектроскопии не выявило признаков дефицита энергии в мозге крыс OXYS в возрасте 3 месяцев – в период активной манифестации фенотипических проявлений ускоренного старения мозга и развития нейродегенеративных изменений. В период завершения формирования головного мозга (возраст 2-3 постнатальных недель) содержание КФ в мозге крыс OXYS было выше, чем у крыс Wistar. В нервной, как и в мышечной ткани, КФ служит резервным источником высокоэнергетических фосфатных групп, который при отсутствии других источников образования энергии используется для синтеза АТФ в обратной

креатинкиназной реакции. Его повышенное содержание рассматривается как признак адаптации к гипоксии.

### **3.2 Идентификация локусов, ответственных за проявление комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS**

Поиск локусов количественного признака (QTL) в настоящем исследовании был проведен методом сканирования первой хромосомы, имеющей длину – 267,9 Mb. Крысы популяции F<sub>2</sub> (n=77, самцов и самок), полученной при реципрокном скрещивании крыс OXYS и крыс WAG, контрастных по совокупности исследуемых фенотипических признаков, были охарактеризованы по заболеваемости катарактой, ретинопатией и особенностям поведения в стандартных тестах в возрасте 3-4-х месяцев. Геномная ДНК популяции гибридов F<sub>2</sub> была протестирована с использованием базы из 26 анонимных микросателлитных маркеров 1-ой хромосомы (см. таблицу 1 в соотв. разделе главы 2 «Материалы и методы»), любезно предоставленной к.б.н. О.Е. Рединой. В исследуемой выборке гибридов F<sub>2</sub> полиморфными оказались только 5 из 26 микросателлитных маркеров 1-й хромосомы, которые и были использованы в последующем QTL-анализе: 1) D1Rat196 (положение на карте хромосомы 55,1 Mb), 2) D1Rat224 (90,3 Mb), 3) D1Rat30 (100,6 Mb), 4) D1Rat219 (188,0 Mb), 5) D1Rat81 (250,4 Mb). Полиморфизм этих 5 маркеров проявился в наличии среди гибридов F<sub>2</sub> как особей, несущих два аллельных варианта длины микросателлитной последовательности в гомозиготе, так и гетерозиготных особей. Соотношение этих трех маркерных классов, оцененное с помощью критерия  $\chi^2$ , соответствовало теоретически ожидаемому (1:2:1). Для большей части остальных использованных маркеров (D1Rat183, D1Rat54, D1Rat168, D1Rat117, D1Rat76, D1Rat86) у гибридов F<sub>2</sub> были обнаружены особи, гомозиготные по 3-м аллельным вариантам длины микросателлитной последовательности. При этом нарушалось предположение о том, что у животных каждой из родительских линий (OXYS и WAG) данная микросателлитная последовательность должна быть представлена в гомозиготе единственным характерным аллельным вариантом длины. Такие данные не могут быть обработаны программой MAPMAKER, требуется наличие в анализируемой выборке только трех маркерных классов – двух классов гомозигот и одного класса гетерозигот. Маркеры D1Rat150 и D1Rat131 оказались малополиморфными: для них расщепление в популяции F<sub>2</sub>, оцененное с помощью критерия  $\chi^2$ , не соответствовало теоретически ожидаемому при моногибридном расщеплении (1:2:1). Неполлиморфными (неразличающимися по характерной длине микросателлитной последовательности) у крыс OXYS и WAG оказались 13 из всех проанализированных маркеров 1-ой хромосомы: D1Wox19, D1Arb31, D1Mco17 (Atp1a3), D1Mgh9, D1Rat1, D1Rat15, D1Rat27, D1Rat28, D1Rat173, D1Rat195, D1Rat234, D1Rat259, D1Rat287.

В результате обработки данных были получены значимые ( $>3$ ) LOD scores, а также LOD scores в интервале от 2,5 до 3 для следующих признаков:

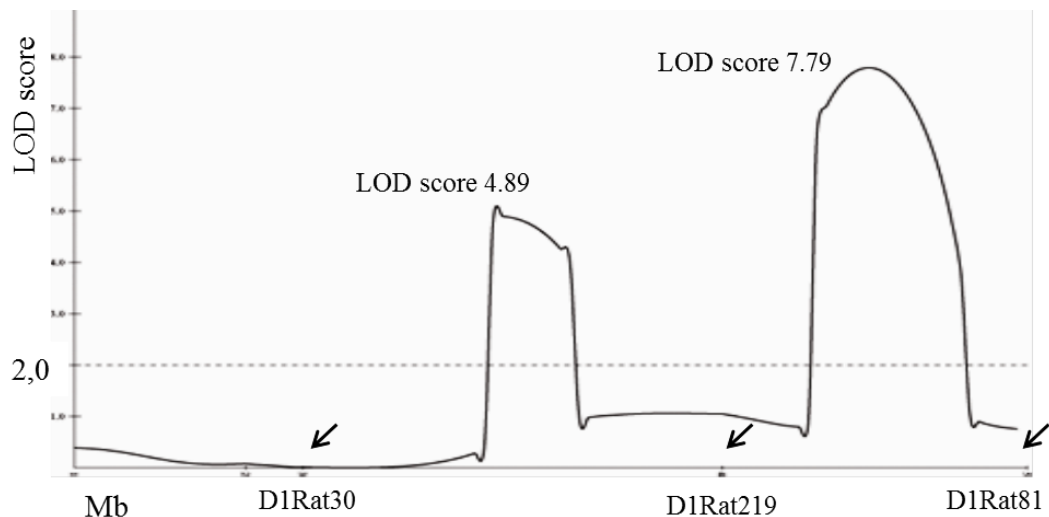
1. заболеваемость ретинопатией: пик между D1Rat30 (100,6 Mb) и D1Rat219 (188,0 Mb), LOD score 4,89, пик между D1Rat219 и D1Rat81 (250,4 Mb), LOD score 7,79 (см. рисунок 5);
2. заболеваемость катарактой: пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 3,07 (см. график № 2 приложения 2);
3. латентный период выхода в центр в тесте открытого поля: пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 43,94, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 38,86 (см. график № 3 приложения 2);
4. латентный период выхода в центр в крестообразном лабиринте: пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 28,80, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 28,83 (см. график № 4 приложения 2);
5. время, проведенное в центре, в крестообразном лабиринте: пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 7,02, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 5,57 (см. график № 5 приложения 2);
6. количество актов груминга в крестообразном лабиринте: пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 2,85 (см. график №6 приложения 2);

Таким образом, для указанных фенотипических признаков в двух интервалах: между маркерами D1Rat30 и D1Rat219, и между маркерами D1Rat219 и D1Rat81, - были выявлены значимые кандидатные QTL (их расположение на карте хромосомы соответствует пикам, см. соответствующий раздел главы 1 «Обзор литературы»). Соответствующий график для ретинопатии, иллюстрирующий наличие двух кандидатных локусов количественного признака на первой хромосоме крыс OXYS, представлен на рисунке 5. С остальными графиками для исследуемых фенотипических параметров можно ознакомиться в приложении 2. Кроме того, для таких параметров, как количество вертикальных стоек в тесте ОП и количество выглядываний в тесте крестообразного лабиринта, интервалам между этими маркерами соответствовали пики с  $2 < \text{LOD scores} < 3$ . Можно было предположить, что обнаруженные кандидатные QTL оказывают влияние на проявление и этих признаков (см. графики № 7,8 приложения 1). Для остальных признаков выявлены незначимые QTL с LOD scores  $< 2$  (см. графики № 9-18 приложения 2). Таким образом, результаты QTL-анализа указывали на существование на первой хромосоме крыс:

1) QTL1 – локуса количественного признака, ответственного за развитие ретинопатии и проявление некоторых характерных для крыс OXYS поведенческих признаков, в

интервале между маркерами D1Rat30 (положение на хромосоме – 100,6 Mb) и D1Rat219 (188,0 Mb);

2) QTL2 – локуса количественного признака, ответственного за развитие катаракты, ретинопатии и проявление некоторых характерных для крыс OXYS поведенческих признаков, между маркерами D1Rat219 (188,0 Mb) и D1Rat81 (250,4 Mb).



**Рисунок 5. График распределения статистической значимости для заболеваемости ретинопатией в исследованной гибридной популяции  $F_2$  на первой хромосоме.**

На следующем этапе работы для проверки гипотез, построенных по результатам QTL-анализа, и для доказательства существования в выявленных локусах QTL1 и QTL2 генов, влияющих на развитие у крыс OXYS исследуемых признаков преждевременного старения, на базе линий крыс OXYS и WAG были сконструированы конгенные линии крыс (см. главу 2 «Материалы и методы»). Согласно литературным данным, на 8-ом поколении возвратного скрещивания (backcross) геном реципиента теоретически должен составлять  $> 99\%$  [Rapp, 2000]. В настоящем исследовании каждый из двух гипотетических QTL (QTL1 и QTL2) первой хромосомы крыс OXYS был перенесен в геном линии-реципиента WAG, при помощи 8 возвратных скрещиваний с последующим переводом в гомозиготное состояние. В результате были получены две линии конгенных крыс, названные нами WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, соответственно. На настоящий момент в племенном ядре поддерживается 12-13-е поколение для каждой из конгенных линий.



### 3.3 Характеристика конгенных крыс по фенотипическим признакам

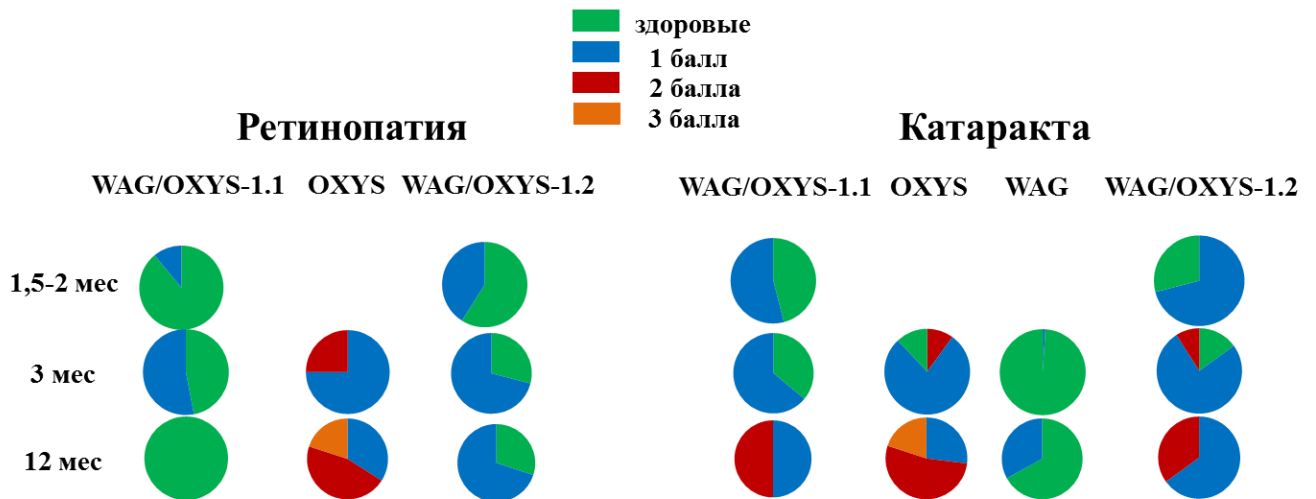
Проявление исследуемого фенотипического признака у животных конгенных линий считается прямым и достаточным доказательством существования в локусе количественного признака гена/генов, оказывающих влияние на его развитие у животных линии-донора локуса [Nadeau *et al.*, 2000; Schauwecker, 2011]. Офтальмологические осмотры животных первых поколений конгенных линий подтвердили, что локусы первой хромосомы крыс OXYS, перенесенные в геном конгенных крыс, действительно оказывают влияние на развитие у крыс ретинопатии и ранней катаракты. При этом было установлено, что и ранняя катаракта, и ретинопатия в возрасте 1,5-2 мес развиваются у крыс обеих созданных конгенных линий, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, что расходилось с первоначальными гипотезами, сформулированными по результатам QTL-анализа [Korbolina *et al.*, 2012]. Поэтому следующий этап настоящего исследования был посвящен характеристике конгенных животных WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 по заболеваемости катарактой и ретинопатией, а также поведению и способности к обучению в стандартных тестах.

#### 3.3.1 Заболеваемость катарактой и ретинопатией

Согласно результатам офтальмологических осмотров, в возрасте 1,5-2 месяцев в 54% глаз конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 обнаруживаются кортикальные и задне-субкапсулярные помутнения, соответствующие 1 стадии катаракты и в 11% глаз - признаки 1 стадии ретинопатии. У крыс WAG/OXYS-1.2 в этом возрасте признаки 1 стадии катаракты регистрировались в 76% глаз, а признаки 1 стадии ретинопатии - в 41% глаз [Korbolina *et al.*, 2012]. Для исследования характера прогрессии катаракты и ретинопатии с возрастом в настоящей работе был проведен офтальмологический осмотр крыс конгенных линий в возрасте 3 и 12 мес в сравнении с одновозрастными крысами родительских линий WAG и OXYS. Согласно его результатам клиническая картина у конгенных животных и крыс линии-донора QTL различна (см. рисунок 6).

В возрасте 3 мес 100% крыс OXYS имели патологические изменения глазного дна и 89% - хрусталика. При этом в 9% случаев у животных этого возраста регистрируется 2 стадия катаракты, а в 25% - ретинопатии [Markovets, Fursova, Kolosova, 2011]. Выраженность патологических изменений хрусталиков и сетчатки закономерно прогрессировала с возрастом. У годовалых крыс OXYS только в 27% глаз (n=30) изменения соответствовали первой стадии, в 53% глаз – второй, а 20% случаев – третьей стадии катаракты, при которой помутнение хрусталиков не уже позволяет оценить состояние глазного дна. В 58% глаз, для которых такая оценка была возможна, патологические изменения сетчатки соответствовали 2 стадии ретинопатии. Для сравнения, у крыс второй родительской линии WAG были выявлены

признаки начальной стадии катаракты: в возрасте 3 мес - только в двух глазах (n=30), в возрасте 12 мес – в 50% случаев (n = 15, 30 глаз). Признаков ретинопатии у крыс родительской линии WAG обнаружено не было [Korbolina *et al.*, 2012].



**Рисунок 6. Распределение по стадиям катаракты и ретинопатии глаз крыс OXYS, WAG, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в возрасте 1,5-2; 3 и 12 месяцев.** Данные представлены как процент обследованных глаз со стадией заболевания, соответствующей стадиям катаракты и ВМД у людей по международной классификации AREDS (Age-Related Eye Disease Study grade protocol). У крыс WAG признаков ретинопатии не выявляется, признаки катаракты выражены слабо.

У крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 в возрасте 3 мес. признаки катаракты первой стадии зарегистрированы в 71% глаз, признаки ретинопатии, соответствующие первой стадии ВМД, были выявлены также в 71% глаз (n=15, 30 глаз), но случаев катаракты и ретинопатии 2 стадии не было [Korbolina *et al.*, 2012]. В возрасте 12 мес признаки катаракты присутствовали в 100% глаз крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2. В 65% из них изменения хрусталиков соответствовали первой, в 35% - второй стадии заболевания. В 70% глаз крыс этой линии были выявлены признаки ретинопатии, соответствующие 1 стадии ВМД. Признаков второй стадии ретинопатии у крыс WAG/OXYS-1.2 в возрасте 12 мес не выявлено. Таким образом, и катаракта, и ретинопатия у крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 развиваются, и катаракта даже заметно прогрессирует с возрастом (выявляются случаи второй стадии заболевания). Это указывает на значимое влияние генов, расположенных в перенесенном конгенном локусе первой хромосомы, на развитие заболеваний. При этом патологические изменения сетчатки и

хрусталиков у крыс WAG/OXYS-1.2 даже в годовалом возрасте выражены слабее, чем у крыс OXYS.

У крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.1. в возрасте 3 мес признаки катаракты первой стадии отмечены в 64% глаз (n=15, 30 глаз), случаев катаракты 2 стадии не было. К возрасту 12 мес заболеваемость катарактой достигла 100%. В 50% глаз (n=15, 30 глаз), изменения хрусталиков соответствовали 1 стадии, в 50% - 2 стадии заболевания. Таким образом, заболеваемость катарактой у крыс WAG/OXYS-1.1 (как и у WAG/OXYS-1.2) прогрессировала менее активно, чем у крыс OXYS, но активнее, чем у крыс WAG. Это указывает на значимое влияние генов, расположенных в перенесенном конгенном локусе первой хромосомы, на прогрессию катаракты у крыс WAG/OXYS-1.1 (см. рисунок 6).

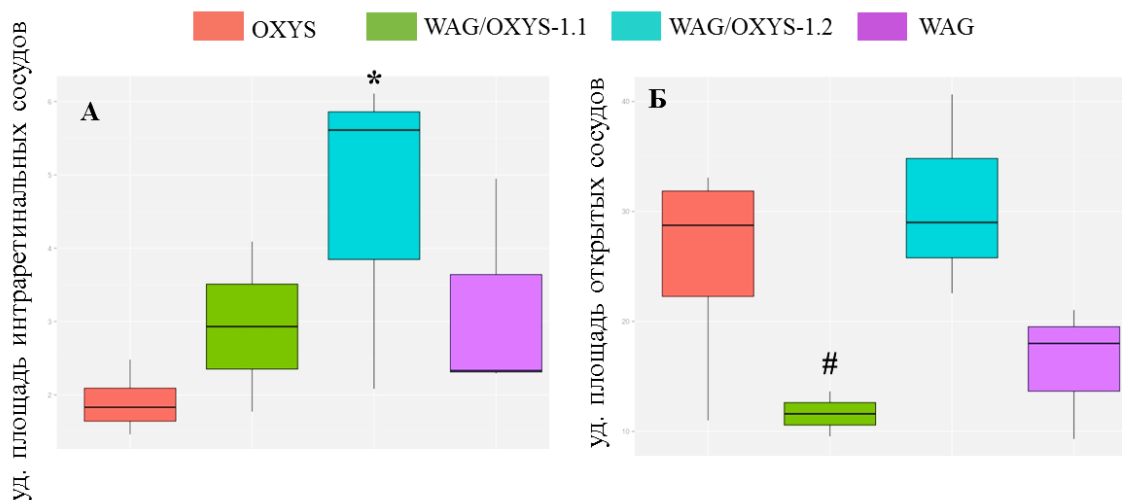
В возрасте 3 мес в 53% глаз (n=30) крыс WAG/OXYS-1.1 были выявлены признаки ретинопатии первой стадии, случаев второй стадии ретинопатии не наблюдалось. Однако при офтальмоскопическом осмотре этих же животных в возрасте 12 месяцев патологических изменений сетчатки выявлено не было, по клиническим признакам обнаружена 100% ремиссия заболевания, чего никогда не наблюдалось у крыс OXYS без медикаментозной поддержки (лечения или профилактики). Подобные случаи ремиссии наблюдаются и у крыс линии WAG/OXYS-1.2 при регулярных офтальмологических осмотрах плеядра. Таким образом, ген/гены из перенесенного от родительской линии OXYS локуса первой хромосомы оказывают влияние и на развитие ретинопатии у конгенных животных WAG/OXYS-1.1. Однако у конгенных крыс заболевание протекает иначе, чем у крыс OXYS, предположительно на фоне иного генного окружения.

Можно полагать, что такие клинические особенности ретинопатии обусловлены в частности, различиями в состоянии иммунной системы животных конгенных и родительской линий. Крыс OXYS отличает сниженная реактивность иммунной системы, на что указывают результаты анализа проведенного нами исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS в возрасте 3 и 18 мес [Kozhevnikova *et al.*, 2013a], а также выявленная ранее недостаточность Т-клеточного звена иммунной системы на фоне ускоренной инволюции тимуса [Obukhova, Skulachev, Kolosova, 2009; Маркова Е.В., 2003]. Различия в клинической картине заболевания были подтверждены также результатами проведенного нами гистологического исследования.

### **3.3.2 Гистологическое исследование особенностей развития ретинопатии у крыс конгенных линий**

Как показали наши исследования, у крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 в возрасте 3 мес дистрофические изменения сетчатки развиваются на фоне полноценного воспалительного процесса с преимущественным повреждением ганглионарного, внутреннего ядерного слоев и интратинальных сосудов, в которых были выявлены признаки нарушения микроциркуляции -

явления сладжа и тромбоза. О развитии воспалительного процесса в сетчатке конгенных крыс свидетельствует массовая миграция во внутренний сетчатый и ганглионарный слои лимфоцитов и макрофагов. Такая картина характерна для больных ВМД, однако слабо выражена у крыс OXYS, у которых в первую очередь поражаются клетки ретинального пигментного эпителия и сосуды хориоидеи [Markovets, Fursova, Kolosova, 2011]. Гистоморфометрическое исследование тканей глазного дна животных в возрасте 8-10 мес показало, что крысы конгенных линий отличаются от крыс родительской линии OXYS прежде всего по параметрам, характеризующим ретинальное кровоснабжение. Их отличает увеличенная удельная площадь интратретиальных сосудов (см. рисунок 7).

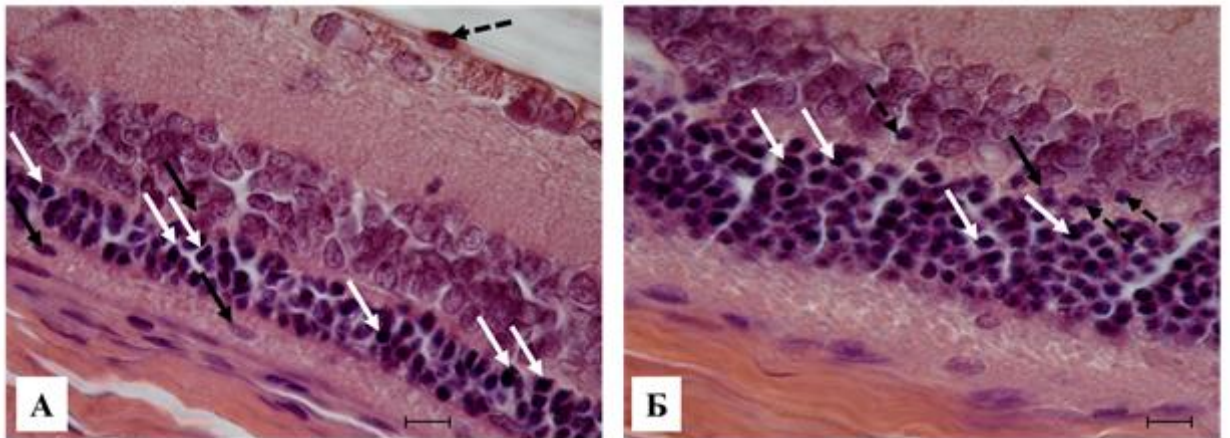


**Рисунок 7. Удельная площадь интратретиальных сосудов (А) и открытых сосудов хориоидеи (Б) у крыс конгенных и родительских линий в возрасте 8-10 месяцев (n=3-6). Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$ . \* - достоверные различия с крысами OXYS, # – достоверные отличия с крысами WAG/OXYS-1.2.**

При этом у крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.1 удельная площадь открытых функционирующих сосудов хориоидеи значительно снижена по сравнению с крысами OXYS и WAG/OXYS-1.2 (при парных сравнениях  $p=0,007$ ). Это потенциально может приводить к увеличению доли деструктивных нейронов, а именно нейросенсорных клеток и ганглионарных нейронов, в сетчатке.

В центральной части сетчатки крыс OXYS в возрасте 8-10 мес наблюдается истончение фотосенсорного слоя, значительное снижение рядов ядер нейросенсорных клеток в наружном ядерном слое, сближение ядер нейросенсорных клеток с ассоциативными нейронами вследствие деструкции отростков нейронов и синаптических контактов наружного сетчатого слоя. При этом ядра нейросенсорных клеток различного размера и формы, среди них много ядер с признаками пикноза. В сетчатке крыс обеих конгенных линий в возрасте 8-10 месяцев

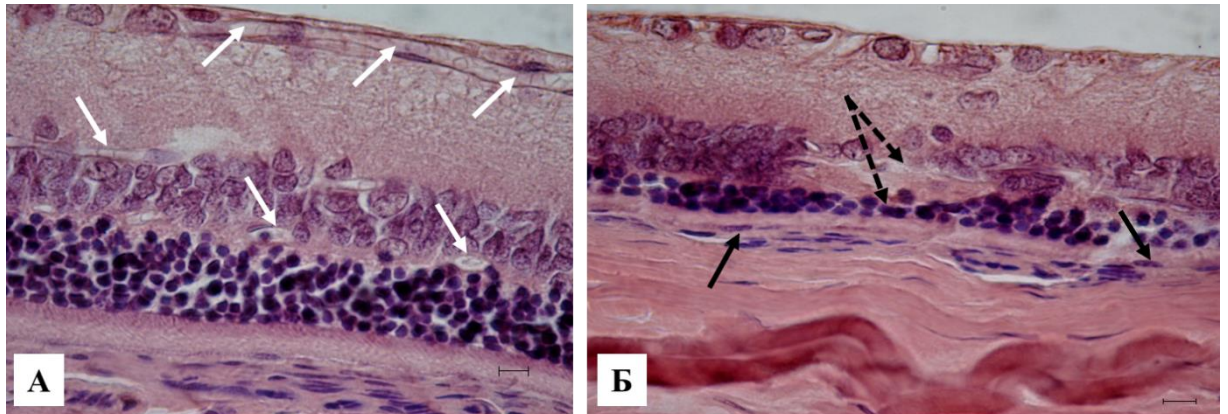
также отмечается появление большого количества нейросенсорных клеток с пикнозом ядра, часть ядер мигрирует в наружный сетчатый и во внутренний ядерный слои (см. рисунок 8). С возрастом в сетчатке конгенных крыс происходит массовая деструкция нейросенсорных клеток со снижением количества рядов ядер нейросенсорных клеток и контакта их с пигментным эпителием. Появление во внутреннем ядерном слое сетчатки большого количества гиперхромных и пикноморфных ассоциативных нейронов указывает на развитие нейродегенеративных изменений. При этом для сетчатки крыс OXYS уже в возрасте 8-10 месяцев характерны изменения пигментного эпителия в виде появления гранул липофусцина, чего не наблюдается у конгенных крыс.



**Рисунок 8. Сетчатка крысы OXYS (А) и WAG/OXYS-1.2 (Б) в возрасте 10 мес.** Указаны контакты перикарионов нейросенсорных клеток с ассоциативными нейронами (черная стрелка), пикноз ядер нейросенсорных клеток (белые стрелки), миграция ядер нейросенсорных клеток (пунктирные стрелки). Количество рядов ядер нейросенсорных клеток в этом возрасте больше у конгенных животных. Масштаб 10 мкм.

Морфологические изменения в сетчатке крыс линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 имеют определенное сходство. Открытые полнокровные интравитреальные капилляры наблюдаются в сетчатке крыс обеих конгенных линий в возрасте 8-10 месяцев, однако к возрасту 16 месяцев регистрируется закрытие большинства из них и, кроме того, постепенное уплощение ядер пигментоцитов, снижение количества рядов ядер нейросенсорных клеток вплоть до 1-2х (см. рисунок 9). В совокупности по результатам офтальмологических осмотров и гистологического исследования, можно заключить, что у конгенных животных проявляются признаки катаракты и ретинопатии, характерные для крыс OXYS, и свидетельствующие в пользу участия перенесенных в геном конгенных животных локусов первой хромосомы в патогенезе заболеваний. Но и катаракта, и ретинопатия у крыс конгенных линий прогрессируют с возрастом менее существенно, чем у крыс OXYS. При этом у конгенных животных

выявляются не все признаки ретинопатии, характерные для крыс OXYS, однако развивающиеся с возрастом в сетчатке крыс линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 морфологические изменения имеют определенное сходство. В целом, полученные результаты соответствуют ожидаемым с учетом того, что конгенные животные несут локусы первой хромосомы линии-донора (крыс OXYS) на фоне генома крыс линии-реципиента (WAG).



**Рисунок 9. Морфологические изменения в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.2 с возрастом: в возрасте 10 мес (А) и 16 мес (Б).** Указаны открытые интратетинальные капилляры (белые стрелки), уплощение ядер пигментоцитов (черные сплошные стрелки), деструктивные изменения нейросенсорных и ассоциативных нейронов (черные пунктирные стрелки). Масштаб 10 мкм.

### 3.3.3 Признаки ускоренного старения мозга

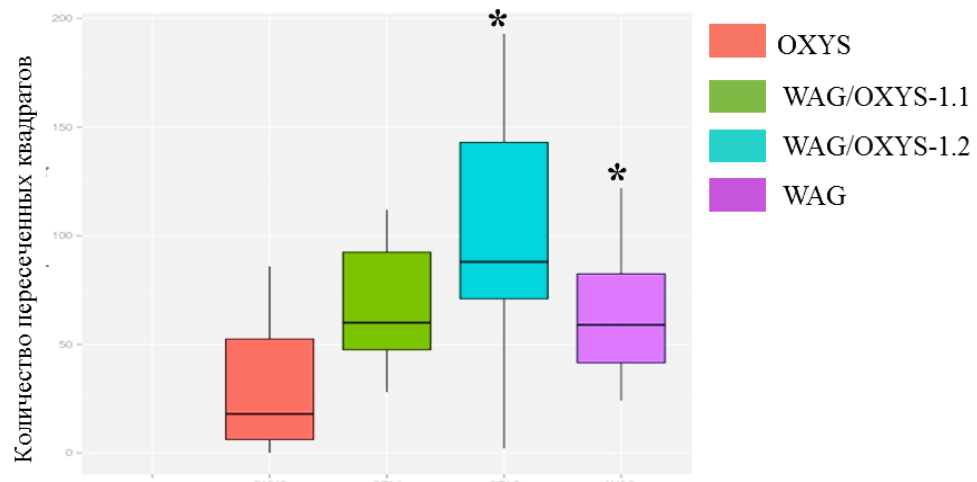
#### 3.3.3А Исследование поведения животных

Такие изменения в когнитивной сфере, как нарушения памяти, а также эмоциональные изменения, свойственны как стареющим людям, так и животным [Calignon de *et al.*, 2012]. При этом прогрессия нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА, сопровождается двигательными нарушениями и значительным ухудшением памяти. В настоящем исследовании группы крыс OXYS, WAG и конгенных животных WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 (n=11-15) были охарактеризованы по моторно-исследовательской активности в тесте «открытое поле» и тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Исследовали животных в возрасте 3 мес, к которому у крыс OXYS формируются пассивный поведенческий стереотип и повышенная тревожность на фоне регистрируемых в головном мозге методами МРТ нейродегенеративных изменений [Stefanova *et al.*, 2015a; Stefanova *et al.*, 2015b].

Исследования показали, что в тесте «открытое поле» поведение трёхмесячных крыс OXYS и WAG существенно различается только по параметру, характеризующему горизонтальную двигательную активность животных - количество пересеченных за время тестирования квадратов было существенно ниже у крыс OXYS ( $p < 0,05$ ). Двигательная



активность крыс линии WAG/OXYS-1.1 была на уровне крыс WAG, в то время, как крысы WAG/OXYS-1.2 по количеству пересеченных квадратов значительно отличались от крыс OXYS ( $p=0,0001$ ), но при этом демонстрировали значительную вариабельность этого параметра. Двигательная активность части исследуемых животных была даже выше, чем у крыс WAG (см. рисунок 10).

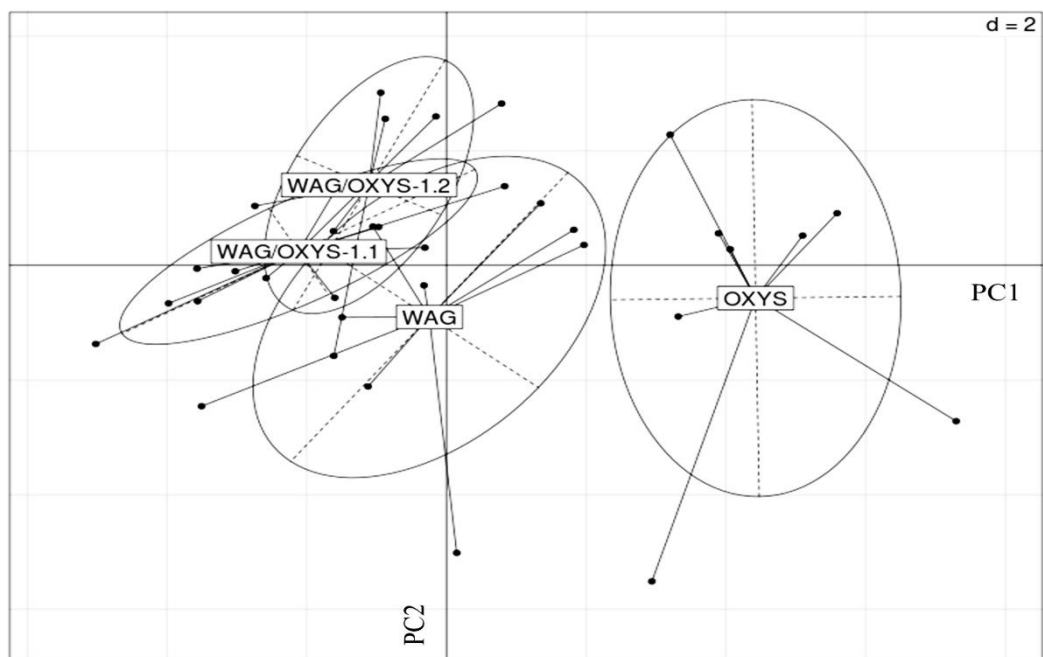


**Рисунок 10. Горизонтальная двигательная активность крыс OXYS, WAG, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в возрасте 3 мес в тесте «открытое поле» (n=12-15). Данные представлены как  $M \pm S.E.M.$  \* - достоверные различия с крысами OXYS.**

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» крысы конгенных линий по уровню тревожности (выходам в открытые рукава и времени, проведенном в них) достоверно не отличались ни от крыс WAG, ни от крыс OXYS.

Референтная память крыс OXYS, WAG и конгенных животных (n=7-8, тех же групп) в возрасте 5 месяцев оценивалась по способности к обучению в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт». Согласно стандартной вариации теста обучение проводилось в течение 10 дней с предварительной 2-дневной габитуацией. Средние значения параметров были рассчитаны для четырех периодов обучения: 1-го, 2-4, 5-7 и 8-10 дней обучения. Количество входов в рукава лабиринта (показатель горизонтальной двигательной активности) у крыс OXYS было достоверно ниже, а количество актов груминга (показатель тревожности животных) – выше, чем у крыс WAG и конгенных животных ( $p < 0,05$ ). Интересно, что на 2-м этапе обучения крысы WAG/OXYS-1.1 также показали тенденцию к увеличению количества актов груминга ( $p=0,645$ ). Анализ результатов также выявил влияние генотипа на вертикальную двигательную активность во время тестирования в лабиринте - количество вертикальных стоек ( $F(12, 278,1)=2,6341$ ,  $p=0,00237$ ). Ни в один из периодов обучения мы не выявили достоверных межлинейных отличий в количестве ошибок рабочей памяти (количестве повторных заходов в

уже посещенные рукава лабиринта за время тестирования) и в проценте ошибок памяти (отношении числа входов в неподкрепляемые пищевым стимулом рукава к общему числу посещенных за время тестирования рукавов, выраженной в процентах). Тем не менее, анализ совокупности всех показателей поведения животных в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» методом Монте-Карло выявил достоверные межлинейные различия при парных сравнениях групп OXYS, WAG, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 ( $p < 0,01$ ). При этом по результатам кластерного анализа крысы конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в терминах обучения в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» оказались гораздо ближе к крысам родительской линии WAG, чем к крысам OXYS (см. рисунок 11).



**Рисунок 11.** Анализ совокупности параметров поведения крыс в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA). Показатели крыс конгенных линий в координатах PC1/PC2 показывают меньший разброс, чем у крыс родительских линий.

### 3.3.3Б Исследование морфофункциональных параметров мозга крыс

Ранее показано, что в возрасте 3 мес. у 75%, а в 12 мес. – у 100% крыс OXYS присутствуют выявляемые методами МРТ нейродегенеративные изменения в головном мозге – очаги демиелинизации - разрушения или нарушения формирования миелиновой оболочки нервных волокон, характерные для нейродегенеративных процессов. С их появлением совпадает по времени формирование пассивного поведенческого стереотипа у крыс OXYS, в то время как снижение способности к обучению проявляется позже на фоне



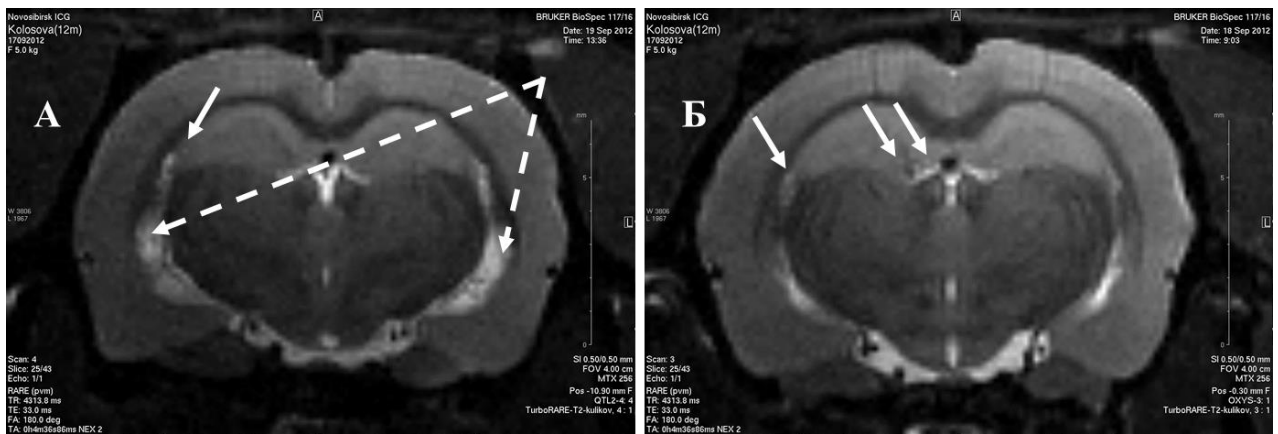
прогрессирующих нейродегенеративных изменений и хронической ишемии [Stefanova *et al.*, 2015a; Stefanova *et al.*, 2015b]. Кроме того, уже в возрасте 3 мес у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar выражена гидроцефалия желудочков мозга. Тем не менее, МРТ-исследование конгенных животных в возрасте 3 месяцев не выявило признаков нейродегенеративных изменений.

Подробное исследование структурно-функциональных характеристик головного мозга методами магнитно-резонансной томографии было выполнено на годовалых крысах OXYS, WAG, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2. Анализ результатов показал, что в возрасте 12 мес признаки нейродегенеративных изменений у конгенных животных присутствуют, однако, в отличие от крыс OXYS, они даже в этом возрасте менее выражены. Доля животных с проявлениями демиелинизации составила 100% у крыс OXYS, 32% - у крыс WAG, 25% - у крыс WAG/OXYS-1.1 и 43% - у крыс WAG/OXYS-1.2 (см. таблицу 4). При этом у крыс OXYS и WAG/OXYS-1.2 очаги демиелинизации наблюдались и в области мозолистого тела, и в гиппокампе, а у крыс WAG/OXYS-1.1 – преимущественно в мозолистом теле. У конгенных животных количество очагов демиелинизации было меньше, чем у крыс OXYS: наиболее существенно – на порядок – в мозолистом теле ( $p < 0,001$ ) и в 2 раза - в гиппокампе ( $p < 0,091$ , на уровне тенденции).

В возрасте 12 мес. у крыс конгенных линий и крыс WAG по сравнению с крысами OXYS, увеличена ( $p < 0,001$ ) удельная площадь боковых желудочков мозга на аксиальном срезе, отражающая их объем (см. рисунок 12). Данное увеличение может быть связано с дисбалансом между выработкой ликвора и его резорбцией, характерным для нейродегенеративных состояний [Chaarani *et al.*, 2013; Frisoni *et al.*, 2010; Lepore *et al.*, 2013]. Достоверных отличий конгенных животных и WAG/OXYS-1.1 от крыс WAG по морфофункциональным параметрам мозга выявлено не было. В целом, выявленные особенности морфофункционального состояния мозга крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, а также особенности их поведения и обучения в стандартных тест-системах, соответствуют ожидаемым результатам с учетом того, что конгенные животные несут локусы первой хромосомы линии-донора (крыс OXYS) на фоне генома крыс линии-реципиента (WAG).

**Таблица 4. Некоторые показатели морфофункционального состояния мозга крыс, данные магнитно-резонансной томографии.** Данные даны как  $M \pm SD$ ,  $n=8-14$ . \* - достоверные отличия от крыс OXYS. Достоверных межлинейных отличий конгенных крыс от WAG не выявлено.

Показатель	OXYS (n=14)	WAG/OXYS-1.1 (n=8)	WAG/OXYS-1.2 (n=14)	WAG (n=11)
Площадь желудочков, мм <sup>2</sup>	7,44±0,55	11,75±0,90*	11,05±1,27*	11,25±0,86*
Доля животных с проявлениями демиелинизации, %	100	25±25*	43±20*	32±23*
Общее количество очагов демиелинизации/срез	2,86±0,40	0,25±0,25*	0,86±0,46*	0,76±0,43*



**Рисунок 12. Аксиальные срезы головного мозга интактных крыс WAG/OXYS-1.2 (А) и OXYS (Б) в возрасте 12 мес.** Указаны увеличение размеров боковых желудочков у конгенных крыс (А; белые пунктирные стрелки) и наличие очагов демиелинизации (А, Б; белые сплошные стрелки).

### 3.4 Анализ данных массового параллельного секвенирования (RNA-seq)

Согласно данным проведенного ранее анализа с использованием биоинформатических методов, локусы первой хромосомы крыс OXYS, QTL1 QTL2, в настоящей работе индивидуально перенесенные в геном конгенных животных, обогащены генами, относящимися в терминах Gene Ontology к метаболическому пути болезни Альцгеймера [Kozhevnikova *et al.*, 2013a; Kozhevnikova *et al.*, 2013b]. Определенные признаки нейродегенеративных изменений у конгенных животных были выявлены при МРТ исследовании их мозга, однако при сравнении с годовалыми крысами родительской линии WAG значимых различий по морфофункциональным параметрам мозга и характеристикам поведения и обучения выявлено не было. Тем не менее, катаракта, а также нейродегенеративные изменения сетчатки у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 выявляются, что доказывает влияние генов, расположенных в перенесенных локусах первой хромосомы, на их развитие. Более того, в специальном исследовании мы показали, что манифестация характерных для ВМД нейродегенеративные изменения сетчатки у крыс OXYS происходит на фоне изменения уровней мРНК более 600 генов, основная часть которых ассоциирована с такими терминами Gene Ontology, как иммунный ответ, воспаление, ответ на окислительный стресс, Ca<sup>2+</sup>-гомеостаз и апоптоз, а также на фоне усиленного накопления бета амилоида [Kozhevnikova *et al.*, 2013a]. В связи с этим на следующем этапе исследования в качестве фокусной ткани была выбрана сетчатка (хориоретинальный комплекс) животных конгенных и родительской линии OXYS, а для решения задач исследования были использованы возможности метода массового параллельного секвенирования (RNA-seq).

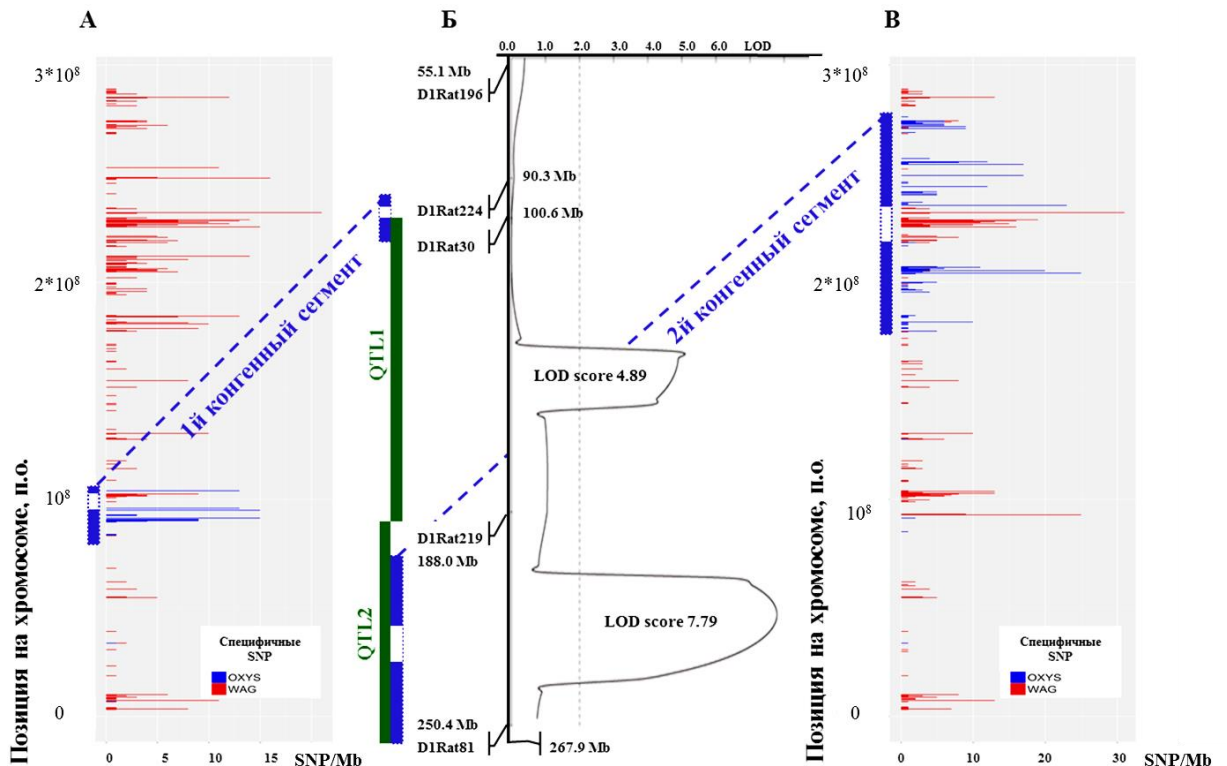
Массовое параллельное секвенирование кДНК библиотек, сконструированных для сетчатки (хориоретинального комплекса) 20-дневных крыс OXYS (n = 3), WAG/OXYS-1.2 (n = 3) и WAG/OXYS-1.1 (n=2, 1 пулированный образец), было проведено на платформе Illumina Genome Analyzer IIx. Дополнительно секвенировали кДНК-библиотеку, полученную для образца сетчатки 3-месячных крыс WAG (n=3, 1 пулированный образец). Для каждой кДНК библиотеки нами было получено более 40 млн прочтений (ридов), из которых после картирования на референсный геном и процессинга с учетом качества, около 60-70% составили уникально картированные прочтения, которые и были использованы для дальнейшего анализа.

#### 3.4.1 Картирование конгенных локусов первой хромосомы

Подробное картирование перенесенных в конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 локусов первой хромосомы крыс OXYS было проведено по результатам сравнительного анализа выявленных методом RNA-seq различий последовательностей кДНК крыс родительских линий OXYS и WAG. Данные RNA-seq для библиотеки, полученной для

крыс WAG, использовались в качестве дополнительной группы сравнения. Такой подход позволил повысить достоверность определения SNP.

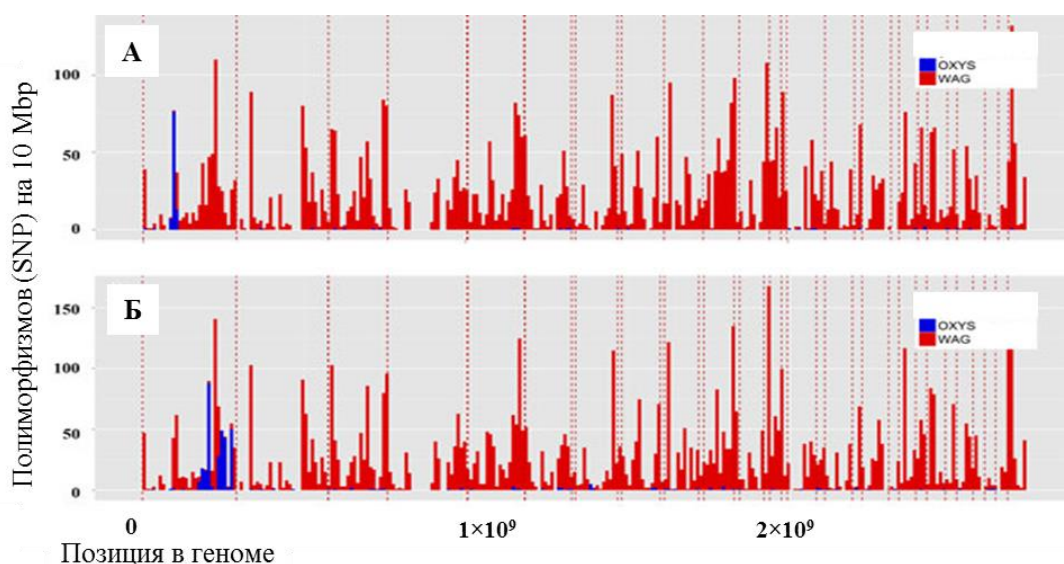
Установлено, что локус первой хромосомы, перенесенный в конгенную линию WAG/OXYS-1.2, соответствует по положению  $1,78 \times 10^8$ – $2,1 \times 10^8$  п.н. и  $2,34 \times 10^8$ – $2,75 \times 10^8$  п.н. первой хромосомы (см. рисунок 13). С учетом событий кроссинговера, имевших место при конструировании конгенных линий, этот регион соответствует по положению локусу количественного признака QTL2, идентифицированному по результатам QTL-анализа [Korbolina *et al.*, 2012].



**Рисунок 13. Распределение на первой хромосоме конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 (панель А) и WAG/OXYS-1.2 (панель В), однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных у крыс родительских линий. Красные пики соответствуют SNP, характерным для крыс WAG, синие – для OXYS. На панели Б показан график распределения статистической значимости для заболеваемости ретинопатией в гибридной популяции  $F_2$  на первой хромосоме. Вертикальная пунктирная линия соответствует порогу статистической значимости (LOD score =2,0). Зелеными прямоугольниками слева от графика показаны локусы количественного признака QTL1/2, синими – картированные конгенные локусы (1й конгенный локус лишь частично соответствует положению локуса QTL1).**

Крысам конгенной линии WAG/OXYS-1.1 от родительской линии OXYS перенесены регионы первой хромосомы, соответствующие положению  $8,9 \times 10^7$ – $9,7 \times 10^7$  п.н. и  $1,04 \times 10^8$ –

$1,05 \times 10^8$  п.н. Интересно то, что фактически перенесенные в конгенную линию WAG/OXYS-1.1 локусы первой хромосомы крыс OXYS лишь частично перекрываются с локусом QTL1 (см. рисунок 13). Тем не менее, у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 катаракта и ретинопатия развиваются, что свидетельствует в пользу влияния генов, расположенные в фактически перенесенном локусе, на развитие заболеваний. Как видно на рисунке 14, конгенные локусы хромосомы идентифицируются однозначно, причем достоверность определения их границ не зависит от достоверности определения SNP. Показано, что практически все выявленные SNP находятся в гомозиготном состоянии и у крыс OXYS, и у крыс конгенных линий. При этом нами не выявлено протяженных локусов, перенесенных от крыс OXYS в геном конгенных животных на других хромосомах.



**Рисунок 14.** Распределение однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных у крыс родительских линий OXYS и WAG, на хромосомах конгенных животных WAG/OXYS-1.1 (панель А) и WAG/OXYS-1.2 (панель Б). Красные пики соответствуют SNP, характерным для крыс WAG, синие – для OXYS. По вертикальной оси - COUNTS – количество кодирующих SNP/10 Mbp. По горизонтальной оси – длина всех хромосом генома крысы в порядке возрастания порядковых номеров, границы индивидуальных хромосом указаны вертикальными пунктирными линиями красного цвета. Локусы, перенесенные в геном крыс конгенных линий от родительской линии OXYS, располагаются на первой хромосоме.

Таким образом, в результате сравнительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных в кДНК крыс OXYS, WAG и конгенных линий, показано, что в геном крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 действительно перенесены

локусы первой хромосомы от родительской линии OXYS (первый и второй конгенные локусы, соответственно, см. рисунок 13). Нами проведено точное картирование перенесенных локусов. Согласно анализу данных по ENSEMBL IDs, представленных в проекте ENCODE (<http://www.ensembl.org>), в первом (у крыс WAG/OXYS-1.1) и во втором (у крыс WAG/OXYS-1.2) конгенных локусах картируется 195 и 1013 гена, соответственно.

### **3.4.2 Сравнительный анализ выявленных несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP)**

На следующем этапе настоящего исследования мы провели поиск и сравнительный анализ кодирующих полиморфизмов (SNP) в генах, картированных в пределах конгенных локусов первой хромосомы, с использованием данных RNAseq. В качестве дополнительной группы сравнения использовались крысы WAG, контрастные по исследуемым фенотипическим признакам. Анализ с помощью онлайн-инструмента VEP [McLaren *et al.*, 2010] выявил несинонимичные замены нуклеотидов в 19 генах, расположенных в перенесенных от крыс OXYS к крысам конгенных линий локусах первой хромосомы: 6-ти - у крыс WAG/OXYS-1.1 и 13-ти – у крыс WAG/OXYS-1.2 (см. таблица 5). Для 10-ти выявленных однонуклеотидных полиморфизмов, согласно анализу базы данных проекта ENCODE, не обнаружено известных колокализованных вариантов. Вероятность нарушения функции итогового белкового продукта определена с использованием алгоритма SIFT [Ng, Henikoff, 2001]. Ни одна из обнаруженных замен кодонов не приходится на консервативный функциональный район, что не исключает влияние на функцию итогового белкового продукта, в том числе при взаимодействии с другими белками. Ни один из 19-ти генов-кандидатов не входит в число генов, дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс OXYS и крыс соответствующей конгенной линии. По крайней мере один однонуклеотидный полиморфизм, локализованный в гене *Arhgap33*, потенциально существенно нарушает структуру итогового белкового продукта (предсказание «deleterious»).

**Таблица 5. Несинонимичные относительно референсной последовательности замены в генах конгенных локусов первой хромосомы, представленные у конгенных животных соответствующей линии и крыс OXYS, но не представленные у крыс WAG.** CDS – позиция замены в последовательности CDS; замена AA – замена аминокислотного остатка с указанием позиции в аминокислотной последовательности белка; SIFT – предсказание по вероятности влияние замены на функцию белкового продукта согласно алгоритму SIFT; вариант – известный идентификатор колокализованного аллельного варианта полиморфизма согласно данным проекта ENCODE.

Символ гена	Принятое название гена	Алиель	CDS	Замена AA	Замена кодона	SIFT (score)	Вариант
<b>Конгенный локус первой хромосомы в линии WAG/OXYS-1.1</b>							
<i>Hps5</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 5	C	667	223 R/G	Aga/Gga	tolerated (0,46)	-
		T	188	63 R/K	aGg/aAg	tolerated (0,25)	-
<i>Cic</i>	capicua transcriptional repressor	A	1517	506 C/Y	tGc/tAc	tolerated (0,08)	-
<i>Arhgap33</i>	RhoGTPase activating protein 33	T	3466	1156 D/N	Gat/Aat	deleterious (0,01)	-
<i>Lin37</i>	lin-37 homolog ( <i>Caenorhabditiselegans</i> )	A	547	183 P/S	Cca/Tca	tolerated (0,18)	-
<i>Cebpg</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), $\gamma$	T	410	137 S/N	aGc/aAc	tolerated (0,45)	-
<i>Nudt19</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	C	1015	339 S/G	Agc/Ggc	tolerated (0,42)	-
<b>Конгенный локус первой хромосомы в линии WAG/OXYS-1.1</b>							
<i>Ccp110</i>	centriolar coiled coil protein 110kDa	A	868	290 D/N	Gat/Aat	tolerated (0,17)	rs197588212
<i>Gtf3c1</i>	general transcription factor	A	6379	2127 R/C	Cgt/Tgt	-	rs8156681

	IIC, polypeptide 1, $\alpha$	C	5692	1898 T/A	Aca/Gca	tolerated (0,75)	rs198509438
		C	5021	1674 N/S	aAt/aGt	tolerated (0,74)	rs106585674
<i>Rabep2</i>	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 2	C	1007	336 I/T	aTc/aCc	tolerated (1)	rs8153744
<i>Aldoa</i>	aldolase A, fructose bisphosphate	C	493	165 M/V	Atg/Gtg	tolerated (0,58)	rs8160964
<i>Inpp5f</i>	inositol polyphosphate-5- phosphatase F	C	3075	1025 L/F	ttG/ttC	tolerated (0,44)	-
<i>Psat1</i>	phosphoserine aminotransferase 1	T	316	106 A/T	Gct/Act	tolerated (0,61)	-
<i>Tjp2</i>	tight junction protein 2	T	767	256 R/H	cGc/cAc	tolerated (0,59)	rs198995028
<i>Ak3</i>	adenylate kinase 3	T	368	123 L/Q	cTa/cAa	tolerated (0,66)	rs197195051
<i>Ric1</i>	RAB6A GEF complexpartner 1	G	229	77 N/D	Aac/Gac	tolerated (1)	rs197794754
<i>RGD1311595</i>	similar to KIAA2026 protein	C	2613	871 I/M	atA/atG	tolerated (1)	rs198237726
<i>Sfxn3</i>	sideroflexin 3	A	927	309 N/K	aaC/aaA	tolerated (0,92)	rs8163692
<i>Nolc1</i>	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	A	421	141 E/K	Gag/Aag	tolerated (0,61)	rs8165446
<i>Pdcd11</i>	programmed cell death 11	C	3005	1002 I/T	aTc/aCc	tolerated (1)	-



Согласно современным представлениям, риск развития БА модулируется множественными генетическими факторами, при этом выделяют несколько генетически гетерогенных форм заболевания (см. главу 1 «Обзор литературы»). В настоящем исследовании мы провели также сравнительный анализ кодирующих SNP в генах, по тем или иным данным ассоциированным с развитием аутосомно-доминантной или спорадической формы БА (в общей сложности 35 генов, см. приложение 3). Установлено наличие у крыс OXYS в генах *Casp3* (1 SNP) и *Sor11* (2 SNP) 3-х несинонимичных замен нуклеотидов (см. таблица 6), не имеющих известных колокализованных вариантов в базе данных проекта ENCODE. По крайней мере один из выявленных полиморфизмов (локализованный в гене *Sor11*) потенциально существенно нарушает структуру итогового белкового продукта (предсказание "deleterious" согласно алгоритму SIFT). Несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов в генах *App*, *Psen1* и *Psen2*, мутации в которых приводят к развитию аутосомно-доминантной формы БА с ранним началом, у крыс OXYS не выявлено. Поскольку крысы WAG обладают нормальными темпами старения, по итогам данного этапа настоящего исследования может быть сделано предположение о том, что выявленные несинонимичные полиморфизмы потенциально ассоциированы с развитием признаков преждевременного старения крыс OXYS, в том числе – с развитием катаракты и ретинопатии у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2.

**Таблица 6. Несинонимичные относительно референсной последовательности замены в генах, ассоциированных с развитием БА, представленные у крыс OXYS, но не представленные у крыс WAG.** Замена AA – замена аминокислотного остатка с указанием позиции в аминокислотной последовательности белка; SIFT – предсказание по вероятности влияние замены на функцию белкового продукта согласно алгоритму SIFT.

Символ гена	Принятое название гена	Позиция гена на хромосоме	Позиция замены в CDS	Замена кодона	Замена AA	SIFT (score)
<i>Casp3</i>	caspase 3	16:48561761	734	aCg/aTg	245 T/M	tolerated (0.22)
<i>Sor11</i>	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing	8:44771636	3136	Gtg/Ttg	1046 V/L	tolerated (0.28)
		8:44786644	2230	Cgg/Tgg	744 R/W	<b>deleterious</b> <b>(0.01)</b>

### 3.4.3 Анализ секвенирования транскриптома сетчатки крыс

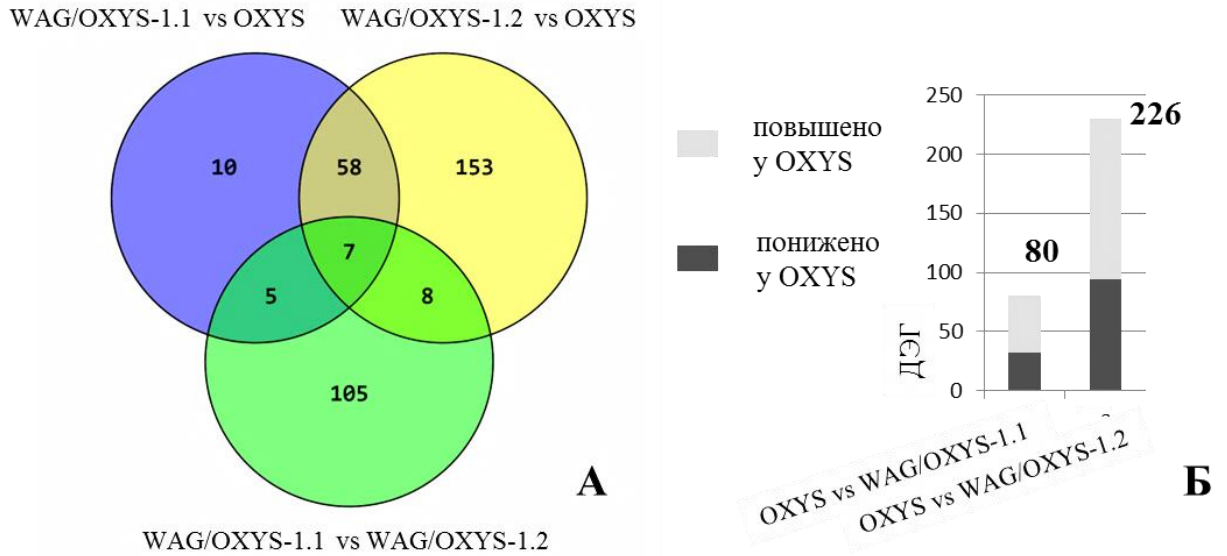
Мы предположили, что полученные с использованием возможностей технологии RNAseq данные позволят дифференцировать специфичные молекулярные события, влияющие на формирование различий фенотипа животных конгенных и родительской линий, в частности, - на развитие нейродегенеративных изменений в сетчатке крыс. С этой целью на следующем этапе настоящего исследования был проведен сравнительный анализ транскриптома сетчатки крыс конгенных линий (WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2) и крыс OXYS в возрасте 20 дней, на ранней, доклинической стадии развития патологических процессов.

Для оценки количества картированных прочтений и анализа дифференциальной экспрессии были использованы возможности программного пакета HTSeq/DESeq, использующего в качестве статистической модели для оценки параметра дисперсии отрицательное биномиальное распределение, а в качестве количественной меры экспрессии транскрипта - суммарное количество всех однозначно выравненных на данный ген прочтений. В связи с высокой себестоимостью эксперимента часть образцов (хориоретинальные комплексы крыс линии WAG/OXYS-1.1) были пулированы перед процессированием в кДНК библиотеки. Анализ при помощи программного пакета DeSeq был проведен с использованием схемы «биореплики vs нереплицированный образец».

В референсном геноме крысы *gno5* картировано 26405 генов. При заданной в настоящем исследовании глубине секвенирования уникальные риды были картированы на 15442 из них (с минимальным значением уровня экспрессии 10 прочтений/ген). С использованием уровня значимости  $\text{padj} < 0.1$  (с поправкой на множественные сравнения Бенжамини-Хохберга) и порога  $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ , 80 и 226 генов были определены как дифференциально экспрессирующиеся (ДЭ) в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 и крыс WAG/OXYS-1.2 в сравнении с крысами OXYS, соответственно. При сравнении транскриптома сетчатки крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 с учетом поправки на множественные сравнения (Бенджамини-Хохберга,  $\text{padj} < 0,1$ ) выявлено только 3 идентификатора ENSEMBL для дифференциально экспрессирующихся генов: ENSRNOG00000009373, ENSRNOG00000042565, ENSRNOG00000001273. Поэтому в рамках этого сравнения инструменты Gene Ontology были использованы для выявления функциональных категорий, обогащенных генами с наиболее вариабельной экспрессией ( $n=125$ ,  $p < 0,05$  без поправки на множественные сравнения). Примерно 27% (65 из 241) от объединенного количества ДЭ генов перекрывались между группами сравнения WAG/OXYS-1.1 vs OXYS и WAG/OXYS-1.2 vs OXYS (см. рисунок 15). При этом у крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 были выявлены однонаправленные изменения экспрессии некоторых генов по сравнению с крысами OXYS: экспрессия 38 генов была снижена, а экспрессия 27 генов - повышена. В терминах генных онтологий группа ДЭ

генов со сравнительно повышенной в сетчатке крыс обеих конгенных линий экспрессией включает гены, относящиеся к метаболизму ДНК и клеточному ответу на стресс (*Lig4*, *Rtel1*). Группа ДЭ генов со сравнительно пониженной в сетчатке крыс обеих конгенных линий экспрессией включает гены, относящиеся к функциональным категориям модификации и окисления липидов (*Acadm*, *Adh7*), участвующие в метаболическом пути метаболизма жирных кислот, согласно данным базы KEGG (rno00071).

При сравнении транскриптома сетчатки и крыс WAG/OXYS-1.1 и крыс WAG/OXYS-1.2 с крысами родительской линии OXYS в список наиболее представленных ДЭ транскриптов вошли гены *Usp48* и *Abca8a*. Белковый продукт *Usp48*, является протеазой, ассоциированной с центральной нервной системой и обладающей деубиквитиновой активностью. Известно, что этот фермент может участвовать в процессах поддержания синаптической пластичности и временном контроле иммунного ответа [Kowalski, Juo, 2012; Schweitzer, Naumann, 2015]. Белковый продукт *Abca8a* принадлежит к семейству АТФ-связывающих кассетных белков (ABCA, ATP-binding cassette subfamily A). Члены этого семейства характеризуются своей способностью транспортировать липиды через клеточные мембраны и участвуют в регуляции гомеостаза липидов в головном мозге и периферических тканях. Показано, что белковый продукт гена *ABCA8* участвует в процессах поддержания гомеостаза миелина и его образования [Kim *et al.*, 2013b], а увеличение экспрессии гена ассоциировано с изменением экспрессии патогенных белков (в том числе  $\alpha$ -синуклеина) в мозге пациентов со мультисистемной атрофией [Bleasel *et al.*, 2013]. Следует отметить, что в число наиболее представленных в сетчатке крыс ДЭ транскриптов вошли также мРНК пяти митохондриальных генов, кодирующих белки цепи переноса электронов: *mt-Nd5*, *mt-Nd4*, *mt-Co2*, *mt-Atp8* и *mt-Nd4l* (см. таблица 7). Их экспрессия повышена в сетчатке крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 по сравнению с OXYS, но только для *mt-Nd4l* - более чем в 2 раза. Полные результаты анализа дифференциальной экспрессии приведены в Additional File 1 нашей публикации [Korbolina *et al.*, 2014]. Следует отметить, что из числа генов, дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс OXYS и WAG/OXYS-1.2, были выявлены 4 гена (*Zp2*, *Ifit1*, *Coll7a*, и *Snurf*), картированных во втором конгенном локусе.



**Рисунок 15.** Диаграмма Венна, визуализирующая перекрытия групп ДЭ генов, данные RNA-seq (DeSeq) для сетчатки крыс OXYS, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в возрасте 20 дней (А) и количество ДЭ генов в сетчатке крыс OXYS со сниженным и повышенным, по сравнению с крысами соответствующей конгенной линии, уровнем мРНК (Б). На панели А указаны общее количество генов, уровень мРНК которых изменен в сетчатке крыс конгенных линий по сравнению с крысами OXYS ( $p_{adj} < 0,1$ ,  $|\log_2FC| \geq 1,0$ ), и в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с WAG/OXYS-1.2 ( $pvalue < 0,05$ ,  $|\log_2FC| \geq 1,0$ ), а также пересечения между группами генов. На панели Б указано количество генов в сетчатке крыс OXYS со сниженным и повышенным, по сравнению с крысами конгенных линий уровнем мРНК ( $p_{adj} < 0,1$ ,  $|\log_2FC| \geq 1,0$ ).

**Таблица 7.** 34 гена с самым высоким уровнем мРНК из числа дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс на доклинической стадии ретинопатии (в возрасте 20 дней). Приведены объединенные данные по сравнениям WAG/OXYS-1.1 vs OXYS (символ гена дан жирным шрифтом) и WAG/OXYS-1.2 vs OXYS.

Ген	Принятое название гена	Термин геной онтологии	Число прочтений
<i>Abca4</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	GO:0006649~перенос фосфолипидов на мембране	14607
<i>Abca8a</i>	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 8a	GO:0005524~связывание АТФ	3037
<i>Abca8a</i>			4184

<i>Acadm</i>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	GO:0001889~развитие печени	2713
<i>Aldoc</i>	aldolase C, fructose-bisphosphate	GO:0001666~ответ на гипоксию	7345
<i>Cc2d2a</i>	coiled-coil and C2 domain containing 2A	GO:0007224~Sonic hedgehog-сигнальный путь	5976
<i>Cdhr1</i>	Cadherin-related family member 1	GO_REF:0000019~связывание с ионами кальция	13517
<i>Cep290</i>	centrosomal protein 290	GO:0051011~связывание с минус-концом микротрубочек	3794
<i>Cpsf6</i>	cleavage and polyadenylation specific factor 6	GO:0006396~процессинг РНК	2211
<i>Crb1</i>	crumbs homolog 1 (Drosophila)	GO:0001654~развитие глаза	2111
<i>Crocc</i>	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin	GO:0000226~организация цитоскелета (микротрубочек)	17752
<i>Cul3</i>	cullin 3	GO:0000902~клеточный морфогенез	2189
<i>Dpysl4</i>	dihydropyrimidinase-like 4	GO:0030182~дифференциация нейронов	2112
<i>Etnk1</i>	ethanolamine kinase 1	GO:0006575~метаболические процессы клеточных источников аминокислот	4889
<i>Gas6</i>	growth arrest specific 6	GO:0009611~ответ на повреждение	2077
<i>Gpmба</i>	glycoprotein мба	GO:0005262~активность кальциевых каналов	3292
<i>Guca1b</i>	guanylate cyclase activator 1B	GO:0006140~регуляция метаболизма нуклеотидов	16099
<i>Hook1</i>	hook homolog 1 (Drosophila)	GO:0003006~процесс развития репродуктивной системы	5171
<i>Lig4</i>	ligase IV, DNA, ATP-dependent	GO:0000012~одноцепочечный разрыв	2199
<i>Matr3</i>	matrin 3	GO:0044822~связывание с	4784

		полиА-РНК	
<i>mt-Atp8</i>	ATP synthase 8, mitochondrial	GO:0015078~активность трансмембранного переносчика ионов водорода	8723
<i>mt-Co2</i>	cytochrome c oxidase II, mitochondrial	GO:0004129~активность цитохром-с оксидазы	66251
<i>mt-Nd4</i>	NADH dehydrogenase 4, mitochondrial	GO:0008137~активность комплекса I (цепь переноса электронов)	36356
<i>mt-Nd4l</i>	NADH dehydrogenase 4L, mitochondrial	GO:0008137~активность комплекса I (цепь переноса электронов)	6077
<i>mt-Nd5</i>	NADH dehydrogenase 5, mitochondrial	GO:0008137~активность комплекса I (цепь переноса электронов)	30694
<i>Pcmd2</i>	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	GO_REF:0000002~метилирование протеинов	7612
<i>Prpf4b</i>	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	GO:0006396~процессинг РНК	3127
<i>Ranbp2</i>	RAN binding protein 2	GO:0046907~внутриклеточный транспорт	3957
<i>Rap1gap</i>	Rap1 GTPase-activating protein	GO:0051056~регуляция передачи сигнала, опосредованного малыми ГТФазами	4008
<i>Sfpq</i>	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	GO:0000122~негативная регуляция транскрипции с промотора РНК полимеразы II	4104
<i>Syt4</i>	synaptotagmin IV	GO:0001505~регуляция уровня нейротрансмиттеров	2188
<i>Tnip1</i>	TNFAIP3 interacting protein 1	GO:0009100~метаболизм гликопротеинов	2420

<i>Usp48</i>	ubiquitin specific protease 48	GO:0006508~протеолиз	2325
<b><i>Usp48</i></b>			3722

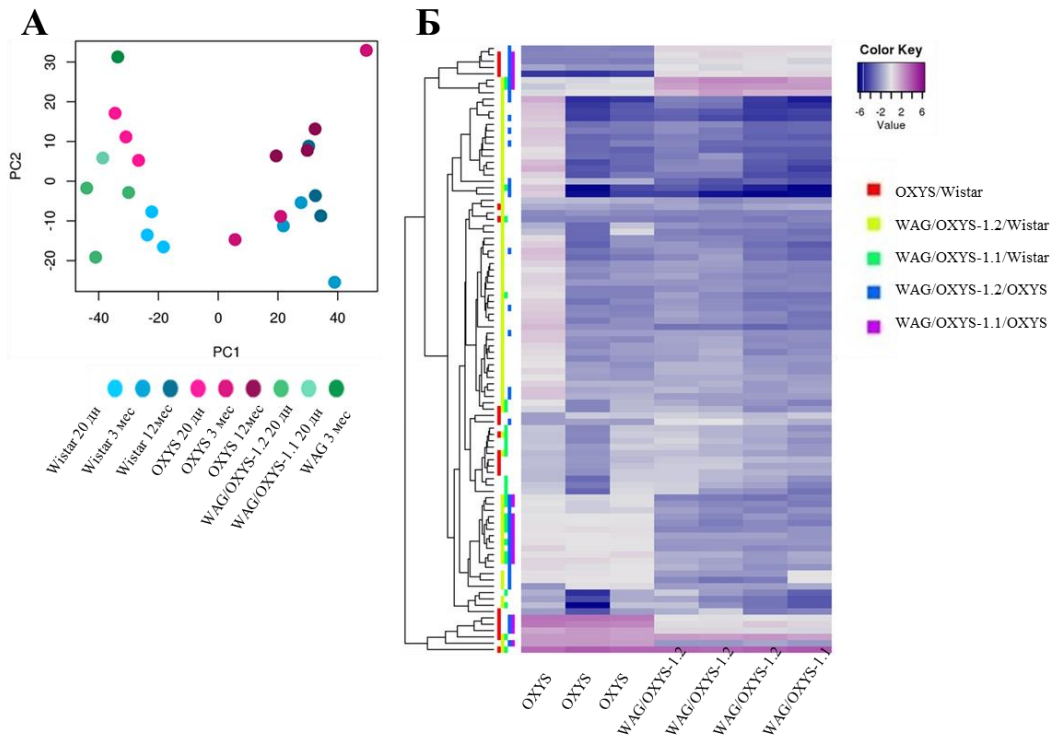
Кластерный анализ профилей экспрессии 23 образцов сетчатки крыс с использованием ранее полученных нами результатов [Kozhevnikova *et al.*, 2013a] показал разделение данных на три основные группы. Образцы 20-дневных животных выделяются в отдельный кластер по компоненте PC1, что может быть, несмотря на введенную поправку, частично обусловлено объединением этих образцов в рамках отдельного эксперимента. Образцы 20-дневных крыс OXYS и Wistar группируются с небольшим разбросом внутри каждой линии, при этом у одновозрастных животных WAG/OXYS-1.2 наблюдается бóльшая вариабельность профиля экспрессии. Пулированный образец крыс WAG в возрасте 3 мес в координатах PC1/PC2 располагается на удалении как от крыс OXYS, так и от крыс конгенных линий. Пулированный образец крыс WAG/OXYS-1.1 располагается в координатах PC1/PC2 между группами WAG/OXYS-1.2 и OXYS. В группах 3-месячных крыс OXYS и 18 мес крыс Wistar один образец отличался от всех остальных (см. рисунок 16). Группа 18-месячных крыс OXYS образует центр отдельного кластера. Можно полагать, характер кластеризации исследуемых образцов обусловлен различным характером прогрессии ретинопатии.

#### 3.4.4 Функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов

Мы предположили, что ДЭ гены, выявленные при сравнении транскриптома сетчатки крыс конгенных линий и крыс родительской линии OXYS, могут влиять на формирование различий в клинической и гистологической картине развития у них ретинопатии. С помощью терминов Gene Ontology (GO) нами была проведена функциональная аннотация ДЭ генов.

Анализ показал, что на доклинической стадии ретинопатии в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 изменена относительно крыс OXYS экспрессия генов, относящихся к категориям регуляции клеточного деления (*Edn3*, *SerpinB5*, *Irf1*, *RGD1563668*, *Lig4*, *Krt4*), иммунного ответа (*Ephx2*, *Crcp*, *Cd14*, *Fnl1*), регуляции транспорта нейротрансмиттеров (*Edn3*, *Grm2*), метаболизма соединений азота (*Rpap1*, *Acadm*, *Gstm4*, *Prim2*, *Irf1*, *RGD1563668*, *Crcp*, *Asrgl1*, *Lig4*, *Gemin6*, *Med20*, *Rtel1*), ДНК-направленной РНК-полимеразной активности (*Rpap1*, *Prip2*, *Crcp*). При этом многие гены закономерно относятся к нескольким категориям GO. Экспрессия генов Srb-медиаторного комплекса (*Med8*, *Med20*), регуляции клеточного деления (*Edn3*, *Serpinb5*, *Irf1*, *RGD1563668*, *Krt4*), метаболизма жирных кислот, пероксисомы (*Pex11b*, *Ehhadh*, *Ephx2*) и позитивной регуляции ответа на стимул (*RT1-A1*, *Edn3*, *RGD1563668*) в

сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 снижена, экспрессия генов, относящихся категории метаболизма ДНК (*Prim2*, *Lig4*, *Rtel1*) повышена относительно крыс OXYS.



**Рисунок 16. Кластерный анализ данных RNA-seq (DESeq).** А) Анализ методом главных компонент (Principal component analysis, PCA) с использованием данных для 3х и 18 мес. животных. Образцы 20-ти дневных животных выделяются в отдельный кластер по компоненте PC1. Б) Тепловая матрица (HeatMap) для 96-ти генов, дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс OXYS, Wistar, WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 ( $p\text{-value} \leq 0,01$ ,  $FC \geq 4$ ). Левая цветная полоса визуализирует достоверные изменения экспрессии гена в соответствующем парном сравнении (см. цветовой ключ). Пурпурный и голубой цвета указывают на «положительные» и «отрицательные» изменения экспрессии относительно Wistar, соответственно. Большинство ДЭ генов проявляют сниженную экспрессию (голубой) у крыс OXYS и конгенных крыс.

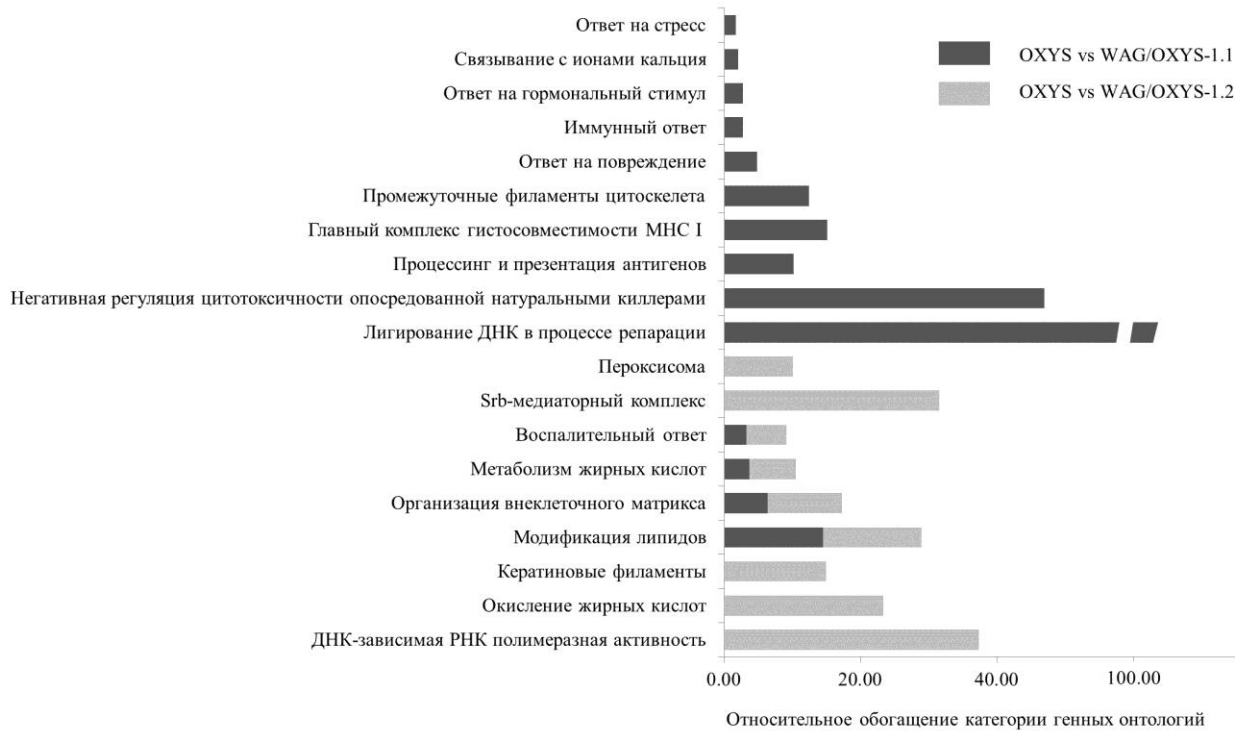
Значительно понижена в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 экспрессия генов кератиновых филаментов цитоскелета - *Krt5*, *Krt15*, *Krt4* ( $|\log_2FC|=5-7$ ). Промежуточные филаменты участвуют в процессах поддержания структурной целостности внутренних слоев сетчатки, и резкие уменьшения количества соответствующих белков, в частности, в Мюллеровых клетках, приводит к нарушению реакции сетчатки на ишемию [Lundkvist *et al.*, 2004]. Ранее мы показали, что в возрасте 3 мес в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar снижена экспрессия 12 генов промежуточных филаментов [Kozhevnikova *et al.*, 2013a]. Возможно,



выявленные изменения экспрессии отражают еще более серьезные нарушения взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом в сетчатке конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 на доклинической стадии заболевания. Тем не менее, патологические изменения сетчатки у крыс WAG/OXYS-1.1 менее выражены, чем у крыс OXYS.

В возрасте 20 дней в сетчатке крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 изменена относительно крыс OXYS экспрессия генов, относящихся к следующим категориям генных онтологий: белков комплекса гистосовместимости МНС 1 (*RT1-A1*, *RT1-S2*, *RT1-M1-4*, *RT1-S3*, *RT1-M6-2*, *RT1-T24-4*), ответа на повреждение (*Sdc1*, *Anxa8*, *Gatm*, *Apoa5*, *Dsp*, *et al.*), процессинга и презентации антигенов (в т.ч. *Tap2*), негативной регуляции цитотоксичности опосредованной натуральными киллерами, сигнального пути PPAR, связывания с ионами  $Ca^{2+}$  (*Dsc3*, *Pkdrej*, *Matn4*, *Anxa8*, *S100a9*, *Calml3*, *Cdhr1*, *Padi1*, *Dsg3*), метаболизма ксенобиотиков (*Fmo5*, *Adh7*, *Aldh3a1*). При этом гены с относительно сниженной в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.2 экспрессией группируются в функциональные категории связывание с ионами кальция, активность алкогольдегидрогеназы (NAD), внеклеточный транспорт, модификация липидов, катаболические процессы этанола, промежуточные филаменты цитоскелета, плазматическая мембрана, щелевые контакты. Наглядно основные процессы и метаболические пути, для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов при развитии ретинопатии у крыс конгенных линий представлены на рисунке 17.

Анализ веб-ресурсов KEGG и Wikipathway выявил обогащение генов, дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS, генами, участвующими в метаболизме ксенобиотиков под управлением цитохрома P450 (*Dhdh*, *Adh7*, *Aldh3a1*), митохондриальном бета-окислении LC-жирных кислот (*Acadm*, *Ehhadh*), сигнальном пути альфа-6-бета-4 интегрина (*Coll17a1*, *Dsp*), а также связанными с молекулами клеточной адгезии, фагосомы и эндоцитоза (*RT1-M1-4*, *RT1-S3*), и вовлеченными в метаболические пути старения/аутофагии (*Irf*, *Rnasel*) и рака (*Ccne2*, *Fzd2*). Интересно, что в число ДЭ генов в этом сравнении вошел ген *Car9*, carbonic anhydrase IX. Уровень соответствующей мРНК был значительно понижен в сетчатке крыс родительской линии OXYS по сравнению с конгенными животными. При этом для *Car9*<sup>-/-</sup> мышей, как и для крыс OXYS, характерно снижение локомоторной активности, способности к обучению в стандартных тестах и наличие дегенеративных изменений в мозге, прогрессирующих с возрастом [Pan *et al.*, 2012]. Как отмечалось выше, двигательная активность крыс WAG/OXYS-1.2 в тесте открытого поля достоверно выше, чем у крыс OXYS.



**Рисунок 17. Значимые категории Gene Ontology, объединяющие гены, экспрессия которых в сетчатке крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 изменена по сравнению с крысами OXYS в возрасте 20 дней ( $p < 0,05$ ). По оси абсцисс – относительное обогащение соответствующей категории генных онтологий ДЭ генами согласно результатам анализа базы данных DAVID встроенными онлайн инструментами (Fold Enrichment).**

Группы генов, экспрессия которых изменена у крыс конгенных линий по сравнению с крысами OXYS, пересекаются, при этом к общим категориям генных онтологий у конгенных крыс могут относиться различные сочетания ДЭ генов. Так, в возрасте 20 дней в сетчатке крыс обеих конгенных линий изменена экспрессия генов, связанных с организацией внеклеточного матрикса (*Serp1nb5*, *Adamts14*, *Fnl* для крыс WAG/OXYS-1.1 и *Elf3*, *Serp1nb5*, *Fnl*, *Dpt* для крыс WAG/OXYS-1.2), метаболизма жирных кислот (*Acadm*, *Ehhadh*, *Ephx2*, *Adh7* для крыс WAG/OXYS-1.1 и дополнительно *Alox15* для крыс WAG/OXYS-1.2), лигирования ДНК в процессе репарации (*RGD1563668*, *Lig4* для крыс WAG/OXYS-1.1 и дополнительно *Hmgb2* для крыс WAG/OXYS-1.2), воспалительного ответа (*Ephx2*, *Crcl*, *Cd14*, *Fnl* для крыс WAG/OXYS-1.1 и *Sdc1*, *Elf3*, *Ephx2*, *Crcl*, *Fnl* для крыс WAG/OXYS-1.2). Принципиально важно, что в сетчатке крыс обеих конгенных линий - WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 - наблюдались однонаправленные изменения экспрессии генов из категории воспалительного ответа. Так, экспрессия *Ephx2* у конгенных животных была снижена, а экспрессия *Crcl* и *Fnl* – повышена по сравнению с крысами OXYS. Можно предположить, что наблюдаемые изменения экспрессии ассоциированы с развитием патологического процесса в сетчатке.

При сравнении транскриптома сетчатки крыс двух конгенных линий мы планировали выявить ДЭ гены, потенциально влияющие на развитие ранней катаракты и ретинопатии у крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, и ассоциированные с различными конгенными локусами первой хромосомы крыс OXYS, перенесенными в геном крыс WAG. Мы предполагаем, что эти же гены-кандидаты могут оказывать влияние на развитие признаков преждевременного старения и у крыс OXYS. Как уже отмечалось, при сравнении транскриптома сетчатки крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 с учетом поправки на множественные сравнения ( $p_{adj} < 0.1$ ) выявлено только 3 идентификатора ENSEMBL для дифференциально экспрессирующихся генов: ENSRNOG00000009373, ENSRNOG00000042565, ENSRNOG00000001273. Последний идентификатор относится к гену *Psmg3*, proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 3, кодирующему один из 14 белковых продуктов индивидуальных генов, необходимых для биогенеза 20S-протеосом млекопитающих [Hirano *et al.*, 2006]. 20S-протеосомы являются АТФ-независимыми коровыми каталитическими центрами 26S-протеосом, принимающих участие в процессах деградации убиквитин-конъюгированных белков. В ряде исследований получены данные о том, что нарушения в механизмах протеолитической протеасомной деградации белка играют роль в развитии наследственных форм ретинопатии [Lobanova *et al.*, 2013; Shang, Taylor, 2012] и катаракты [Hosler, Wang-Su, Wagner, 2006; Liu *et al.*, 2015], приводят к накоплению белка тау и прогрессивному формированию нейрофибриллярных клубков при БА и других нейродегенеративных заболеваниях [Chadwick *et al.*, 2012; Lee, Lee, Rubinsztein, 2013; Wang, Mandelkow, 2012]. Показано, что путь убиквитин-зависимой протеасомной деградации белка играет важную роль в регуляции экспрессии генов, и его нарушения в клетках пигментного эпителия сетчатки приводят к изменению экспрессии некоторых генов провоспалительных цитокинов (в частности, IL-6 и IL-8) и снижению экспрессии хемоаттрактантного белка-1 моноцитов, MCP-1 и фактора комплемента Н, CFH [Liu *et al.*, 2014]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушения процессов убиквитин-зависимой протеасомной деградации белка в клетках РПЭ могут приводить к развитию в сетчатке воспалительного процесса, аномального функционирования моноцитов и системы комплемента, участвуя в патогенезе ВМД.

Сравнение транскриптома сетчатки крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 показало, что генами с наиболее вариабельной экспрессией ( $p < 0,05$  без поправки на множественные сравнения) обогащены функциональные категории активности транскрипционных факторов (7 генов), морфогенеза кровеносных сосудов (4 гена), дифференциации нейронов (7 генов), межклеточной коммуникации и передачи сигнала (signaling, 5 генов). Анализ баз данных KEGG и PANTHER выявил обогащение этой группы по генам, вовлеченным в метаболические пути меланогенеза (KEGG: *Wnt16*, *Tyr*, *Tyrp1* ( $\log_2FC=1.9$ ), *Wnt6*), болезни Альцгеймера/пресенелина

(P00004: *Bace2* (log2FC=1.6), *Wnt16*, *Cdh3*, *Cdh1*, *Wnt6* (log2FC=2.3), Wnt-зависимый сигнальный путь (KEGG: *Nfatc4*, *Wnt16*, *Nkd2*, *Wnt6*, *Dkk1*, и PANTHER: *Nfatc4*, *Wnt16*, *Cdh3*, *Nkd2*, *Cdh1*, *Wnt6*), TGF-бета сигнальный путь (KEGG: *Dcn*, *Pitx2*, *Thbs4*) и сигнальный путь кадгерина (PANTHER: *Wnt16*, *Frk*, *Cdh3*, *Cdh1*, *Wnt6*). При этом уровень соответствующих мРНК для всех упомянутых генов был понижен в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с крысами WAG/OXYS-1.2.

Можно заключить, что в проведенном сравнении транскриптома сетчатки конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 с крысами OXYS были выявлены изменения профиля экспрессии генов, обусловленные, вероятно, спецификой молекулярных событий, лежащих в основе развития нейродегенеративных изменений в сетчатке крыс родительской линии OXYS и конгенных животных. Следует отметить, что функции многих экспрессирующихся в сетчатке крыс генов, в том числе из числа выявленных нами с учетом множественных сравнений ДЭ генов, не известны. Так, про ген *RGD1562690* (идентификатор ENSEMBL ENSRNOG00000009373, similar to L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A)) известно только, что уровень его мРНК повышается в коре мозга при распространяющейся депрессии (cortical spreading depression), индуцируемой введением KCl на фоне нарушения ионного гомеостаза и церебрального кровотока. Это повышение наряду с усилением экспрессии *iNOS* и *HIF-1 $\alpha$*  рассматривается как защитная реакция [Viggiano *et al.*, 2008]. Функциональная значимость изменений экспрессии этих генов в сетчатке крыс при развитии ретинопатии, как и роль выявленных изменений в развитии заболевания с учетом различной клинической и гистологической картины развития заболевания у крыс родительской и конгенных линий еще предстоит выяснить.

#### Глава 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ассоциированные с возрастом заболевания имеют многофакторную природу с полигенным наследованием. При этом манифестация многих, в том числе нейродегенеративных заболеваний, происходит позднее, чем развиваются лежащие в их основе события на молекулярном уровне. Проводить исследование молекулярно-генетических механизмов развития таких заболеваний на людях проблематично, в особенности на доклинических стадиях. Закономерно, что создание и характеристика адекватных биологических моделей остается актуальнейшей задачей современной медико-биологической науки [Bilkei-Gorzo, 2014].

Настоящее исследование выполнено на уникальной генетической модели – линии преждевременно стареющих крыс OXYS. Принципиально важно, что при создании линии отбор проводился по одному признаку – ранней спонтанной катаракте, развитие которой только в первых пяти поколениях провоцировали обогащенной галактозой диетой. Сцепленно с катарактой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе раннее развитие ретинопатии и ускоренное старение мозга. Комплексное проявление признаков старения у крыс OXYS уже в молодом возрасте предполагает общие молекулярно-генетические основы их развития, механизмы которых остаются неясными. Патогенез нейродегенеративных заболеваний тесно связан с нарушениями энергетического гомеостаза (см. главу 1 «Обзор литературы»). С середины 90-х годов прошлого века нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий рассматриваются как одна из возможных причин преждевременного старения крыс OXYS [Salganik *et al.*, 1994; Shabalina *et al.*, 1995], однако вопрос о причинно-следственной связи между нарушением энергетического метаболизма и «запуском» процессов преждевременного старения на момент постановки задач настоящего исследования оставался открытым. Для ответа на него на первом этапе работы нами была проведена оценка возможной связи ускоренного старения мозга крыс OXYS с нарушениями энергетического метаболизма. Сравнение его состояния в мозге крыс OXYS и Wistar (контроль) было проведено методами  $P^{31}$ ЯМР-спектроскопии. Вторая часть исследования была посвящена поиску на первой хромосоме локусов, ассоциированных с развитием у крыс OXYS ряда признаков преждевременного старения (поведенческих, ранней катаракты и ретинопатии) методом QTL-анализа и доказательству влияния выявленных QTL-локусов на развитие катаракты и ретинопатии. С этой целью для каждого локуса были сконструированы конгенные линии крыс (на основе генома крыс WAG, контрастных по совокупности исследуемых фенотипических признаков по отношению у крысам OXYS). Была проведена характеристика фенотипа конгенных животных в сравнении с крысами родительских линий OXYS и WAG, в том числе по заболеваемости катарактой и ретинопатией. Третья часть

исследования была посвящена картированию локусов, перенесенных в конгенные линии от крыс родительской линии OXYS, а также анализу изменений транскриптома сетчатки конгенных животных в сравнении с крысами OXYS на доклинической стадии развития ретинопатии при помощи методов массового параллельного секвенирования (RNA-seq).

#### **4.1 Метаболическое состояние мозга крыс: высокоэнергетические фосфаты**

Созревание мозга грызунов в значительной степени происходит в течение первых недель постнатальной жизни [Pettegrew *et al.*, 1990]. Первый этап развития мозга крысы – пренатальное деление клеток и их дифференцировка - длится до рождения животного. Второй этап – от рождения до возраста десяти дней – включает увеличение размеров клеток, активный рост аксонов и не менее активное развитие дендритных контактов. В это время в мозге содержание липидов повышается и достигает своего пика. В течение третьего периода – от десяти до двадцати дней – значительно увеличивается плотность синаптических контактов и количество нервных окончаний, в этот же период начинает регистрироваться электроэнцефалограмма. Уровень потребления глюкозы, активности протекания процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования стабильно повышается с рождения, достигая в течение этого периода значений, характерных для зрелого мозга. Во втором и третьем периодах развития, во время синаптогенеза и ремоделирования синаптических контактов, наблюдается повышенный уровень естественной смерти нейронов. Тогда же возрастает активность аденозинтрифосфатазы, в том числе  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -зависимая. Четвертый период охватывает возраст от двадцати дней и ассоциируется с активной миелинизацией, однако, с незначительным дальнейшим ростом мозга. В этот период максимального уровня достигает активность креатинкиназы. [Duffy, Kohle, Vannucci, 1975; File *et al.*, 1993; Friedman, Haddad, 1993; Vannucci, Hagberg, 2004]. Адекватный синтез высокоэнергетических фосфатов в период становления мозга имеет решающее значение для формирования его нормальной функции. Их острый дефицит приводит к существенным структурно-функциональным нарушениям, а умеренный может не вызывать очевидных пороков развития, но вызывать отклонения от «нормы», которые могут проявиться в дальнейшем в разные периоды онтогенеза, оказывать влияние на динамику проявления возрастных изменений мозга, в том числе на поведенческие и когнитивные параметры.

Согласно результатам многих исследований, старение у грызунов связано с уменьшением тревожности, снижением общей двигательной активности [Torgas-Garcia *et al.*, 2005], снижением способности к адаптации к неблагоприятным факторам среды. Это в том числе проявляется в повышенной чувствительности к эффектам крестообразного лабиринта [Frussa-Filho *et al.*, 1992]. Кроме того, было высказано предположение, что гиперреактивность в

ответ на стресс может быть генетически ассоциирована с более короткой продолжительностью жизни и ускоренным развитием нейродегенеративных процессов с возрастом [Dellu *et al.*, 1994].

Мы показали, что критическим для развития специфических поведенческих признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS (повышенной тревожности, сниженной моторно-исследовательской активности) является возрастной период от 4 до 12 недель. Ранее - в печени и мышцах крыс OXYS [Saprunova *et al.*, 2012; Vays *et al.*, 2014], а недавно и в гиппокампе животных [Stefanova *et al.*, 2015a; Stefanova *et al.*, 2015b] в возрасте 3-4 месяцев были выявлены структурно-функциональные изменения митохондрий, включающие деструкцию крист, лизис матрикса, снижение объемной и поверхностной плотности митохондрий. Выраженность изменений прогрессирует с возрастом. Таким образом, с нарушением основных функций митохондрий в нейронах могут быть связаны ассоциированные с возрастом нарушения способности крыс OXYS к пространственному обучению [Stefanova *et al.*, 2011; Stefanova *et al.*, 2014a], наблюдаемые у животных изменения в синаптической пластичности гиппокампа, в том числе - нарушение формирования длительной посттетанической потенциации, регистрируемые также с возраста 3-4 месяцев [Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В., 2011]. Мы показали, что одной из возможных причин усугубляющихся с возрастом дисфункций митохондрий мозга у крыс OXYS может быть накопление в нем  $\beta$ -амилоида [Stefanova *et al.*, 2015a]. В то же время дисфункция митохондрий и окислительный стресс рассматриваются как причина усиления продукции  $A\beta$ , который, в свою очередь, способен оказывать токсическое действие на митохондрии и провоцировать нейродегенеративные процессы. Вопрос о том, становятся ли повреждения митохондрий причиной усиления синтеза и накопления в них  $A\beta$  или наоборот, непосредственно накапливаясь в митохондриях  $A\beta$  инициирует окислительный стресс и гибель нейронов, на сегодня остается открытым [Kaminsky, Tikhonova, Kosenko, 2015]. Возможность с помощью антиоксидантов предупреждать нарушение способности к однократному обучению свидетельствует об участии окислительного стресса в развитии признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS [Kolosova *et al.*, 2006]. В то же время накопление маркеров окислительного повреждения белков и липидов в тканях крыс OXYS регистрируется значительно позже основных проявлений нарушений в когнитивной и эмоциональной сферах.

Принципиально важно, что в настоящем исследовании мы не выявили каких-либо признаков дефицита высокоэнергетических фосфатов в мозге 3-месячных крыс OXYS - в период активной манифестации признаков преждевременного старения, в том числе - мозга. Более того, в мозге 2-недельных крыс OXYS по сравнению с Wistar увеличено значение фосфатного потенциала. Такие результаты согласуются с полученными ранее данными о состоянии энергетического метаболизма в печени крыс [Salganik *et al.*, 1994; Shabalina *et al.*,

1995]. В них было показано, что митохондрии печени 2х- и 3х-месячных крыс OXYS отличаются более низкой скоростью потребления кислорода в различных метаболических состояниях, а также пониженным содержанием цитохрома *a* дыхательной цепи по сравнению с митохондриями печени крыс Wistar соответствующего возраста. Но при этом снижение фосфатного потенциала – признаки энергетического дефицита - были выявлены только у крыс OXYS в возрасте 10 - 12 месяцев. Пониженное содержание АТФ и общего количества адениннуклеотидов коррелировало с увеличением содержания АДФ и неорганического фосфата, что указывает на повышение коэффициента использования энергии и снижение способности к ресинтезу АТФ. Кроме того, для митохондрий печени крыс OXYS были характерны изменения в соотношениях цитохромов *b/a*, *c/a*, *c1/a* дыхательной цепи внутренней митохондриальной мембраны, а также снижение активности  $F_0F_1$ -АТФазы, что может становиться причиной снижения скорости фосфорилирования.

В настоящем исследовании в мозге 30-дневных крыс содержание КФ было ниже, чем у 20-дневных, а содержание НФ – соответственно повышено, как и значения соотношений КФ/НФ и КФ/ $\beta$ АТФ (последнее – достоверно только для крыс OXYS). Такие изменения относительного содержания высокоэнергетических фосфатов, возможно, являются отражением процессов увеличения оборота КФ в мозге крыс OXYS в процессе его постнатального развития. Повышение утилизации высокоэнергетических фосфатов (в частности, АТФ) в месячном возрасте подтверждается увеличением значения фосфатного потенциала от 20 к 30 дню жизни и сопутствующим ему увеличением содержания  $\beta$ АДФ, выявленным при сравнении этих возрастных групп.

Значительно более высокое относительное содержание КФ в мозге крыс OXYS по сравнению с Wistar в возрасте 3 недель, ассоциированное с повышенным значением отношений КФ/НФ и КФ/ $\beta$ АТФ, может рассматриваться, как адаптация к условиям недостаточного снабжения мозга кислородом (гипоксии) [Bickler, Hansen, 1998; Tsuji *et al.*, 1995]. Поскольку в условиях гипоксии энергетические потребности головного мозга в АТФ не могут быть удовлетворены только за счет окислительного фосфорилирования в митохондриях [Nioka *et al.*, 1987], резерв молекул КФ в этих условиях активно используется (содержание неорганического фосфата, соответственно, растет), а снижение содержания АТФ компенсируется за счет функционирования креатинкиназы. Полученные данные находят подтверждение в результатах исследования становления капиллярного русла в ходе развития мозга крыс. Показано, что развитие капиллярной сети мозга крыс OXYS замедлено по сравнению с крысами Wistar по показателям митотической активности эндотелия, и межлинейные различия особенно выражены в возрасте 2х недель [Т.А., 2005]. Признаки тканевой гипоксии и ишемии выявлены также в сосудистой оболочке глаз крыс OXYS, и в миокарде, функциональные изменения



которого регистрируются методом ЭКГ уже в возрасте 3 месяцев [Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А. Ж., 2014]. В целом, прогрессирование цереброваскулярной недостаточности является фактором риска развития когнитивных нарушений, в том числе - непосредственно болезни Альцгеймера [Guglielmotto, Tamagno, Danni, 2009; Lee *et al.*, 2014]. Следует отметить, что с ней может быть связано накопление токсических форм  $\beta$ -амилоида в мозге крыс OXYS, которое выявляется к возрасту 12 месяцев [Stefanova *et al.*, 2014a; Stefanova *et al.*, 2015a]. Так, показано, что индукция очаговой церебральной ишемии (окклюзия мозговой артерии) приводит к активации процессов расщепления белка-предшественника с образованием  $\beta$ -амилоида, пост-трансляционной стабилизации секретазы BACE1, а также нарушению экспрессии неприлизина в таламусе крыс [Hiltunen *et al.*, 2009]. Тем не менее, признаки истощения адаптивных резервов (характерные для хронической ишемии изменения церебрального кровотока и реактивности сосудов в мозге, предполагающие развитие энергетического дефицита) выявляются у крыс OXYS только к возрасту 12 мес [Agafonova *et al.*, 2007; Sergeeva *et al.*, 2006].

Мы показали, что в период от 4х- до 12 -недельного возраста содержание ФМЭ остается относительно постоянным, тогда как содержание ФДЭ, продуктов распада мембранных фосфолипидов, значительно увеличивается в мозге крыс обеих исследованных линий. Соответственно, значение соотношения ФМЭ/ФДЭ, отражающее активность оборота мембранных фосфолипидов, снижается с возрастом, указывая на замедление синтеза новых молекул фосфолипидов. Вероятнее всего, эти изменения отражают активные процессы миелинизации, синаптогенеза и реконструкции дендритных соединений, характеризующими этот период развития мозга крысы [Kalou, Rauchová, Drahota, 2001; Pettegrew *et al.*, 1990; Vannucci, Hagberg, 2004], и связанные с высокой частотой естественной гибели клеток. В целом, наши результаты согласуются с литературными данными о развитии метаболизма фосфолипидов в головном мозге крыс в постнатальном периоде (подробнее см. [Pettegrew *et al.*, 1990]). Наблюдаемые в мозге крыс OXYS изменения метаболизма мембранных фосфолипидов, возможно, также связаны с состоянием гипоксии, однако имеющиеся данные не являются достаточными для окончательного вывода.

Значительные различия были обнаружены в динамике изменений относительного содержания КФ с возрастом в мозге 2-х и 3-недельных крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar. У крыс Wistar максимальное относительное содержание КФ наблюдается в возрасте 2 и 3 недель, а затем постепенно снижалось. Этот максимум, скорее всего, отражает переключение энергетического метаболизма мозга крыс в процессе постнатального развития с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Так, в отдельном исследовании методом  $P^{31}$  ЯМР-спектроскопии [Holtzman *et al.*, 1991] было показано, что на 2-3 неделе постнатального

развития мозга грызунов наблюдаются наибольший рост скорости реакций, катализируемых креатинкиназой, а также увеличение гликолиза и тканевого дыхания в головном мозге, что может объясняться увеличению энергозатрат на активные процессы миелинизации. Аналогичные данные были получены Шен с коллегами [Shen *et al.*, 2002]. В то же время, в мозге крыс OXYS в возрасте 2 недель содержание КФ было значительно ниже, чем в 3 недели, хотя максимальное его содержание наблюдалось также в 3-недельном возрасте. При этом содержание КФ в мозге крыс OXYS в возрасте 3 недель было значительно выше, чем у крыс Wistar, что, скорее всего, отражает адаптивную реакцию на энергетический дефицит в более раннем возрасте. Ттак, относительное содержание КФ в мозге крыс OXYS в возрасте 2 недели понижено по сравнению с крысами Wistar.

Подводя итоги данного этапа работы, можно заключить, что раннее постнатальное развитие мозга крыс OXYS действительно протекает на фоне изменений метаболизма высокоэнергетических фосфатов. Однако признаков энергетического дефицита в мозге крыс OXYS не выявлено ни в постнатальный период, ни в возрасте 3 месяцев, когда уже формируются поведенческие проявления ускоренного старения и в мозге развиваются нейродегенеративные изменения, регистрируемые методами МРТ. Более того, в мозге 2-недельных крыс OXYS фосфатный потенциал, отражающий расход креатинфосфата на синтез АТФ, был даже выше, чем у крыс Wistar, а в возрасте 3 недель мозге крыс OXYS было усилено накопление КФ по сравнению с крысами Wistar. Можно полагать, что в период раннего постнатального развития мозга крыс OXYS нарушения структуры и функций митохондрий и капиллярного русла мозга, способные приводить к дефициту высокоэнергетических метаболитов, в достаточной степени скомпенсированы. Выявленные изменения метаболизма высокоэнергетических фосфатов мозга могут отражать адаптивные изменения многих метаболических путей, связанных с развитием у крыс OXYS снижения моторно-исследовательской активности и способности к обучению, в т.ч. не напрямую.

#### **4.2 Анализ комплексного признака (QTL-анализ) и экспериментальная проверка его результатов при помощи сконструированных конгенных линий крыс**

На стадии предварительных исследований для определения характера наследования комплекса признаков ускоренного старения крыс OXYS (катаракты, ретинопатии и некоторых поведенческих признаков) нами были поставлены гибридологические скрещивания (OXYS×WAG). В результате моногенный аутосомно-доминантный и рецессивный типы наследования были исключены. Логическим продолжением работы стало проведение анализа локусов количественного признака (QTL – анализ, см. главу 1 «Обзор литературы»). Следует отметить, что знания, полученные с использованием инбредных линий крыс, могут быть проецированы на геном человека, в частности для дальнейшего исследования патогенетических

механизмов заболеваний многофакторной природы [Kwitek *et al.*, 2001]. К настоящему времени детально описаны свидетельства сохранения/нарушения синтении между видами, в том числе у крысы, мыши и человека [Gauguier *et al.*, 1999; Kaisaki *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000]; построены сравнительные генетические карты [Kaisaki *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 2001]. Некоторые регионы генома мыши и человека, для которых выявлены гомологии с первой хромосомой крысы RNO1, охарактеризованы также на наличие ассоциации со сложными фенотипами (для которых выявлены локусы количественного признака у крыс), в том числе наследственной гипертензии [Shimkets, Lifton, 1996]. Эти данные, данные о ранее установленной И.Б. Хворостовым ассоциации нескольких маркеров 1й хромосомы с характерными для крыс OXYS фенотипическими особенностями (см. раздел 1.7.1 главы 1 «Обзор литературы»), а также наличие самой обширной доступной базы анонимных микросателлитных маркеров и послужило основанием для фокусирования задач настоящего исследования на первой хромосоме крысы.

Для первоначального скрининга с целью выявления генетических детерминант комплекса фенотипических признаков преждевременного старения крыс OXYS был использован метод QTL-анализа (см. главу 1 «Обзор литературы») с использованием популяции (77 особей, самцов и самок) гибридов F<sub>2</sub> от реципроктного скрещивания крыс OXYS с крысами WAG. По результатам сканирования с помощью анонимных ДНК-маркеров были сформулированы гипотезы о существовании на первой хромосоме крыс OXYS двух кандидатных локусов количественного признака, QTL1 и QTL2, ответственных за развитие катаракты, ретинопатии и проявление характерных для крыс OXYS поведенческих признаков. При этом границы локусов QTL1 и QTL2 определялись с использованием общего генетического маркера D1Rat219, а их суммарная протяженность составляла 149,8 Мб. Таким образом, ограничивающими факторами на данном этапе настоящего исследования являлись невысокая плотность полиморфных маркеров на анализируемой хромосоме, размер и состав выборки гибридных животных. Упомянутые ограничения могли привести к выявлению для некоторых поведенческих признаков крыс OXYS (например, величины латентного периода выхода в центр в тесте открытого поля) QTL с нехарактерно высоким отношением правдоподобия (LOD scores). Кроме того, выявленные локусы количественного признака имели значительную протяженность: 62,4 Мб для локуса QTL1, 87,4 Мб для локуса QTL2 [Korbolina *et al.*, 2012].

Методологически «золотым стандартом» размера выборки животных структурированной гибридной популяции для проведения QTL-анализа считается  $n > 100$ . Тем не менее, активно публикуются результаты исследований и на меньших выборках, в том числе связанные с изучением экспрессионных локусов количественного признака [Kalashikam *et al.*,

2013; Tsaih *et al.*, 2014]. В ряде исследований показано, что половой состав исследуемой популяции оказывает значительное влияние на определение QTL у млекопитающих [Deng *et al.*, 2008; Rapp, 2000]. Следует отметить, что микросателлитные последовательности в качестве генетических маркеров обладают высоким аллельным разнообразием, обусловленным нестабильностью аллелей микросателлитных локусов - их изменчивостью с достаточно быстрым накоплением изменений. Так, например, в состав панели для генетического мониторинга 6-ти широко используемых инбредных линий крыс (87 маркеров микросателлитных последовательностей, картируемых на 20ти аутосомах) были включены 7 биаллельных, 19 триаллельных, а также 27, 24 и 10 микросателлитных маркеров, имеющих в исследуемой выборке по 4, 5 и 6 различных аллелей, соответственно [Bryda, Riley, 2008]. Эти особенности создают очевидные трудности для эффективного подбора подходящих маркеров, в том числе при анализе их cosegregation с количественными признаками. В целом упомянутые ограничения могли повлиять на подлинность выявленных QTL и на сложность идентификации конкретных генетических факторов, оказывающих влияние на исследуемые фенотипические признаки.

Для проверки подлинности индивидуальных кандидатных локусов количественного признака каждый выявленный QTL был индивидуально перенесен в геном линии-реципиента WAG под контролем по полиморфизму длин маркированных микросателлитных последовательностей с использованием стратегии, описанной в обзоре Джона Раппа [Rapp, 2000] (см. главу 2 «Материалы и методы»). Следует отметить, что исследования количественных признаков у грызунов проводятся с использованием конгенных линий, созданных на различном генетическом фоне [Hoopes *et al.*, 2003; Laragione *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2014]. При этом конгенная линия может быть получена при помощи всего лишь 5-ти поколений возвратного скрещивания [Markel *et al.*, 1997; Wakeland *et al.*, 1997]. Для эффективного подбора животных, несущих наибольший процент аллелей линии-реципиента, у мышей достаточно проверки по 3м генетическим маркерам для каждой индивидуальной хромосомы [Goto, Ebukuro, Itoh, 2005]. Крысы линии-реципиента QTL, WAG, по нашим данным обладали активным типом поведения в тесте открытого поля, нормальным уровнем артериального давления, отсутствием развития ретинопатии, и (по результатам предварительных офтальмологических осмотров) развитием катаракты только в отдельных редких случаях. Поэтому при существовании в выявленных QTL1 и QTL2 гена/генов, оказывающих влияние на проявление у крыс OXYS признаков преждевременного старения, их влияние могло быть обнаружено на ранних этапах получения конгенных животных, в первых поколениях бэкресс. Строгим доказательством подлинности выявленных QTL явилось проявление исследуемых признаков уже у животных конгенных линий, названных нами

WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2. Согласно гипотезам, принятым по результатам QTL-анализа, ожидалось, что у крыс WAG/OXYS-1.1 будет развиваться ретинопатия, а у крыс WAG/OXYS-1.2 – и ретинопатия, и катаракта. Однако офтальмологические осмотры показали, что в возрасте 2-3 мес у крыс обеих конгенных линий развивались и ранняя катаракта и ретинопатия [Korbolina *et al.*, 2012], что свидетельствовало в пользу влияния генов из перенесенных локусов первой хромосомы на развитие обоих заболеваний. В связи с этим задачей, которую мы решали на следующем этапе исследования, была подробная характеристика животных полученных нами конгенных линий, в первую очередь, по заболеваемости катарактой и ретинопатией.

Мы установили, что катаракта и ретинопатия развиваются у крыс обеих конгенных линий, при этом заболеваемость увеличивается с возрастом – растет доля глаз с клиническими признаками заболеваний. Таким образом, ген/гены из перенесенных от родительской линии OXYS локусов первой хромосомы действительно оказывают влияние на развитие и катаракты, и нейродегенеративных изменений сетчатки у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, и потенциально – у крыс OXYS. Однако у конгенных крыс не наблюдается прогрессии степени тяжести катаракты и ретинопатии до показателей родительской линии OXYS, что подтверждено данными гистологического исследования. Так, нами не выявлено признаков ретинопатии, по клиническим признакам соответствующей второй стадии ВМД у людей. При гистологическом исследовании в сетчатке конгенных крыс возрасте 8-10 мес не были выявлены характерные для скопления гранул липофусцина, а в количество рядов ядер нейросенсорных клеток у крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 в возрасте 8-10 мес было больше, чем у крыс OXYS соответствующего возраста. Можно полагать, что в перенесенных локусах первой хромосомы картируются генетический фактор/факторы предрасположенности к параллельному развитию катаракты и ретинопатии, но не факторы, обуславливающие прогрессию заболеваний. Выявленные особенности развития ретинопатии у крыс конгенных линий могут быть обусловлены взаимодействием генов из перенесенных локусов с генетическим фоном линии-реципиента WAG. Определенное сходство морфологических изменений в сетчатке крыс линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 позволяют предположить, что развитие у животных ретинопатии происходит с участием сходных патогенетических механизмов. Для оценки вклада генов-кандидатов из конгенных локусов первой хромосомы в развитие ретинопатии у крыс OXYS необходимы дальнейшие исследования. Тем не менее, полученные данные позволяют использовать крыс конгенных линий для дифференциального исследования роли и значимости отдельных генов-кандидатов в развитии нейродегенеративных процессов в сетчатке.

Как уже обсуждалось, ускоренное старение мозга крыс OXYS фенотипически проявляется к возрасту 3 мес формированием пассивного типа поведения, повышенной

тревожности, нарушением способности к обучению на фоне нейродегенеративных изменений, выявляемых методами магниторезонансной томографии [Колосова Н.Г., Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Фурсова А. Ж., 2014], а также нарушением формирования длительной посттетанической потенциации. Определенные признаки нейродегенеративных изменений у конгенных животных были выявлены при МРТ исследовании их мозга, однако, даже при исследовании годовалых животных мы не обнаружили значимых различий по морфофункциональным параметрам мозга между конгенными крысами и крысами родительской линии WAG. Не было обнаружено и каких-либо значимых отличий по параметрам, характеризующим поведение конгенных крыс и крыс WAG и их способность к обучению в стандартных тест-системах, в том числе - по параметрам, использованным в QTL-анализе. Можно полагать, что в геноме конгенных крыс отсутствуют генетические факторы, влияющие на формирование характерных для крыс OXYS изменений в когнитивной и эмоциональной сферах.

Таким образом, мы показали, что наследование комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS действительно обусловлено действием многих генов. Следует отметить, что согласно современным представлениям, генетическая архитектура сложных полигенных признаков определяется не только количеством генов в QTL, их индивидуальным вкладом в формирование признака, положением генов на хромосоме, но также их взаимодействием друг с другом и факторами окружающей среды [Fu *et al.*, 2013]. Для прояснения интригующего вопроса о том, какие именно гены оказывают влияние на развитие исследуемого комплексного фенотипа, и каким образом осуществляется их взаимодействие, необходимы дополнительные детальные исследования. Для достижения цели настоящего исследования, с использованием технологии RNA-seq были картированы конгенные локусы первой хромосомы и выявлены гены, проявляющие значительные изменения в экспрессии в сетчатке крыс родительской линии OXYS и конгенных линий на ранней доклинической стадии развития ретинопатии.

### **4.3 Картирование конгенных локусов первой хромосомы**

В результате сравнительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных в кДНК крыс родительских и конгенных линий, в настоящем исследовании показано, что в геноме крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 действительно перенесены локусы первой хромосомы крыс OXYS, и проведено их точное картирование. Показано, что конгенные локусы расположены на первой хромосоме (см. рисунок 13, 14) и позволяют однозначно дифференцировать крыс двух конгенных линий. Доказано, что гены, расположенные в каждом из двух фактических конгенных локусов, действительно оказывают влияние на развитие у крыс и катаракты, и ретинопатии [Rapp, 2000]. Протяженность фактических конгенных локусов составила 62,4 Мб для линии WAG/OXYS-1.2 против 73 Мб

локуса QTL2; и 9 Mb для линии WAG/OXYS-1.1 против 87,4 Mb в случае локуса QTL1. В последнем случае протяженность фактического конгенного локуса оказалась существенно меньше предполагаемой. При этом установлено, что крысам конгенной линии WAG/OXYS-1.1, у которых развиваются и ранняя катаракта, и ретинопатия, от родительской линии OXYS перенесен локус первой хромосомы, не соответствующий по положению ожидаемому локусу QTL1. Этот факт, возможно, объясняется переносом в геном конгенной линии хромосомных сегментов, фланкирующих маркированный локус QTL1 у линии-донора. В соответствии с расчетами, приведенными Дж. Раппом, размер захватываемого при переносе от линии-донора фланкирующего ДНК-сегмента в среднем равняется  $100 / N$  сМ с каждой стороны от используемого маркера [Drake, Schadt, Lusic, 2006; Rapp, 2000], где  $N$  – число поколений возвратного скрещивания в схеме конструирования конгенных животных. Для условий настоящего исследования размер этого сегмента составляет 12,5 сМ, где 1 сМ эквивалентен  $2 \times 10^6$  п.н. ДНК у мышей (и, предположительно, у крыс).

#### **4.4 Гены-кандидаты, в последовательности кДНК которых у крыс OXYS**

##### **выявлены несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы**

##### **относительно крыс WAG**

Представление о важной роли генетических факторов в этиологии заболеваний многофакторной природы находит подтверждение в многочисленных исследованиях ассоциации однонуклеотидных замен (SNP) с развитием патологических процессов. В качестве генетических факторов предрасположенности к развитию полигенных заболеваний интенсивно исследуются полиморфизмы, расположенные в кодирующих последовательностях (сSNPs). Определенную роль в этом играет относительная простота интерпретации их эффекта, в частности, в тех случаях, когда наблюдается несинонимичная замена в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Показано, что сSNP могут оказывать влияние на процессинг как РНК, так и белка. В общем виде мутации по механизму их действия на белковый продукт можно разделить на: 1) мутации, в целом сохраняющие третичную структуру белка, но изменяющие тонкую организацию его функциональных доменов и 2) мутации, нарушающие пространственную организацию белка [Balasubramanian *et al.*, 2005; Sanchez-Ruiz, 2010]. По данным исследований функциональной геномики однонуклеотидные замены в смысловых участках гена способны изменять такие характеристики белка, как стабильность связывания с субстратом и промежуточными метаболитами; термодинамическую стабильность (мутантные белки могут быть подвержены протеолитической деградации с более высокой скоростью), а также посттрансляционную модификацию. При этом, согласно литературным данным, только малая доля из общего числа замен характеризуется

фенотипическим проявлением посредством изменения функции генного продукта или уровня экспрессии, большую часть известных SNP составляют нейтральные замены [Kumar, Henikoff, Ng, 2009]. Интересно, что при секвенировании генома по крайней мере 4х линий крыс, широко используемых при исследовании воспалительных процессов (DA/OlaHsd, DA/hanKini, E3/han, PVG/1AV1.Kini) показано наличие в каждом исследованном геноме приблизительно 3 млн SNPs и 0,3-0,36 млн коротких инсерций относительно BN референсной последовательности RGSC3,4 [Li, Durbin, 2009]. При этом только около 1% всех SNP располагались в кодирующих регионах, и 21% из этих кодирующих полиморфизмов были несинонимичны [Bäckdahl *et al.*, 2014]. Следует добавить, что хотя полиморфизмы, ассоциированные с развитием того или иного комплексного заболевания, могут быть не идентичны у модельных животных и у человека, можно ожидать, что будут идентичны связанные с их эффектами патофизиологические пути.

#### 4.4.1 Гены-кандидаты в конгенных локусах первой хромосомы

Сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), характерных для последовательности кДНК крыс конгенных и родительских линий (данные RNA-seq) позволил выявить несинонимичные замены нуклеотидов в 19 генах, расположенных в фактических конгенных локусах первой хромосомы: 6 - у крыс WAG/OXYS-1.1 и 13 – у крыс WAG/OXYS-1.2 (см. таблица 4). Для 10 выявленных однонуклеотидных полиморфизмов, 7 из которых располагаются в генах первого конгенного локуса, не обнаружено известных колокализованных вариантов в базе данных проекта ENCODE. При этом по крайней мере один SNP, выявленный в первом конгенном локусе в гене *Arhgap33*, потенциально способен значительно изменять структуру и функции белкового продукта гена (предсказание «deleterious»). Белковый продукт *Arhgap33* входит в группу эффекторных молекул семейства GTP-связывающих Rho-белков (Rho-GTPases), посредством которых запускаются процессы генерации изменений в специфических сайтах актинового цитоскелета в ответ на внеклеточные стимулы [Clark, 1998]. Показано участие малых Rho-белков в процессах эндоцитозного транспорта и расщепления белка-предшественника амилоида (APP) с участием  $\alpha$ -секретазы [Schöbel *et al.*, 2008], а также взаимодействия с BACE1 [Zhao *et al.*, 2012], в обеспечении физиологического равновесия между клеточной пролиферацией и апоптозом [Wang, Mandelkow, 2012], регулировании процессов фагоцитоза [Mao, Finnemann, 2015], в связи с чем нарушение функционирования Rho-ГТФаз может оказывать влияние на эффективность иммунной защиты и противовоспалительного ответа. Таким образом, выявленная несинонимичная замена в гене *Arhgap33*, возможно, функционально связана с развитием системного иммунного дисбаланса, отражающегося в изменениях профиля экспрессии генов иммунной системы как в префронтальной коре [Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Ершов Н.И., Рогаев Е.И., Колосова



Н.Г., 2015], так и в сетчатке [Kozhevnikova *et al.*, 2013a] крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar. Следует отметить, что это состояние может создавать метаболический фон для развития и прогрессии многих проявлений преждевременного старения.

Прочие выявленные однонуклеотидные замены, вероятно, оказывают умеренное влияние на структуру и функцию белковых продуктов генов-кандидатов. Тем не менее, в обоих конгенных локусах были выявлены позиционные кандидаты, представляющие интерес для дальнейших исследований благодаря их потенциальной связи с развитием патологических процессов. В частности, это транскрипционные факторы, мутации в генах которых способны приводить к изменению экспрессии на уровне мРНК целого спектра генов-мишеней [Farnebo, Вуков, Wiman, 2010]. Так, в первом конгенном локусе картируется ген *Cebpg* (ССААТ/enhancer binding protein (С/ЕВР),  $\gamma$ ), кодирующий белок семейства ССААТ/энхансер-связывающихся (С/ЕВРs) транскрипционных факторов, участвующих в регуляции роста и дифференцировки клеток, воспалительном ответе, процессах гематопоеза и созревания В-лимфоцитов [Cloutier *et al.*, 2008; Nookala *et al.*, 2013; Yamanaka *et al.*, 1998]. Показана активность СЕВР $\gamma$  в качестве модулятора активности комплекса С/ЕВР в целом [Cooper *et al.*, 1995; Parkin *et al.*, 2002] и, что особенно интересно, - в качестве регулятора транскрипции основных генов, отвечающих за репарацию ДНК, по крайней мере, в клетках бронхиального эпителия [Mullins *et al.*, 2005]. Впрочем, экспрессия генов, относящихся к категории «метаболизм ДНК» (*Prim2*, *Lig4*, *Rtel1*) повышена относительно крыс OXYS у крыс обеих конгенных линий, что не позволяет напрямую связать эти изменения экспрессии с эффектом выявленного полиморфизма. Биологическая роль белкового продукта гена *Cebpg* в сетчатке не вполне изучена, однако недавно на фибробластах мыши была экспериментально показана активность его гетеродимера с С/ЕВР $\beta$  в подавлении экспрессии генов, ассоциированных со старением и иммунным ответом [Huggins *et al.*, 2013]. Во втором конгенном локусе первой хромосомы (у крыс линий WAG/OXYS-1.2 и OXYS), было выявлено 3 несинонимичных однонуклеотидных полиморфизма, картированных в гене *Gtf3c1*, кодирующем субъединицу транскрипционного фактора ШС (general transcription factor ШС, polypeptide 1 $\alpha$ ) [Lagna *et al.*, 1994]. Известно, что данный транскрипционный фактор может регулировать процесс реаранжировки ядерной архитектуры, позволяющей координировать экспрессию нейрональных генов [Crepaldi *et al.*, 2013; Mertens, Roeder, 2008]. Следует отметить, что на первой хромосоме крыс DA, чрезвычайно восприимчивых к целому ряду аутоиммунных заболеваний, также выявлены множественные варианты (single nucleotide variants) гена *Gtf3c*, расположенного в локусе количественного признака *Eae31*, для которого показана ассоциация с воспалительными заболеваниями человека [Bäckdahl *et al.*, 2014].

Ген-кандидат *Cic*, картированный в первом конгенном локусе, участвует в метаболическом с-erbB (*Egfr*) – сигнальном пути, который, возможно, обеспечивает связь между внеклеточными сигналами и экспрессией генов, ассоциированной с протеканием регенеративных процессов при повреждении сетчатки [Wan, Ramachandran, Goldman, 2012]. Было показано, что ингибирование активности EGFR-сигналинга снижает интенсивность неоваскуляризации при развитии кислород-индуцированной ретинопатии у *Timp3*<sup>-/-</sup> нокаутных мышей [Hewing *et al.*, 2013]. Белковый продукт другого гена-кандидата *Nudt19*, nudix (nucleoside diphosphate-linked moiety X)-type motif 19, картированного в первом конгенном локусе, не является транскрипционным фактором, однако показано, что этот белок (совместно с гидролазами семейства Nudix) способен участвовать в процессах декепирования и поддержания стабильности матричных РНК [Song, Bail, Kiledjian, 2013]. Следует отметить, что нарушение регуляции этого гена рассматривается в качестве потенциального маркера ранних стадий ретинопатии [Arisi *et al.*, 2011].

Мы также выявили 4 кандидатных гена (из числа картированных во втором конгенном локусе), которые не содержали несинонимичных кодирующих полиморфизмов, однако дифференциально экспрессировались в сетчатке крыс OXYS и крыс WAG/OXYS-1.2 в возрасте 20 дней: *Zp2*, *Ifit1*, *Coll7a1* и *Snurf*. Можно предположить, что регуляция транскрипции этих генов зависит от генетического окружения. Категории генных онтологий, ассоциированные с геном *Zp2*, - связывание с акрозином и активность корцепторов [Avella, Baibakov, Dean, 2014]. Ген *Coll7a1* кодирует  $\alpha$ -цепь коллагена типа XVII, трансмембранного белка, являющегося структурным компонентом гемидесмосом. Известно, что определенные мутации *Coll7a1* приводят к развитию буллезного эпидермолиза (non-herlitz junctional epidermolysis bullosa) [Pasmooij *et al.*, 2012]. Ген *Ifit1* кодирует белок, продукция которого индуцируется интерфероном, соответствующая категория генных онтологий в соответствии с базой данных REACTOME – «цитокин-опосредованная передача сигнала в иммунной системе» [Croft *et al.*, 2014]. Наиболее охарактеризованным из этих 4х генов является *Snurf*, ген SNRPN (малого ядерного рибонуклеопротеина N), уровень мРНК которого значительно повышен в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS ( $|\log_2FC|>3$ ). Этот ген ассоциирован с синдромами генного импринтинга Прадера-Вилли (Prader-Willi) и Ангельмана (Angelman), вызываемыми хромосомными дефектами (делециями или мутациями) отцовской или материнской хромосомы 15q11-q13, соответственно. Ген SNURF-SNURP имеет необычную для класса эукариот бицистронную структуру с двумя неперекрывающимися рамками считывания, при этом каждый цистрон потенциально играет роль в патогенетических процессах [Bervini, Herzog, 2013; Gray, Saitoh, Nicholls, 1999]. Следует отметить, что высококонсервативная последовательность первого интрона *Snrpn* демонстрирует динамические изменения паттерна

метилирования ДНК в процессах развития и обладает (как показано и для грызунов) чувствительной к метилированию энхансерной активностью. Таким образом, данный ген способен регулировать процессы тканеспецифичной экспрессии [Miyazaki *et al.*, 2009]. Интересно, что согласно данным базы BioGRID, Biological General Repository for Interaction Datasets [Stark *et al.*, 2006], с белком SNURF непосредственно связывается транскрипционный фактор Sp1, участвующий в регуляции транскрипции генов, специфичных для фоторецепторных клеток [Lerner *et al.*, 2005].

Определение функциональной роли выявленных генов-кандидатов в сетчатке крыс, а также в развитии патологии у крыс OXYS и конгенных животных является задачей дальнейших исследований. Следует отметить, что взаимоотношения между транскрипционными факторами и их непосредственными генами-мишенями в сетчатке крыс изучены достаточно слабо. Идентификация их в конкретной экспериментальной модели *in vivo* требует проведения интегративных исследований, в том числе - на уровне посттранскрипционной регуляции и белковых взаимодействий.

#### 4.4.2 Гены-кандидаты из числа ассоциированных с развитием БА

Показано, что с развитием аутосомно-доминантной формы БА ассоциированы мутации в трех генах, включенных в список диагностических критериев заболевания [Jack *et al.*, 2011; Yagi *et al.*, 2014]: белка-предшественника амилоида (*APP*), пресенилина 1 (*PSEN1*), и более редко встречающиеся мутации в гене пресенилина 2 (*PSEN2*) [Luedecke *et al.*, 2014; Muchnik *et al.*, 2015; Testi *et al.*, 2014]. С ними связано около 5 % случаев развития БА в возрасте до 60 лет, что составляет менее 0,01 % от общего количества зарегистрированных случаев заболевания [Waring, Rosenberg, 2008]. Предполагается вклад генетических факторов и в патогенез спорадической формы БА, на которую приходится ~95% случаев заболевания [Mitsui, Tsuji, 2014]. По результатам полногеномных исследований GWAS с когнитивными нарушениями при развитии БА ассоциировано по меньшей мере 20 генетических факторов, хотя возможные молекулярные механизмы вовлечения выявленных генов-кандидатов в патогенез заболевания не установлены и активно обсуждаются. Несмотря на значительные успехи в поиске генетических факторов БА, очевидно, что совокупность известных генов и маркеров далеко не в полной мере характеризует наследственную компоненту заболевания. Так, идентифицированы мутации в гене *APP*, ассоциированные, наоборот, с уменьшением риска развития БА [Hashimoto, Matsuoka, 2014]. Более того, описаны случаи семейной, аутосомно-доминантно наследуемой, формы БА с ранним началом при отсутствии мутаций в генах *PSEN1*, *PSEN2* или *APP*, что позволяет предполагать в данных случаях влияние мутаций неидентифицированных к настоящему моменту генов. Недавно мы показали, что ускоренное старение мозга крыс OXYS ассоциировано с развитием ключевых признаков спорадической формы БА: структурно-

функциональными изменениями нейронов и синапсов, митохондрий, гиперфосфорилированием тау-белка, повышением уровня APP, усиленным накоплением токсических форм Аβ в гиппокампе и префронтальной коре (см. главу 1 «Обзор литературы»). Как показали результаты настоящего исследования, развитие этих признаков у крыс OXYS не связано с несинонимичными мутациями в известных генах, ассоциированных с развитием аутосомно-доминантной формы. При этом в последовательности кДНК крыс OXYS выявлено 3 несинонимичных замены в генах, по тем или иным данным ассоциированных с развитием спорадической формы БА. Эти полиморфизмы не характерны для крыс WAG, демонстрирующих нормальные темпы старения, что свидетельствует в пользу их потенциальной ассоциации с формированием специфического фенотипа крыс OXYS.

В результате анализа данных массового параллельного секвенирования (RNAseq) мы выявили две характерные для крыс OXYS миссенс-мутации в гене *Sor11*, одна из которых потенциально приводит к существенным нарушениям структуры и функции итогового белкового продукта (предсказание «deleterious» согласно алгоритму SIFT). Ген *Sor11*, кодирует белок-рецептор, содержащий связывающий повтор рецепторов липопротеинов низкой плотности типа «А» (LDLR type A binding repeat) и отвечающий за транспорт молекул (в том числе липидов и белка-предшественника амилоида APP) из ранних эндосом в транс-сеть Гольджи [Finan, Okada, Kim, 2011; Shah, Yu, 2006]. Таким образом, генетические полиморфизмы, связанные с нарушением функционирования рецептора, могут приводить к повышенной экспрессии Аβ. Кроме того, показано, что нарушение функции рецепторов семейства Vps10 (к которым относятся сортилин, SorL1, SorCS1, SorCS2, и SorCS3) может приводить к нейротоксическим эффектам благодаря их способности модулировать нейротрофические сигнальные пути [Reitz, 2015]. Потенциально патогенные нонсенс - или миссенс - мутации в гене *SORL1* являются признанными генетическими факторами риска как для спорадических, так и для аутосомно-доминантных форм нейродегенеративных заболеваний, в том числе БА, однако результаты полногеномных исследований ассоциаций в принципе показывают определенную неоднородность в различных популяциях [Jin *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2013]. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что, на возраст начала и характер протекания БА (по крайней мере, некоторых клинических форм) могут влиять факторы не мутационной природы. Следует отметить, что важная роль нарушений транспортировки белков в патогенетических механизмах развития БА подтверждается выявлением ассоциации развития заболевания с вариантами генов *BIN1* и *CD33* [Chouraki, Seshadri, 2014].

В настоящем исследовании в кДНК крыс OXYS также выявлен несинонимичный однонуклеотидный полиморфизм в гене *Casp3*, активация белкового продукта которого обнаружена в биоптатах мозга пациентов с БА. Предполагается, что активация каспаз может

инициироваться в ответ на повышение уровня гиперфосфорилированного тау-белка, обусловленного мутациями тау или спорадическими возраст-зависимыми процессами [Spires-Jones *et al.*, 2009]. В то же время показано, что активация CASP3 ассоциирована с генерацией патологического расщепления тау-белка по остатку аспарагина (421) в составе фибриллярных структур [Jarego-Basulto *et al.*, 2013]. При этом как *in vitro*, так и *in vivo* доказано, что само наличие «урезанного» каспазами тау-белка способно ускорять процессы его агрегации с образованием токсичных олигомеров. Так, у трансгенных мышей, экспрессирующих «урезанный» тау, в значительной части нейронов наблюдаются изменения по типу характерных для БА [Calignon de *et al.*, 2012].

Для определения роли выявленных аллельных вариантов в развитии патологии у крыс OXYS и конгенных животных необходимы дальнейшие исследования. Однако даже учетом того, что некоторые из выявленных генов-кандидатов окажутся не связанными с развитием исследуемого фенотипа, полученные данные можно считать косвенным подтверждением его обусловленности действием многих генов. В целом наши результаты расширяют спектр известных корреляций «генотип-фенотип» для генов, потенциально связанных с развитием комплекса признаков преждевременного старения.

#### **4.5 Сравнительный анализ транскриптома сетчатки крыс конгенных линий и крыс родительской линии OXYS на доклинической стадии развития ретинопатии**

Анализ изменений транскриптома, предшествующих и сопутствующих фенотипическим проявлениям комплексных заболеваний – признанный и продуктивный подход к поиску генов, вовлеченных в их этиологию и патогенез. Изменения экспрессии функционально объединенных групп генов, связанные с развитием этих заболеваний, могут выявляться уже на доклинических стадиях патологического процесса [Kim *et al.*, 2012], однако по очевидным причинам крайне проблематично выявлять такие изменения у людей. В то же время анализ результатов транскриптомных исследований, проведенных на биологических моделях, указывает на то, что нарушение регуляции сходных биологических процессов характерно не только для манифестации разных клинических форм, но и для развития различных нейродегенеративных заболеваний.

Так, согласно литературным данным, на доклинических стадиях и «сухой», и «влажной» форм ВМД, в первую очередь изменяется экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом липидов и сигнальными путями, в частности Wnt-опосредованным сигнальным путем. Что интересно, нарушение экспрессии генов, относящихся к этим же категориям, наблюдается в мозге на ранних стадиях развития форм БА как с ранним, так и поздним началом [Humphries, Kohli, 2014]. Следует отметить, что и на доклинической стадии развития ретинопатии (в

возрасте 20 дней), и в период ее активной манифестации (в возрасте 3 месяца) в сетчатке крыс OXYS изменена по сравнению с крысами Wistar экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом липидов [Telegina *et al.*, «Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy», публикация принята в печать в журнал Cell Cycle]. Убедительным подтверждением системности этих изменений метаболизма являются полученные в настоящем исследовании результаты ЯМР-спектроскопического исследования мозга крыс OXYS. Мы показали, что раннее постнатальное развитие мозга крыс OXYS (в возрасте 2-3 недель) происходит на фоне нарушений баланса между процессами катаболизма и синтеза мембранных фосфолипидов. В настоящем исследовании также выявлено относительное обогащение генов, изменяющих экспрессию в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS, терминами генной онтологии «модификация липидов» и «окисление липидов», а также «метаболические процессы жирных кислот» ( $p < 0,05$ ). Уровень соответствующих мРНК (в частности, для генов *Acadm*, *Ehhadh*, *Ephx2*, *Adh7*) в сетчатке крыс обеих конгенных линий достоверно ниже, чем у крыс OXYS. При этом при сравнении транскриптома сетчатки крыс OXYS и Wistar в возрасте 20 дней (данные готовятся к печати) были выявлены значительные изменения уровня мРНК только для одного из этих генов – *Ehhadh*, причем в сетчатке крыс OXYS уровень мРНК *Ehhadh* был выше, чем у крыс Wistar. Можно предположить, что наблюдаемые изменения экспрессии ассоциированы с развитием патологического процесса в сетчатке и его различной выраженностью у крыс конгенных и родительской линий. В то же время данные ряда научных исследований поддерживают предположение о том, что к изменению липидного баланса и увеличению риска развития ВМД может приводить в принципе дисрегуляция экспрессии генов, участвующих в метаболизме липидов [Mousavi, Armstrong, 2013].

Согласно анализу путей KEGG, при сравнении транскриптома сетчатки крыс двух конгенных линий выделяется группа из 5-ти наиболее вариабельных по уровню экспрессии генов, ассоциированных с метаболическим путем болезни Альцгеймера: *Bace2*, *Wnt16*, *Cdh3*, *Cdh1*, *Wnt6*. Уровень соответствующих мРНК в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 также значительно ниже, чем у крыс WAG/OXYS-1.2.

Ген *Bace2* кодирует аспарагиновую протеазу, паралог BACE1, и, согласно данным ряда исследований, является многообещающей мишенью для генной терапии БА [Southan, Hancock, 2013]. В литературе описана ассоциация между полиморфизмом по вариантам гена BACE2 и возрастом регистрации первых признаков деменции у людей с синдромом Дауна [Mo *et al.*, 2015]. Показано, что  $\beta$ -секретазная активность и продукция бета-амилоида в культуре астроцитов в основном обеспечивается за счет активности BACE2 [Bettegazzi *et al.*, 2011]. В то же время показана функциональная роль BACE2 в качестве протеазы, эффективно разрезающей

$\beta$ -амилоид либо на мелкие фрагменты, либо по нехарактерному для BACE1 сайту, и таким образом способствующей снижению его содержания в тканях [Abdul-Hay *et al.*, 2012]. Причем *in vitro* BACE1 также способен разрушать A $\beta$ , однако в 150 раз менее эффективно по сравнению с BACE2. Таким образом, хотя роль ферментов BACE1 и BACE2 в норме и при развитии патологии на сегодняшний день не ясна полностью, полученные результаты позволяют предположить, что нарушение функционирования белка BACE2 может увеличить риск развития БА. Следует отметить, что группа из 7 ДЭ генов, общих для всех трех сравниваемых в настоящем исследовании линий: WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 и OXYS (см. рисунок 15), включает ген *Calm4*, calmodulin 4, также ассоциированный с метаболическим путем болезни Альцгеймера в терминах генных онтологий.

Гены *Wnt16* и *Wnt6*, уровень мРНК которых также относительно понижен в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с WAG/OXYS-1.2, кодируют белки семейства wingless-type MMTV integration site, и в терминах генных онтологий ассоциированы не только с метаболическим путем болезни Альцгеймера, но и с Wnt-сигнальным путем. Интересно, что в мозге больных БА наблюдается характерное снижение экспрессии многих генов по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста. К процессам, объединяющим гены со сниженной экспрессией, ассоциированные с развитием спорадической формы БА, относятся и процессы сигнальной трансдукции [Ruggiero *et al.*, 2012]. При этом, согласно результатам проведенных ранее исследований транскриптома, в возрасте 20 дней и в сетчатке крыс родительской линии OXYS, и в сетчатке конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, уровень мРНК генов *Bace2* и *Wnt16* значительно ниже, чем у крыс Wistar. Можно предположить, что наблюдаемые однонаправленные изменения экспрессии в сетчатке крыс родительской и конгенных линий ассоциированы с развитием нейродегенеративных процессов. Тем не менее, мы показали, что прогрессия ретинопатии с возрастом у крыс конгенных линий выражена меньше, чем у крыс OXYS, причем у конгенных животных выявляются не все характерные для крыс OXYS морфологические признаки заболевания.

Мы также выявили в сетчатке крыс линии WAG/OXYS-1.1 по сравнению с крысами WAG/OXYS-1.2 снижение (в 1,7 раз) уровня мРНК гена *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor), транскрипционного фактора, принадлежащего к семейству MiTF/TFE, членам которого отводится критическая роль в процессах биогенеза клеточных органелл и энергетического метаболизма [Martina *et al.*, 2014]. Аналогично, уровень мРНК *Mitf* существенно снижен в сетчатке крыс OXYS по сравнению с Wistar в возрасте 20 дней, однако различия сглаживаются к возрасту 3 месяца [Kozhevnikova *et al.*, 2013a]. Известно, что *Mitf* выступает одновременно и в роли гена-мишени, и в роли ядерного медиатора Wnt-опосредованных сигналов, по крайней мере, в меланоцитах [Ploper *et al.*, 2015; Saito *et al.*, 2003].

При сравнении полученных ранее данных [Telegina *et al.*, публикация принята в печать в журнал *Cell Cycle*] с результатами настоящего исследования, в возрасте 20 дней выявлены разнонаправленные изменения уровня мРНК гена *Dkk1*, ассоциированного, согласно данным базы KEGG, с Wnt-зависимым сигнальным путем, в сетчатке крыс линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 относительно уровня, характерного для контрольных крыс Wistar. Уровень соответствующей мРНК в сетчатке крыс линий WAG/OXYS-1.2 и OXYS достоверно выше, чем у Wistar (и значимо не различается), однако в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 уровень мРНК *Dkk1* существенно ниже, чем у крыс Wistar, и в 2,1 раза ниже, чем у крыс WAG/OXYS-1.2. Показано участие белкового продукта *Dkk1* в определенных этапах развития глаза, в частности, в процессах отделения хрусталика от поверхностной эктодермы [Lieven, Rütther, 2011]. Его роль в развитии и функционировании сетчатки не исследована детально. Тем не менее, показано, что этот белок выступает компетентным антагонистом классического Wnt-сигнального пути, причем его эффект дозозависим [Lygos *et al.*, 2014; Scott, Brann, 2013]. Следует отметить, что при сравнении полученных ранее данных с результатами настоящего исследования, значимых различий в уровне мРНК генов *Mitf*, *Bace2*, *Wnt16* в сетчатке крыс линий WAG/OXYS-1.2 и OXYS в возрасте 20 дней также не выявлено. При этом в возрасте 3 месяца в сетчатке крыс OXYS снижена относительно крыс Wistar экспрессия других генов Wnt-сигнального пути: *Wnt7b*, *Wnt10a*, *Wnt4* и *Sfrp4* [Telegina *et al.*, публикация принята в печать в журнал *Cell Cycle*]. Показано, что активация Wnt-сигнального каскада наблюдается в сетчатке и конкретно в клетках РПЭ в различных моделях возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и диабетической ретинопатии [Hu *et al.*, 2013b; Zhao *et al.*, 2013], с нарушением баланса экспрессии соответствующих генов связывают развитие в сетчатке воспаления и окислительного стресса [Zhou *et al.*, 2010]. Экспериментально доказано, что гены Wnt-сигнального пути играют определенную роль в процессах ангиогенеза при неоваскуляризации [Katoh, 2013], в процессах развития клеток ретинального пигментного эпителия [Steinfeld *et al.*, 2013], а также в патогенезе болезни Альцгеймера [Inestrosa, Varela-Nallar, 2014; Rosso, Inestrosa, 2013]. Интересно, что у крыс с ретинопатией, индуцированной кислородом (oxygen-induced retinopathy model of ROP), активация Wnt-сигнального пути наблюдается в период активного развития сосудистой патологии, на 19 постнатальный день [Griffith *et al.*, 2013]. Следует отметить, что в число генов, изменяющих экспрессию с возрастом в префронтальной коре крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar, также входят 46 генов из Wnt-сигнального пути [Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Ершов Н.И., Рогаев Е.И., Колосова Н.Г., 2015]. Можно предположить, что выявленные изменения экспрессии генов характеризуют системные изменения, связанные с развитием нейродегенеративных процессов и в мозге, и в сетчатке крыс OXYS.



К числу эффекторов, интегрирующих Wnt-опосредованные сигналы морфологических и транскриптомных изменений, относятся также члены семейства Rho-ГТФаз [Schlessinger, Hall, Tolwinski, 2009]. В это семейство входит белковый продукт гена *Arhgap33*, функция которого у крыс WAG/OXYS-1.1 и OXYS согласно результатам нашего исследования, возможно, существенно изменена с учетом влияния несинонимичного однонуклеотидного полиморфизма в последовательности его кДНК. Поскольку в числе прочих процессов Wnt-сигнальный путь участвует в регуляции уровня свободного кальция в цитоплазме [De, 2011], наблюдаемые изменения экспрессии Wnt-ассоциированных генов могут приводить к изменению регуляции экспрессии генов  $Ca^{2+}$ -связывающих белков в сетчатке крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS, выявленному в настоящем исследовании. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с Ca-опосредованной передачей сигнала и связыванием кальция, показано в ряде транскриптомных исследований как в мозге пациентов с установленным диагнозом БА, так и в ЭПР трансгенных мышей, экспрессирующих мутантные гены белка-предшественника амилоида и пресенилинов человека [Emilsson, Saetre, Jazin, 2006; Woods, Padmanabhan, 2012].

Следует отметить, что белковые продукты двух генов TGF-бета сигнального пути, вариабельно экспрессирующихся в сетчатке крыс конгенных линий в возрасте 20 дней, в то же время играют важную роль в процессах становления мозга. Так, показано, что экспрессия определенных изоформ *Pitx2* активируется в специфических областях развивающегося головного мозга, что подчеркивает особую роль продуктов гена в процессах миграции и дифференцировки нейронов [Waite, Martin, 2015]. Ген *Thbs4* кодирует белок внеклеточного матрикса, принимающий непосредственное участие в развитии нейрональных клеток [Girard, Eichenberger, Celio, 2014]. Известно, что белковый продукт гена *Dcn* играет определенную роль в процессах сборки внеклеточного матрикса [Mochida *et al.*, 2009; Neill, Schaefer, Iozzo, 2012] и ангиогенеза [Järveläinen, Sainio, Wight, 2015], и вероятно, может быть задействован в патогенезе ВМД. Уровень мРНК соответствующих генов понижен в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с WAG/OXYS-1.2. Интересно, что однонаправленные изменения – значимое снижение уровня мРНК соответствующих генов TGF-бета сигнального пути, – выявляются в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar в возрасте 20 дней [Telegina *et al.*, публикация принята в печать в журнал Cell Cycle], но не выявляются в возрасте 3 месяцев [Kozhevnikova *et al.*, 2013a]. Показано, что TGF-бета сигнальный путь ассоциирован с развитием нейродегенеративных изменений как в исследованиях на генно-инженерных моделях [Tesseur, Wyss-Coray, 2006], так и на людях, в том числе при развитии БА [Caraci *et al.*, 2012; Das, Golde, 2006], а также может быть задействован в процессах регенерации нейронов [Lenkowski *et al.*, 2013]. Можно предположить, что выявленные в настоящей работе изменения

транскриптомного профиля выступают предпосылками развития в будущем нейродегенеративных процессов в сетчатке крыс. Следует отметить, что согласно результатам настоящего исследования, уровень мРНК *Egr1* (early growth response 1) в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.2 в 1,72 раза выше, чем у крыс WAG/OXYS-1.1. Этот ген кодирует транскрипционный фактор, который, как показано на животных моделях глаукомы и БА, является потенциальным посредником нейропротекторных реакций [Bakalash *et al.*, 2011; Mo *et al.*, 2015]. Данные исследования на мышинной модели БА - APP23 - с использованием иммунопреципитации хроматина и последующим секвенированием (ChIP-seq) позволяют предположить, что продукты генов, экспрессия которых регулируется *Egr1*, задействованы в процессах клатрин-опосредованного эндоцитоза, везикулярного транспорта и синаптической передачи в мозге [Koldamova *et al.*, 2014]. Следует отметить, что в упомянутом исследовании Колдамовой с соавторами гены *Psen2*, ассоциированный с риском развития «семейной» формы БА и *Picalm*, ассоциированный с риском развития спорадической формы БА согласно данным GWAS, были идентифицированы в качестве непосредственных мишеней EGR1. При этом было показано, что *Picalm* способен взаимодействовать с белками комплекса SNARE, играющими центральную роль в инициации синхронного высвобождения нейромедиаторов [Harel *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2011]. Показано, что усиление экспрессии *Egr1* ассоциировано с активацией микроглии при нейродегенеративных процессах, в том числе – в сетчатке [Sharma *et al.*, 2012]. Интересно, что согласно литературным данным, ген *Egr1* входит в число немногих описанных генов, взаимодействующих и регулируемых непосредственно *Pitx2*.

В ряде исследований показано, что уровень мРНК генов, функционально связанных с воспалительными процессами, при развитии БА, повышен во многих регионах мозга [Avramopoulos *et al.*, 2011; Bossers *et al.*, 2010; Tollervy *et al.*, 2011]. На настоящий момент неясно, занимает воспаление в патогенетических механизмах развития БА место триггера, первичного ответа или же вторичной ответной реакции. Нейропротекторный эффект, наблюдаемый в частности на биологических моделях болезни Паркинсона и бокового амиотрофического склероза, может быть опосредован как снижением интенсивности процессов воспаления в ЦНС, так и другими молекулярными механизмами. Тем не менее, следует отметить, что 5 (*CR1*, *CD33*, *HLA-DRB5-DRB1*, *INPP5D*, *MEF2C*) из 20 генов, ассоциированных с развитием спорадической формы БА, согласно данным GWAS, так или иначе, участвуют в воспалительных процессах [Lambert *et al.*, 2013]. Признаки воспаления выражены в сетчатке пациентов с ВМД. Впрочем, менее выраженные аналогичные изменения наблюдаются при нормальном старении глаза и квалифицируются как паравоспаление [Chen *et al.*, 2010a]. Это позволяет рассматривать провоспалительные процессы в качестве проявлений, типичных для старения [Cai, Liu, 2012; Kaarniranta *et al.*, 2011]. Мы показали, что гены, функционально

связанные с воспалительным ответом, изменяют экспрессию в сетчатке крыс обеих конгенных линий. Интересно, что у крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с крысами OXYS существенно снижен уровень мРНК гена *Cd14*. Показано, что CD14 и Toll-like рецепторы (TLRs) участвуют в процессах активации микроглии, сопровождающих развитие нейродегенеративных изменений (см. главу 1 «Обзор литературы»), при этом CD14, возможно, является важнейшим регулятором опосредованного микроглией воспалительного ответа, связанного с процессами отложения депозитов  $\beta$ -амилоида [Landreth, Reed-Geaghan, 2009; Reed-Geaghan *et al.*, 2010]. Доказано, что фибриллярный  $\beta$ -амилоид способен непосредственно реагировать с рецептором TLR2, TLR4, и белком CD14, что индуцирует утилизацию (фагоцитоз)  $\beta$ -амилоида клетками микроглии на ранних стадиях, и нейровоспалительный ответ на поздних стадиях БА [Gambuzza *et al.*, 2014]. Ранее мы показали, что при прогрессии ретинопатии и с возрастом в сетчатке крыс также существенно изменяется экспрессия генов, участвующих в модуляции иммунного ответа и генов внеклеточного матрикса [Kozhevnikova *et al.*, 2013a]. Изменения экспрессии генов в сетчатке конгенных животных в возрасте 20 дней, выявленные в настоящем исследовании, ассоциированы с модуляцией иммунного ответа (у крыс WAG/OXYS-1.1) и генов внеклеточного матрикса (у крыс обеих конгенных линий). Эти результаты находят подтверждение в литературных данных. Так, показано, что с возрастом изменения экспрессии генов воспалительного ответа, цитокиновой активности и внеклеточного матрикса регистрируются в различных тканях модельных животных [Cai, Liu, 2012; Landis, Shen, Tower, 2012], в том числе в сетчатке при развитии ретинопатии [Chen *et al.*, 2010a]. Интересно, что изменения экспрессии генов, регулирующих архитектуру цитоскелета, наблюдаются и в мозге при развитии БА, что находит объяснение в рамках гипотезы тау-опосредованного развития заболевания [Bamburg, Bloom, 2009; Iqbal *et al.*, 2005].

Как уже обсуждалось, (см. главу 1 «Обзор литературы») в качестве одного из ключевых факторов риска развития нейродегенеративных заболеваний рассматривается дисфункция митохондрий [Witte *et al.*, 2010]. В ряде исследований мозга пациентов с БА показано, что категории генных онтологий, функционально связанные с метаболическими процессами и функционированием митохондрий, объединяют ДЭ гены с повышенной на уровне мРНК экспрессией относительно контрольной группы [Mills *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2012]. При этом показано, что при развитии признаков БА функционирование митохондрий нарушается под воздействием белка-предшественника амилоида, непосредственно  $\beta$ -амилоида и пресенилинов [Begley *et al.*, 1999; Serý *et al.*, 2013]. Согласно нашим данным уже в возрасте 20 дней в сетчатке крыс OXYS наблюдалось повышение экспрессии генов, ассоциированных с функциональностью митохондрий и окислением жирных кислот: *Ehhadh* и *Acadm* [Bruun, Doktor, Andresen, ; Houten *et al.*, 2012] относительно крыс обеих конгенных линий. Так,

известно, что белковый продукт гена *Ehhadh* является L-бифункциональным ферментом, необходимым для синтеза средней цепи дикарбоновых кислот, и, соответственно, скоординированной индукции митохондриальных и пероксисомных метаболических путей окисления жирных кислот, в частности, во время голодания [Houten *et al.*, 2012]. Кроме того, в сетчатке крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 был повышен относительно OXYS уровень мРНК генов, белковые продукты которых ассоциированы с внутренней митохондриальной мембраной - *Yme1l1* и *Gatm*. Человеческий ген-гомолог *Yme1l1* имеет определенное сходство с консервативными АТФ-зависимыми протеиназами митохондрий, так называемыми AAA протеазами [Ruan *et al.*, 2013], необходимыми для протекания процессов клеточного деления, морфогенеза крист и апоптоза [Stiburek *et al.*, 2012]. Впрочем, роль YME1L1 в регуляции функционирования митохондрий млекопитающих остается неясной. Наши исследования позволяют предположить, что дисфункция митохондрий становится одним из наиболее ранних событий при развитии признаков нейродегенеративных изменений и в мозге крыс OXYS. Так, снижение функциональной активности фермента комплекса IV дыхательной цепи митохондрий цитохром *c* оксидазы, рассматриваемая в качестве одного из ключевых показателей дисфункции митохондрий в мозге при развитии БА, снижается в гиппокампе и только затем, с возрастом, во фронтальной коре крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar [Стефанова Н.А., Корболина Е.Е., Ершов Н.И., Рогаев Е.И., Колосова Н.Г., 2015].

В целом мы выявили в сетчатке 20-дневных крыс каждой из полученных конгенных линий характерные изменения экспрессии генов по сравнению с крысами родительской линии OXYS, которые могут рассматриваться как предпосылки развития в дальнейшем нейродегенеративных процессов. Принципиально важно, что гены, дифференциально экспрессирующиеся в сетчатке крыс конгенных линий по сравнению с крысами OXYS, принадлежат к пересекающимся категориям генных онтологий, в частности, воспалительного ответа. Более того, направленность изменения уровней мРНК совпадающих ДЭ генов относительно крыс OXYS у конгенных животных одинакова.

Можно полагать, что особенности транскриптома сетчатки конгенных животных обусловлены спецификой молекулярных событий, ассоциированных с перенесенными в их геном локусами первой хромосомы крыс OXYS. Интересными кандидатами представляются дифференциально экспрессирующиеся гены, кодирующие регуляторы транскрипции. Так, ген *Elf3*, уровень мРНК которого понижен в сетчатке крыс обеих конгенных линий по сравнению с крысами OXYS, кодирует транскрипционный фактор, высокоэкспрессированный в клетках РПЭ и способный, как показано *in vitro*, регулировать экспрессию специфических для тканей глаза генов, в т.ч. *TIMP3* [Jobling *et al.*, 2002]. Также в сетчатке конгенных крыс в возрасте 20 дней была изменена по сравнению с крысами OXYS экспрессия генов мультибелкового

медиаторного комплекса (MED), высококонсервативного ключевого регулятора транскрипции у эукариот. При этом и у крыс WAG/OXYS-1.1, и у крыс WAG/OXYS-1.2 уровень мРНК гена *MED8* был повышен, а гена *MED20* - понижен. Известно, что нарушения функционирования комплекса MED ассоциированы с некоторыми заболеваниями человека. Например, альтернативный сплайсинг соответствующих генов может способствовать неоваскуляризации, характеризующей поздние стадии как «сухой», так и «влажной» формы ВМД [Rienzo *et al.*, 2014]. В настоящем исследовании мы показали, что и морфологические изменения сетчатки крыс линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 с возрастом имеют определенное сходство. При этом выявленное изменение в сетчатке конгенных крыс уровня мРНК генов, относящихся к функциональной категории «развития кровеносных сосудов» хорошо согласуется с данными гистоморфологического исследования о различиях в ретинальном кровоснабжении крыс конгенных и родительской линии. В совокупности наши данные могут свидетельствовать о том, что в патологических нейродегенеративных процессах, развивающихся в сетчатке конгенных крыс, в определенной степени задействованы общие молекулярные механизмы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным вкладом настоящего исследования в изучение молекулярно-генетических механизмов комплексного развития признаков преждевременного старения является выявление ассоциации развития ранней катаракты и ретинопатии у крыс OXYS с индивидуальными локусами первой хромосомы, и ее экспериментальное доказательство с использованием двух оригинальных конгенных линий крыс. На основании сравнительного анализа однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных в кДНК крыс родительских и сконструированных конгенных линий по данным массового параллельного секвенирования (RNAseq), было проведено точное картирование границ выявленных локусов и составлен список генов - кандидатов, потенциально оказывающих влияние на развитие патологических процессов. В их число вошли 19 генов, расположенных в картированных локусах первой хромосомы, и 2 гена, согласно литературным данным ассоциированные с развитием спорадической формы болезни Альцгеймера, в последовательности которых были выявлены несинонимичные замены (SNP). Впервые полученные данные по масштабному изменению экспрессии генов в сетчатке крыс родительской и конгенных линий позволили выявить ряд молекулярно-генетических путей, ассоциированных с развитием у животных клинически и морфологически различных признаков ретинопатии на ранней доклинической стадии развития заболевания (в возрасте 20 дней). Из полученных результатов следует, что развитие у крыс конгенных линий ретинопатии происходит на фоне нарушения баланса экспрессии генов, связанных с метаболизмом жирных кислот и липидов, метаболизмом ДНК, и с воспалительным ответом. Потенциально эти же гены могут оказывать влияние на развитие ранней катаракты и ретинопатии, аналогичной ВМД, у крыс родительской линии OXYS. Также с использованием метода  $P^{31}$ -ЯМР спектроскопии впервые показано, что раннее постнатальное развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма, в то время как дефицита высокоэнергетических фосфатов не наблюдается, в том числе и в последующие периоды жизни. Несмотря на то, что не все полученные экспериментальные данные подтвердили гипотезы, сформулированные по результатам проведенного QTL-анализа, показана научно-практическая ценность оригинальных конгенных линий крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 для интегративных исследований причин и механизмов развития нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в особенности при параллельном с катарактой развитии. Результаты могут быть востребованы для поиска новых терапевтических мишеней при создании препаратов, направленных на профилактику и лечение заболеваний, ассоциированных с возрастом. Полученные данные определяют основы для дифференциального подхода к выяснению роли и значимости выделенных генов-кандидатов в развитии нейродегенеративных процессов.

**ВЫВОДЫ:**

- 1) Постнатальное развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма – увеличения уровня креатинфосфата и его утилизации на синтез АТФ. Развитие признаков ускоренного старения мозга у крыс OXYS к возрасту 3 месяцев не связано с нарушением энергетического метаболизма - дефицитом высокоэнергетических фосфатов.
- 2) Методом QTL-анализа на первой хромосоме крыс OXYS выявлены локусы, ассоциированные с развитием признаков преждевременного старения: катаракты, ретинопатии и поведенческих признаков ускоренного старения мозга.
- 3) Перенос выявленных локусов в геном крыс WAG с контролем по ограничивающим локусы микросателлитным маркерам привел к развитию ранней катаракты и ретинопатии у крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2.
- 4) По результатам анализа данных массового параллельного секвенирования (RNA-seq) картировано положение перенесенных локусов: первый –  $8,9 \times 10^7$ – $9,7 \times 10^7$  п.о./  $1,04 \times 10^8$ – $1,05 \times 10^8$  п.о. и второй –  $1,78 \times 10^8$ – $2,1 \times 10^8$  п.о./  $2,34 \times 10^8$ – $2,75 \times 10^8$  п.о. первой хромосомы.
- 5) Согласно результатам анализа данных RNA-seq специфичные для крыс OXYS несинонимичные относительно крыс WAG однонуклеотидные полиморфизмы присутствуют в последовательности кДНК 19 генов, расположенных в картированных локусах первой хромосомы, и в 2-х генов, по литературным данным ассоциированных с развитием спорадической формы болезни Альцгеймера. Выявленные полиморфизмы способны влиять на развитие комплекса признаков преждевременного старения у крыс OXYS.
- 6) Методом RNA-seq показано, что на доклинической стадии развития ретинопатии (в возрасте 20 дней) в сетчатке конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS изменен уровень мРНК, соответственно, 80 и 226 генов, функционально связанных в том числе с организацией внеклеточного матрикса, метаболизмом жирных кислот, метаболизмом ДНК и воспалительным ответом.
- 7) Сравнительный анализ транскриптома сетчатки методом RNA-seq показал, что характерные особенности развития ретинопатии у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 формируются на фоне изменения на доклинической стадии заболевания уровня мРНК генов, ассоциированных с активностью транскрипционных факторов, морфогенезом кровеносных сосудов, межклеточными коммуникациями и передачей сигнала. Анализ метаболических путей выявил значимую представленность генов, ассоциированных с метаболическим путем болезни Альцгеймера, а также с Wnt- и TGF- $\beta$ - опосредованными сигнальными путями,

задействованными в патогенезе нейродегенеративных процессов, как у модельных животных, так и у человека.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Береговой Н.А. Возрастные особенности формирования длительной посттетанической потенциации у крыс линии OXYS / Н. А. Береговой, Н. С. Сорокина, М. В. Старостина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2011. – Т. 151 – № 1 – 82–86с.
2. Жданкина А.А. Исследование нейроретинопротекторной активности тиофана при инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS / А. А. Жданкина, Г. А. Кон, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута, С. В. Логвинов, А. Е. Просенко // Бюлл. сибирской медицины. – 2013. – Т. 12 – № 3 – 24–31с.
3. Жданкина А.А. Клинико-морфологические особенности хориоретинальной дегенерации у преждевременно стареющих крыс OXYS / А. А. Жданкина, А. Ж. Фурсова, С. В. Логвинов // Бюлл. эксперим. биол. – 2008. – Т. 10 – 435–437с.
4. Кадыков А.С. Болезнь Альцгеймера: механизмы развития и лечение / А. С. Кадыков // Фарматека. – 2009. – Т. 7 – 55–57с.
5. Колосова Н.Г. Крысы OXYS — генетическая модель преждевременного старения и связанных с ним заболеваний / Н. Г. Колосова, Н. А. Стефанова, Е. Е. Корболина, А. Ж. Фурсова // Успехи геронтологии. – 2014. – Т. 27 – № 2 – 336–340с.
6. Маркова Е.В. Показатели активности клеточного звена иммунного ответа крыс линий Вистар и OXYS и особенности их поведения в тесте «открытое поле» / Е. В. Маркова // Бюлл. эксперим. биол. – 2003. – Т. 136 – № 12 – 427–429с.
7. Непомнящих Л.М. Клеточные механизмы генетически детерминированной гипертрофической кардиомиопатии у крыс линии W/SSM / Л. М. Непомнящих, Д. Е. Семёнов, Н. А. Соловьёва // Бюлл. эксперим. биол. – 1994. – Т. 118 – № 11 – 547–551с.
8. Обухова Л.А. Структурно-функциональные основы ускоренной инволюции тимуса у крыс OXYS / Л. А. Обухова, В. Б. Вайс, Л. Е. Бакеева, С. В. Сергеева // Успехи геронтол. – 2013. – Т. 26 – № 2 – 229–235с.
9. Рогаев Е.И. Генетические основы болезней Альцгеймера / Е. И. Рогаев // Генетика. – 1999. – Т. 35 – 1558–1571с.
10. Сапрунова В.Б. Динамика липофусциновых гранул при развитии макулодистрофии, зависимой от возраста / В. Б. Сапрунова, Д. И. Пилипенко, А. В. Алексеевский, А. Ж. Фурсова, Н. Г. Колосова // Биохимия (Москва). – 2010. – Т. 75 – № 2 – 158–168с.
11. Соловьёва Н.А. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей / Н. А. Соловьёва, Т. С. Морозкова // Генетика. – 1975. – Т. 18 – № 5 – 63–71с.
12. Стефанова Н.А. Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS / Н. А. Стефанова, Е. Е. Корболина, Н. И.

- Ершов, Е. И. Рогаев, Н. Г. Колосова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19, №4. – С. 74-82.
13. Фурсова А.Ж. Хориоретинальная дистрофия: особенности развития у преждевременно стареющих крыс охус и её коррекция митохондриальным антиоксидантом: дис. док. мед. наук: 14.00.16, 14.00.08 / Фурсова Анжела Жановна; ГБУЗ НСО «ГНОКБ». – Новосибирск; 2009. – 189 с.
14. Abdul-Hay S.O. Identification of BACE2 as an avid  $\beta$ -amyloid-degrading protease. / S. O. Abdul-Hay, T. Sahara, M. McBride, D. Kang, M. A. Leissring // *Mol. Neurodegener.* – 2012. – Т. 7 – 46с.
15. Abecasis G.R. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. / G. R. Abecasis, A. Auton, L. D. Brooks, M. A. DePristo, R. M. Durbin, R. E. Handsaker, H. M. Kang, G. T. Marth, G. A. McVean // *Nature* – 2012. – Т. 491 – № 7422 – 56–65с.
16. Adams M.K.M. Apolipoprotein E gene associations in age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. / M. K. M. Adams, J. A. Simpson, A. J. Richardson, D. R. English, K. Z. Aung, G. A. Makeyeva, R. H. Guymer, G. G. Giles, J. Hopper, L. D. Robman, P. N. Baird // *Am. J. Epidemiol.* – 2012. – Т. 175 – № 6 – 511–8с.
17. Adie E.A. Speeding disease gene discovery by sequence based candidate prioritization. / E. A. Adie, R. R. Adams, K. L. Evans, D. J. Porteous, B. S. Pickard // *BMC Bioinformatics* – 2005. – Т. 6 – 55с.
18. Adler R. Cell death in age-related macular degeneration. / R. Adler, C. Curcio, D. Hicks, D. Price, F. Wong // *Mol. Vis.* – 1999. – Т. 5 – 31с.
19. Agafonova I.G. Effect of histochrome on brain vessels and research and exploratory activity of senescence-accelerated OXYS rats. / I. G. Agafonova, N. G. Kolosova, N. P. Mishchenko, E. L. Chaikina, V. A. Stonik // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – Т. 143 – № 4 – 467–71с.
20. Agostinho P. Localization and Trafficking of Amyloid- $\beta$  Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. / P. Agostinho, A. Pliássova, C. R. Oliveira, R. A. Cunha // *J. Alzheimers. Dis.* – 2015. – Т. 45 – № 2 – 329–47с.
21. Akiyama H. Inflammation and Alzheimer's disease. / H. Akiyama, S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. L. Fiebich, C. E. Finch, S. Frautschy, W. S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I. R. Mackenzie, P. L. McGeer, M. K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, T. Wyss-Coray // *Neurobiol. Aging* – Т. 21 – № 3 – 383–421с.

22. Ala U. Prediction of human disease genes by human-mouse conserved coexpression analysis. / U. Ala, R. M. Piro, E. Grassi, C. Damasco, L. Silengo, M. Oti, P. Provero, F. Di Cunto // *PLoS Comput. Biol.* – 2008. – T. 4 – № 3 – e1000043c.
23. Alexopoulos P. Impact of SORL1 single nucleotide polymorphisms on Alzheimer's disease cerebrospinal fluid markers / P. Alexopoulos, L. H. Guo, M. Kratzer, C. Westerteicher, A. Kurz, R. Perneczky// *Dement Geriatr Cogn Disord.* – 2011. – 32. – P. 164–170.
24. Alikhani N. Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- $\beta$  degrading enzyme, PreP peptidasome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. / N. Alikhani, L. Guo, S. Yan, H. Du, C. M. Pinho, J. X. Chen, E. Glaser, S. S. Yan // *J. Alzheimers. Dis.* – 2011. – T. 27 – № 1 – 75–87c.
25. Almkvist O. Conversion from preclinical to clinical stage of Alzheimer's disease as shown by decline of cognitive function in carriers of the Swedish APP-mutation. / O. Almkvist, K. Axelman, H. Basun, L. O. Wahlund, L. Lannfelt // *J. Neural Transm. Suppl.* – 2002. – № 62 – 117–25c.
26. Alvarez V. Mitochondrial transcription factor A (TFAM) gene variation and risk of late-onset Alzheimer's disease. / V. Alvarez, A. I. Corao, C. Alonso-Montes, E. Sánchez-Ferrero, L. De Mena, B. Morales, M. García-Castro, E. Coto // *J. Alzheimers. Dis.* – 2008. – T. 13 – № 3 – 275–80c.
27. Anders S. Differential expression analysis for sequence count data. / S. Anders, W. Huber // *Genome Biol.* – 2010. – T. 11 – № 10 – R106c.
28. Anderson D.H. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. / D. H. Anderson, M. J. Radeke, N. B. Gallo, E. A. Chapin, P. T. Johnson, C. R. Curletti, L. S. Hancox, J. Hu, J. N. Ebright, G. Malek, M. A. Hauser, C. B. Rickman, D. Bok, G. S. Hageman, L. V Johnson // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2010. – T. 29 – № 2 – 95–112c.
29. Andreasen M. Interactions between misfolded protein oligomers and membranes: A central topic in neurodegenerative diseases? / M. Andreasen, N. Lorenzen, D. Otzen // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – T. 1848 – № 9 – 1897–907c.
30. Anstey K.J. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. / K. J. Anstey, C. von Sanden, A. Salim, R. O'Kearney // *Am. J. Epidemiol.* – 2007. – T. 166 – № 4 – 367–78c.
31. Antonell A. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. / A. Antonell, A. Lladó, J. Almirall, T. Botta-Orfila, M. Balasa, M. Fernández, I. Ferrer, R. Sánchez-Valle, J. L. Molinuevo // *Neurobiol. Aging* – 2013. – T. 34 – № 7 – 1772–8c.

32. Arango-Gonzalez B. Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. / B. Arango-Gonzalez, D. Trifunović, A. Sahaboglu, K. Kranz, S. Michalakis, P. Farinelli, S. Koch, F. Koch, S. Cottet, U. Janssen-Bienhold, K. Dedek, M. Biel, E. Zrenner, T. Euler, P. Ekström, M. Ueffing, F. Paquet-Durand // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 11 – e112142c.
33. Arisi I. Gene expression biomarkers in the brain of a mouse model for Alzheimer's disease: mining of microarray data by logic classification and feature selection. / I. Arisi, M. D'Onofrio, R. Brandi, A. Felsani, S. Capsoni, G. Drovandi, G. Felici, E. Weitschek, P. Bertolazzi, A. Cattaneo // *J. Alzheimers. Dis.* – 2011. – T. 24 – № 4 – 721–38c.
34. Armstrong R.A. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. / R. A. Armstrong // *Folia Neuropathol.* – 2009. – T. 47 – № 4 – 289–99c.
35. Aronis A. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by attenuated production of mitochondria-derived reactive oxygen species. / A. Aronis, J. A. Melendez, O. Golan, S. Shilo, N. Dicter, O. Tirosh // *Cell Death Differ.* – 2003. – T. 10 – № 3 – 335–44c.
36. Athanasiu L. Genome-wide association study identifies common variants associated with pharmacokinetics of psychotropic drugs. / L. Athanasiu, L.-L. H. Smorr, M. Tesli, J. I. Røssberg, I. E. Sønderby, O. Spigset, S. Djurovic, O. A. Andreassen // *J. Psychopharmacol.* – 2015. – T. 29 – № 8 – 884–91c.
37. Auer P.L. Rare variant association studies: considerations, challenges and opportunities. / P. L. Auer, G. Lettre // *Genome Med.* – 2015. – T. 7 – № 1 – 16c.
38. Avella M.A. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. / M. A. Avella, B. Baibakov, J. Dean // *J. Cell Biol.* – 2014. – T. 205 – № 6 – 801–9c.
39. Avramopoulos D. Gene expression reveals overlap between normal aging and Alzheimer's disease genes. / D. Avramopoulos, M. Szymanski, R. Wang, S. Bassett // *Neurobiol. Aging* – 2011. – T. 32 – № 12 – 2319.e27–34c.
40. Bäckdahl L. Identification of candidate risk gene variations by whole-genome sequence analysis of four rat strains commonly used in inflammation research. / L. Bäckdahl, D. Ekman, M. Jagodic, T. Olsson, R. Holmdahl // *BMC Genomics* – 2014. – T. 15 – 391c.
41. Baird P.N. Association of the M55L and Q192R paraoxonase gene polymorphisms with age-related macular degeneration. / P. N. Baird, D. Chu, E. Guida, H. T. V Vu, R. Guymer // *Am. J. Ophthalmol.* – 2004. – T. 138 – № 4 – 665–6c.
42. Baird P.N. The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. / P. N. Baird, E. Guida, D. T. Chu, H. T. V Vu, R. H. Guymer // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – T. 45 – № 5 – 1311–5c.

43. Bakalash S. Egr1 expression is induced following glatiramer acetate immunotherapy in rodent models of glaucoma and Alzheimer's disease. / S. Bakalash, M. Pham, Y. Koronyo, B. C. Salumbides, A. Kramerov, H. Seidenberg, D. Berel, K. L. Black, M. Koronyo-Hamaoui // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – T. 52 – № 12 – 9033–46c.
44. Balasubramanian S. Sequence variation in G-protein-coupled receptors: analysis of single nucleotide polymorphisms. / S. Balasubramanian, Y. Xia, E. Freinkman, M. Gerstein // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – T. 33 – № 5 – 1710–21c.
45. Balietti M. Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. / M. Balietti, B. Giorgetti, T. Casoli, M. Solazzi, F. Tamagnini, C. Burattini, G. Aicardi, P. Fattoretti // *J. Alzheimers. Dis.* – 2013. – T. 34 – № 4 – 887–96c.
46. Bamberg J.R. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. / J. R. Bamberg, G. S. Bloom // *Cell Motil. Cytoskeleton* – 2009. – T. 66 – № 8 – 635–49c.
47. Bao L. PolymiRTS Database: linking polymorphisms in microRNA target sites with complex traits. / L. Bao, M. Zhou, L. Wu, L. Lu, D. Goldowitz, R. W. Williams, Y. Cui // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – T. 35 – № Database issue – D51–4c.
48. Barakat A. Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in *Prunus persica*. / A. Barakat, A. Sriram, J. Park, T. Zhebentyayeva, D. Main, A. Abbott // *BMC Genomics* – 2012. – T. 13 – 481c.
49. Baranzini S.E. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. / S. E. Baranzini, N. W. Galwey, J. Wang, P. Khankhanian, R. Lindberg, D. Pelletier, W. Wu, B. M. J. Uitdehaag, L. Kappos, C. H. Polman, P. M. Matthews, S. L. Hauser, R. A. Gibson, J. R. Oksenberg, M. R. Barnes // *Hum. Mol. Genet.* – 2009. – T. 18 – № 11 – 2078–90c.
50. Barbosa-Morais N.L. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. / N. L. Barbosa-Morais, M. Irimia, Q. Pan, H. Y. Xiong, S. Gueroussov, L. J. Lee, V. Slobodeniuc, C. Kutter, S. Watt, R. Colak, T. Kim, C. M. Misquitta-Ali, M. D. Wilson, P. M. Kim, D. T. Odom, B. J. Frey, B. J. Blencowe // *Science* – 2012. – T. 338 – № 6114 – 1587–93c.
51. Barone E. Heme oxygenase-1 posttranslational modifications in the brain of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. / E. Barone, F. Di Domenico, R. Sultana, R. Coccia, C. Mancuso, M. Perluigi, D. A. Butterfield // *Free Radic. Biol. Med.* – T. 52 – № 11-12 – 2292–301c.
52. Barot M. Mitochondrial dysfunction in retinal diseases. / M. Barot, M. R. Gokulgandhi, A. K. Mitra // *Curr. Eye Res.* – 2011. – T. 36 – № 12 – 1069–77c.

53. Barral S. Genotype patterns at PICALM, CR1, BIN1, CLU, and APOE genes are associated with episodic memory. / S. Barral, T. Bird, A. Goate, M. R. Farlow, R. Diaz-Arrastia, D. A. Bennett, N. Graff-Radford, B. F. Boeve, R. A. Sweet, Y. Stern, R. S. Wilson, T. Foroud, J. Ott, R. Mayeux // *Neurology* – 2012. – T. 78 – № 19 – 1464–71c.
54. Bashir A. Designing deep sequencing experiments: detecting structural variation and estimating transcript abundance. / A. Bashir, V. Bansal, V. Bafna // *BMC Genomics* – 2010. – T. 11 – 385c.
55. Begley J.G. Altered calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in cortical synaptic compartments of presenilin-1 mutant mice. / J. G. Begley, W. Duan, S. Chan, K. Duff, M. P. Mattson // *J. Neurochem.* – 1999. – T. 72 – № 3 – 1030–9c.
56. Belin A.C. Association study of two genetic variants in mitochondrial transcription factor A (TFAM) in Alzheimer's and Parkinson's disease. / A. C. Belin, B. F. Björk, M. Westerlund, D. Galter, O. Sydow, C. Lind, K. Pernold, L. Rosvall, A. Håkansson, B. Winblad, H. Nissbrandt, C. Graff, L. Olson // *Neurosci. Lett.* – 2007. – T. 420 – № 3 – 257–62c.
57. Bell R.D. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. / R. D. Bell, B. V. Zlokovic // *Acta Neuropathol.* – 2009. – T. 118 – № 1 – 103–13c.
58. Bergmann S. Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. / S. Bergmann, J. Ihmels, N. Barkai // *PLoS Biol.* – 2004. – T. 2 – № 1 – E9c.
59. Bertram L. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. / L. Bertram, C. M. Lill, R. E. Tanzi // *Neuron* – 2010. – T. 68 – № 2 – 270–81c.
60. Bertram L. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. / L. Bertram, M. B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker, R. E. Tanzi // *Nat. Genet.* – 2007. – T. 39 – № 1 – 17–23c.
61. Bervini S. Mouse models of Prader-Willi Syndrome: a systematic review. / S. Bervini, H. Herzog // *Front. Neuroendocrinol.* – 2013. – T. 34 – № 2 – 107–19c.
62. Bettegazzi B.  $\beta$ -Secretase activity in rat astrocytes: translational block of BACE1 and modulation of BACE2 expression. / B. Bettegazzi, M. Mihailovich, A. Di Cesare, A. Consonni, R. Macco, I. Pelizzoni, F. Codazzi, F. Grohovaz, D. Zacchetti // *Eur. J. Neurosci.* – 2011. – T. 33 – № 2 – 236–43c.
63. Bettens K. Genetic insights in Alzheimer's disease. / K. Bettens, K. Sleegers, C. Van Broeckhoven // *Lancet. Neurol.* – 2013. – T. 12 – № 1 – 92–104c.
64. Bianco F. Astrocyte-Derived ATP Induces Vesicle Shedding and IL-1 Release from Microglia / F. Bianco, E. Pravettoni, A. Colombo, U. Schenk, T. Moller, M. Matteoli, C. Verderio // *J. Immunol.* – 2005. – T. 174 – № 11 – 7268–7277c.

65. Bickler P.E. Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices. / P. E. Bickler, B. M. Hansen // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1998. – T. 106 – № 1-2 – 57–69c.
66. Bilkei-Gorzo A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. / A. Bilkei-Gorzo // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – T. 142 – № 2 – 244–57c.
67. Blair L.J. The emerging role of peptidyl-prolyl isomerase chaperones in tau oligomerization, amyloid processing, and Alzheimer's disease. / L. J. Blair, J. D. Baker, J. J. Sabbagh, C. A. Dickey // *J. Neurochem.* – 2015. – T. 133 – № 1 – 1–13c.
68. Blasiak J. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. / J. Blasiak, G. Petrovski, Z. Veréb, A. Facskó, K. Kaarniranta // *Biomed Res. Int.* – 2014. – T. 2014 – 768026c.
69. Bleasel J.M. Increased expression of ABCA8 in multiple system atrophy brain is associated with changes in pathogenic proteins. / J. M. Bleasel, J.-H. T. Hsiao, G. M. Halliday, W. S. Kim // *J. Parkinsons. Dis.* – 2013. – T. 3 – № 3 – 331–9c.
70. Bobba A. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by  $\beta$ -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. / A. Bobba, G. Amadoro, D. Valenti, V. Corsetti, R. Lassandro, A. Atlante // *Mitochondrion* – 2013. – T. 13 – № 4 – 298–311c.
71. Bobko A.A. 19F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and OXYS rats. / A. A. Bobko, S. V Sergeeva, E. G. Bagryanskaya, A. L. Markel, V. V Khramtsov, V. A. Reznikov, N. G. Kolosova // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – T. 330 – № 2 – 367–70c.
72. Bolshette N.B. Protein folding and misfolding in the neurodegenerative disorders: a review. / N. B. Bolshette, K. K. Thakur, A. P. Bidkar, C. Trandafir, P. Kumar, R. Gogoi // *Rev. Neurol. (Paris)*. – 2014. – T. 170 – № 3 – 151–61c.
73. Booij J.C. The dynamic nature of Bruch's membrane. / J. C. Booij, D. C. Baas, J. Beisekeeva, T. G. M. F. Gorgels, A. A. B. Bergen // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2010. – T. 29 – № 1 – 1–18c.
74. Borchelt D.R. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. / D. R. Borchelt, G. Thinakaran, C. B. Eckman, M. K. Lee, F. Davenport, T. Ratovitsky, C. M. Prada, G. Kim, S. Seekins, D. Yager, H. H. Slunt, R. Wang, M. Seeger, A. I. Levey, S. E. Gandy, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Price, S. G. Younkin, S. S. Sisodia // *Neuron* – 1996. – T. 17 – № 5 – 1005–13c.
75. Boscolo E. Beta amyloid angiogenic activity in vitro and in vivo. / E. Boscolo, M. Folin, B. Nico, C. Grandi, D. Mangieri, V. Longo, R. Scienza, P. Zampieri, M. T. Conconi, P. P. Parnigotto, D. Ribatti // *Int. J. Mol. Med.* – 2007. – T. 19 – № 4 – 581–7c.

76. Bossers K. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. / K. Bossers, K. T. S. Wirz, G. F. Meerhoff, A. H. W. Essing, J. W. van Dongen, P. Houba, C. G. Kruse, J. Verhaagen, D. F. Swaab // *Brain* – 2010. – T. 133 – № Pt 12 – 3699–723c.
77. Bowes Rickman C. Dry Age-Related Macular Degeneration: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Imaging / C. Bowes Rickman, S. Farsiu, C. A. Toth, M. Klingeborn // *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* – 2013. – T. 54 – № 14 – ORSF68c.
78. Bowles K.R. Kinase signalling in Huntington's disease. / K. R. Bowles, L. Jones // *J. Huntingtons. Dis.* – 2014. – T. 3 – № 2 – 89–123c.
79. Braak H. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. / H. Braak, E. Braak // *Acta Neuropathol.* – 1991. – T. 82 – № 4 – 239–59c.
80. Braak H. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. / H. Braak, E. Braak // *J. Neural Transm. Suppl.* – 1998. – T. 53 – 127–40c.
81. Brehmer Y. Plasticity of brain and cognition in older adults. / Y. Brehmer, G. Kalpouzos, E. Wenger, M. Lövdén // *Psychol. Res.* – 2014. – T. 78 – № 6 – 790–802c.
82. Brennan L.A. Mitochondrial function and redox control in the aging eye: role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations. / L. A. Brennan, M. Kantorow // *Exp. Eye Res.* – 2009. – T. 88 – № 2 – 195–203c.
83. Bressler S.B. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. / S. B. Bressler, B. Muñoz, S. D. Solomon, S. K. West // *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* – 2008. – T. 126 – № 2 – 241–5c.
84. Brini M. Calcium in health and disease. / M. Brini, D. Ottolini, T. Calì, E. Carafoli // *Met. Ions Life Sci.* – 2013. – T. 13 – 81–137c.
85. Brión M. Genetic association study of age-related macular degeneration in the Spanish population. / M. Brión, M. Sanchez-Salorio, M. Cortón, M. de la Fuente, B. Pazos, M. Othman, A. Swaroop, G. Abecasis, B. Sobrino, A. Carracedo // *Acta Ophthalmol.* – 2011. – T. 89 – № 1 – e12–22c.
86. Bruban J. Amyloid-beta(1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells. / J. Bruban, A.-L. Glotin, V. Dinet, N. Chalour, F. Sennlaub, L. Jonet, N. An, A. M. Faussat, F. Mascarelli // *Aging Cell* – 2009. – T. 8 – № 2 – 162–77c.
87. Bruun G.H. A synonymous polymorphic variation in ACADM exon 11 affects splicing efficiency and may affect fatty acid oxidation. / G. H. Bruun, T. K. Doktor, B. S. Andresen // *Mol. Genet. Metab.* – T. 110 – № 1-2 – 122–8c.



88. Bryda E.C. Multiplex microsatellite marker panels for genetic monitoring of common rat strains. / E. C. Bryda, L. K. Riley // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2008. – T. 47 – № 3 – 37–41c.
89. Buermans H.P.J. Next generation sequencing technology: Advances and applications. / H. P. J. Buermans, J. T. den Dunnen // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – T. 1842 – № 10 – 1932–1941c.
90. Buil A. Gene-gene and gene-environment interactions detected by transcriptome sequence analysis in twins. / A. Buil, A. A. Brown, T. Lappalainen, A. Viñuela, M. N. Davies, H.-F. Zheng, J. B. Richards, D. Glass, K. S. Small, R. Durbin, T. D. Spector, E. T. Dermitzakis // *Nat. Genet.* – 2015. – T. 47 – № 1 – 88–91c.
91. Butterfield D.A. Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. / D. A. Butterfield, D. Boyd-Kimball // *Brain Pathol.* – 2004. – T. 14 – № 4 – 426–32c.
92. Cabezas-Opazo F.A. Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. / F. A. Cabezas-Opazo, K. Vergara-Pulgar, M. J. Pérez, C. Jara, C. Osorio-Fuentealba, R. A. Quintanilla // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – T. 2015 – 509654c.
93. Cai D. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- $\kappa$ B. / D. Cai, T. Liu // *Aging (Albany, NY)*. – 2012. – T. 4 – № 2 – 98–115c.
94. Calignon A. de Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. / A. de Calignon, M. Polydoro, M. Suárez-Calvet, C. William, D. H. Adamowicz, K. J. Kopeikina, R. Pitstick, N. Sahara, K. H. Ashe, G. A. Carlson, T. L. Spires-Jones, B. T. Hyman // *Neuron* – 2012. – T. 73 – № 4 – 685–97c.
95. Calkins M.J. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. / M. J. Calkins, M. Manczak, P. Mao, U. Shirendeb, P. H. Reddy // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – T. 20 – № 23 – 4515–29c.
96. Cameron B. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. / B. Cameron, G. E. Landreth // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – T. 37 – № 3 – 503–9c.
97. Canter J.A. Mitochondrial DNA polymorphism A4917G is independently associated with age-related macular degeneration. / J. A. Canter, L. M. Olson, K. Spencer, N. Schnetz-Boutaud, B. Anderson, M. A. Hauser, S. Schmidt, E. A. Postel, A. Agarwal, M. A. Pericak-Vance, P. Sternberg, J. L. Haines // *PLoS One* – 2008. – T. 3 – № 5 – e2091c.
98. Caraci F. Dysfunction of TGF- $\beta$ 1 signaling in Alzheimer's disease: perspectives for neuroprotection. / F. Caraci, S. Spampinato, M. A. Sortino, P. Bosco, G. Battaglia, V. Bruno, F. Drago, F. Nicoletti, A. Copani // *Cell Tissue Res.* – 2012. – T. 347 – № 1 – 291–301c.

99. Carmeli C. Demyelination in mild cognitive impairment suggests progression path to Alzheimer's disease. / C. Carmeli, A. Donati, V. Antille, D. Viceic, J. Ghika, A. von Gunten, S. Clarke, R. Meuli, R. S. Frackowiak, M. G. Knyazeva // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 8 – e72759c.
100. Carter T.A. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice. / T. A. Carter, J. A. Greenhall, S. Yoshida, S. Fuchs, R. Helton, A. Swaroop, D. J. Lockhart, C. Barlow // *Genome Biol.* – 2005. – T. 6 – № 6 – R48c.
101. Capsoni S. SorLA deficiency dissects amyloid pathology from tau and cholinergic neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease / S. Capsoni, A. S. Carlo, D. Vignone, G. Amato, C. Criscuolo, T. E. Willnow, A. Cattaneo // *J Alzheimers Dis.* – 2013. – 33. – P. 357–371.
102. Casserly I. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. / I. Casserly, E. Topol // *Lancet (London, England)* – 2004. – T. 363 – № 9415 – 1139–46c.
103. Cavallucci V. Emerging role of mitochondria dysfunction in the onset of neurodegenerative diseases. / V. Cavallucci, A. Nobili, M. D'Amelio // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* – T. 27 – № 2 Suppl – 1–9c.
104. Celardo I. Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease. / I. Celardo, L. M. Martins, S. Gandhi // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – T. 171 – № 8 – 1943–57c.
105. Chaarani B. Estimation of the lateral ventricles volumes from a 2D image and its relationship with cerebrospinal fluid flow. / B. Chaarani, C. Bader, C. Capel, C. Cyrille, J. Zmudka, Z. Jadwiga, J. Daouk, D. Joel, A. Fichten, C. Gondry-Jouet, G.-J. Catherine, R. Bouzerar, B. Roger, O. Balédent, B. Olivier // *Biomed Res. Int.* – 2013. – T. 2013 – 215989c.
106. Chadwick L. Review: unchained maladie - a reassessment of the role of Ubb(+1) - capped polyubiquitin chains in Alzheimer's disease. / L. Chadwick, L. Gentle, J. Strachan, R. Layfield // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2012. – T. 38 – № 2 – 118–31c.
107. Chakravarthy U. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. / U. Chakravarthy, T. Y. Wong, A. Fletcher, E. Piau, C. Evans, G. Zlateva, R. Buggage, A. Pleil, P. Mitchell // *BMC Ophthalmol.* – 2010. – T. 10 – 31c.
108. Chang K.-H. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. / K.-H. Chang, Y. de Pablo, H. Lee, H. Lee, M. A. Smith, K. Shah // *J. Neurochem.* – 2010. – T. 113 – № 5 – 1221–9c.
109. Charbel Issa P. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application. / P.

- Charbel Issa, N. V. Chong, H. P. N. Scholl // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2011. – T. 249 – № 2 – 163–74c.
110. Chaum E. Genomic regulation of senescence and innate immunity signaling in the retinal pigment epithelium. / E. Chaum, C. S. Winborn, S. Bhattacharya // *Mamm. Genome* – 2015. – T. 26 – № 5-6 – 210–21c.
111. Chen M. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. / M. Chen, J. V Forrester, H. Xu // *Exp. Eye Res.* – 2007. – T. 84 – № 4 – 635–45c.
112. Chen M. Immune activation in retinal aging: a gene expression study. / M. Chen, E. Muckersie, J. V Forrester, H. Xu // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – T. 51 – № 11 – 5888–96c.
113. Chen Q. Transcriptome sequencing reveals the roles of transcription factors in modulating genotype by nitrogen interaction in maize. / Q. Chen, Z. Liu, B. Wang, X. Wang, J. Lai, F. Tian // *Plant Cell Rep.* – 2015.
114. Chen S. Age-related changes in brain metabolites and cognitive function in APP/PS1 transgenic mice. / S. Chen, Q. Cai, Y. Shen, P. Wang, G. Teng, W. Zhang, F. Zang // *Behav. Brain Res.* – 2012. – T. 235 – № 1 – 1–6c.
115. Chen W. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. / W. Chen, D. Stambolian, A. O. Edwards, K. E. Branham, M. Othman, J. Jakobsdottir, N. Tosakulwong, M. A. Pericak-Vance, P. A. Campochiaro, M. L. Klein, P. L. Tan, Y. P. Conley, A. Kanda, L. Kopplin, Y. Li, K. J. Augustaitis, A. J. Karoukis, W. K. Scott, A. Agarwal, J. L. Kovach, S. G. Schwartz, E. A. Postel, M. Brooks, K. H. Baratz, W. L. Brown, A. J. Brucker, A. Orlin, G. Brown, A. Ho, C. Regillo, L. Donoso, L. Tian, B. Kaderli, D. Hadley, S. A. Hagstrom, N. S. Peachey, R. Klein, B. E. K. Klein, N. Gotoh, K. Yamashiro, F. Ferris Iii, J. A. Fagerness, R. Reynolds, L. A. Farrer, I. K. Kim, J. W. Miller, M. Cortón, A. Carracedo, M. Sanchez-Salorio, E. W. Pugh, K. F. Doheny, M. Brion, M. M. Deangelis, D. E. Weeks, D. J. Zack, E. Y. Chew, J. R. Heckenlively, N. Yoshimura, S. K. Iyengar, P. J. Francis, N. Katsanis, J. M. Seddon, J. L. Haines, M. B. Gorin, G. R. Abecasis, A. Swaroop // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – T. 107 – № 16 – 7401–6c.
116. Chen X. The ortholog conjecture is untestable by the current gene ontology but is supported by RNA sequencing data. / X. Chen, J. Zhang // *PLoS Comput. Biol.* – 2012. – T. 8 – № 11 – e1002784c.

117. Cheng X. The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. / X. Cheng, W. Zhou, Y. Zhang // *Ageing Res. Rev.* – 2014. – T. 13 – 13–37c.
118. Chételat G. Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease. / G. Chételat, R. La Joie, N. Villain, A. Perrotin, V. de La Sayette, F. Eustache, R. Vandenberghe // *NeuroImage. Clin.* – 2013. – T. 2 – 356–65c.
119. Cheung V.G. Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. / V. G. Cheung, R. S. Spielman, K. G. Ewens, T. M. Weber, M. Morley, J. T. Burdick // *Nature* – 2005. – T. 437 – № 7063 – 1365–9c.
120. Chiu K. Neurodegeneration of the retina in mouse models of Alzheimer's disease: what can we learn from the retina? / K. Chiu, T.-F. Chan, A. Wu, I. Y.-P. Leung, K.-F. So, R. C.-C. Chang // *Age (Dordr.)*. – 2012. – T. 34 – № 3 – 633–49c.
121. Choi S.H. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease / S. H. Choi, Y. H. Kim, M. Hebisch, C. Sliwinski, S. Lee, C. D'Avanzo, H. Chen, B. Hooli, C. Asselin, J. Muffat, J. B. Klee, C. Zhang, B. J. Wainger, M. Peitz, D. M. Kovacs, C. J. Woolf, S. L. Wagner, R. E. Tanzi, D. Y. Kim // *Nature* – 2014.
122. Chouraki V. Genetics of Alzheimer's disease. / V. Chouraki, S. Seshadri // *Adv. Genet.* – 2014. – T. 87 – 245–94c.
123. Christen W.G. Low-dose aspirin and medical record-confirmed age-related macular degeneration in a randomized trial of women. / W. G. Christen, R. J. Glynn, E. Y. Chew, J. E. Buring // *Ophthalmology* – 2009. – T. 116 – № 12 – 2386–92c.
124. Chung W.-H. Genetic variants associated with phenytoin-related severe cutaneous adverse reactions. / W.-H. Chung, W.-C. Chang, Y.-S. Lee, Y.-Y. Wu, C.-H. Yang, H.-C. Ho, M.-J. Chen, J.-Y. Lin, R. C.-Y. Hui, J.-C. Ho, W.-M. Wu, T.-J. Chen, T. Wu, Y.-R. Wu, M.-S. Hsih, P.-H. Tu, C.-N. Chang, C.-N. Hsu, T.-L. Wu, S.-E. Choon, C.-K. Hsu, D.-Y. Chen, C.-S. Liu, C.-Y. Lin, N. Kaniwa, Y. Saito, Y. Takahashi, R. Nakamura, H. Azukizawa, Y. Shi, T.-H. Wang, S.-S. Chuang, S.-F. Tsai, C.-J. Chang, Y.-S. Chang, S.-I. Hung // *JAMA* – 2014. – T. 312 – № 5 – 525–34c.
125. Cirulli E.T. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. / E. T. Cirulli, D. B. Goldstein // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – T. 11 – № 6 – 415–25c.
126. Clark E.A. Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases / E. A. Clark // *J. Cell Biol.* – 1998. – T. 142 – № 2 – 573–586c.
127. Clark J.S. Quantitative trait loci in genetically hypertensive rats. Possible sex specificity. / J. S. Clark, B. Jeffs, A. O. Davidson, W. K. Lee, N. H. Anderson, M. T. Bihoreau,

- M. J. Brosnan, A. M. Devlin, A. W. Kelman, K. Lindpaintner, A. F. Dominiczak // *Hypertension* – 1996. – T. 28 – № 5 – 898–906c.
128. Clark T.A. Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease. / T. A. Clark, H. P. Lee, R. K. Rolston, X. Zhu, M. W. Marlatt, R. J. Castellani, A. Nunomura, G. Casadesus, M. A. Smith, H.-G. Lee, G. Perry // *Int. J. Biomed. Sci.* – 2010. – T. 6 – № 3 – 225–227c.
129. Clemons T.E. Cognitive impairment in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS report no. 16. / T. E. Clemons, M. W. Rankin, W. L. McBee // *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* – 2006. – T. 124 – № 4 – 537–43c.
130. Cloutier A. Inflammatory Cytokine Production by Human Neutrophils Involves C/EBP Transcription Factors / A. Cloutier, C. Guindi, P. Larivee, C. M. Dubois, A. Amrani, P. P. McDonald // *J. Immunol.* – 2008. – T. 182 – № 1 – 563–571c.
131. Codina-Solà M. Integrated analysis of whole-exome sequencing and transcriptome profiling in males with autism spectrum disorders. / M. Codina-Solà, B. Rodríguez-Santiago, A. Homs, J. Santoyo, M. Rigau, G. Aznar-Laín, M. Del Campo, B. Gener, E. Gabau, M. P. Botella, A. Gutiérrez-Arumí, G. Antiñolo, L. A. Pérez-Jurado, I. Cuscó // *Mol. Autism* – 2015. – T. 6 – 21c.
132. Collins F.S. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. / F. S. Collins // *Nat. Genet.* – 1992. – T. 1 – № 1 – 3–6c.
133. Combadière C. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. / C. Combadière, C. Feumi, W. Raoul, N. Keller, M. Rodéro, A. Pézard, S. Lavalette, M. Houssier, L. Jonet, E. Picard, P. Debré, M. Sirinyan, P. Deterre, T. Ferroukhi, S.-Y. Cohen, D. Chauvaud, J.-C. Jeanny, S. Chemtob, F. Behar-Cohen, F. Sennlaub // *J. Clin. Invest.* – 2007. – T. 117 – № 10 – 2920–8c.
134. Cook M.N. Identification of candidate genes that underlie the QTL on chromosome 1 that mediates genetic differences in stress-ethanol interactions. / M. N. Cook, J. A. Baker, S. A. Heldt, R. W. Williams, K. M. Hamre, L. Lu // *Physiol. Genomics* – 2015. – T. 47 – № 8 – 308–17c.
135. Cooper C. Ig/EBP (C/EBP $\gamma$ ) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators / C. Cooper, A. Henderson, S. Artandi, N. Avitahl, K. Calame // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – T. 23 – № 21 – 4371–4377c.
136. Corder E.H. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. / E. H. Corder, A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance // *Science* – 1993. – T. 261 – № 5123 – 921–3c.

137. Costa V. RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. / V. Costa, M. Aprile, R. Esposito, A. Ciccodicola // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2013. – T. 21 – № 2 – 134–42c.
138. Crabb J.W. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. / J. W. Crabb, M. Miyagi, X. Gu, K. Shadrach, K. A. West, H. Sakaguchi, M. Kamei, A. Hasan, L. Yan, M. E. Rayborn, R. G. Salomon, J. G. Hollyfield // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – T. 99 – № 23 – 14682–7c.
139. Crepaldi L. Binding of TFIIC to sine elements controls the relocation of activity-dependent neuronal genes to transcription factories. / L. Crepaldi, C. Policarpi, A. Coatti, W. T. Sherlock, B. C. Jongbloets, T. A. Down, A. Riccio // *PLoS Genet.* – 2013. – T. 9 – № 8 – e1003699c.
140. Crespo I. Gene regulatory network analysis supports inflammation as a key neurodegeneration process in prion disease. / I. Crespo, K. Roomp, W. Jurkowski, H. Kitano, A. del Sol // *BMC Syst. Biol.* – 2012. – T. 6 – 132c.
141. Croft D. The Reactome pathway knowledgebase. / D. Croft, A. F. Mundo, R. Haw, M. Milacic, J. Weiser, G. Wu, M. Caudy, P. Garapati, M. Gillespie, M. R. Kamdar, B. Jassal, S. Jupe, L. Matthews, B. May, S. Palatnik, K. Rothfels, V. Shamovsky, H. Song, M. Williams, E. Birney, H. Hermjakob, L. Stein, P. D'Eustachio // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – T. 42 – № Database issue – D472–7c.
142. Cronin-Golomb A. Visual dysfunction in Alzheimer's disease: relation to normal aging. / A. Cronin-Golomb, S. Corkin, J. F. Rizzo, J. Cohen, J. H. Growdon, K. S. Banks // *Ann. Neurol.* – 1991. – T. 29 – № 1 – 41–52c.
143. Cruchaga C. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. / C. Cruchaga, C. M. Karch, S. C. Jin, B. A. Benitez, Y. Cai, R. Guerreiro, O. Harari, J. Norton, J. Budde, S. Bertelsen, A. T. Jeng, B. Cooper, T. Skorupa, D. Carrell, D. Levitch, S. Hsu, J. Choi, M. Ryten, J. Hardy, D. Trabzuni, M. E. Weale, A. Ramasamy, C. Smith, C. Sassi, J. Bras, J. R. Gibbs, D. G. Hernandez, M. K. Lupton, J. Powell, P. Forabosco, P. G. Ridge, C. D. Corcoran, J. T. Tschanz, M. C. Norton, R. G. Munger, C. Schmutz, M. Leary, F. Y. Demirci, M. N. Bamne, X. Wang, O. L. Lopez, M. Ganguli, C. Medway, J. Turton, J. Lord, A. Braae, I. Barber, K. Brown, P. Passmore, D. Craig, J. Johnston, B. McGuinness, S. Todd, R. Heun, H. Kölsch, P. G. Kehoe, N. M. Hooper, E. R. L. C. Vardy, D. M. Mann, S. Pickering-Brown, N. Kalsheker, J. Lowe, K. Morgan, A. David Smith, G. Wilcock, D. Warden, C. Holmes, P. Pastor, O. Lorenzo-Betancor, Z. Brkanac, E. Scott, E. Topol, E. Rogaeva, A. B. Singleton, M. I. Kamboh, P. St George-Hyslop, N. Cairns, J. C. Morris, J. S. K. Kauwe, A. M. Goate // *Nature* – 2014. – T. 505 – № 7484 – 550–4c.

144. Cruchaga C. GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease / C. Cruchaga, J. S. Kauwe, O. Harari, S. C. Jin, Y. Cai, C. M. Karch, B. A. Benitez, et al. // *Neuron*. – 2013. – 78. – P. 256–268.
145. Crusio W.E. Covariations between hippocampal mossy fibres and working and reference memory in spatial and non-spatial radial maze tasks in mice. / W. E. Crusio, H. Schwegler, I. Brust // *Eur. J. Neurosci.* – 1993. – T. 5 – № 10 – 1413–20c.
146. Cruts M. // Alzheimer disease and frontotemporal dementia mutation database [Электронный ресурс]. URL: <http://www.molgen.ua.ac.be/admutations/>.
147. Cruz e Silva O.A.B. da Wnt signalling is a relevant pathway contributing to amyloid beta-peptide-mediated neuropathology in Alzheimer's disease. / O. A. B. da Cruz e Silva, A. G. Henriques, S. C. T. S. Domingues, E. F. da Cruz e Silva // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2010. – T. 9 – № 6 – 720–6c.
148. Curcio C.A. The oil spill in ageing Bruch membrane. / C. A. Curcio, M. Johnson, M. Rudolf, J.-D. Huang // *Br. J. Ophthalmol.* – 2011. – T. 95 – № 12 – 1638–45c.
149. Curtis R.K. Pathways to the analysis of microarray data. / R. K. Curtis, M. Oresic, A. Vidal-Puig // *Trends Biotechnol.* – 2005. – T. 23 – № 8 – 429–35c.
150. Damiani D. Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. / D. Damiani, J. J. Alexander, J. R. O'Rourke, M. McManus, A. P. Jadhav, C. L. Cepko, W. W. Hauswirth, B. D. Harfe, E. Strettoi // *J. Neurosci.* – 2008. – T. 28 – № 19 – 4878–87c.
151. Damico F.M. New approaches and potential treatments for dry age-related macular degeneration. / F. M. Damico, F. Gasparin, M. R. Scolari, L. S. Pedral, B. S. Takahashi // *Arq. Bras. Oftalmol.* – T. 75 – № 1 – 71–6c.
152. Darvesh A.S. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. / A. S. Darvesh, R. T. Carroll, A. Bishayee, W. J. Geldenhuys, C. J. Van der Schyf // *Expert Rev. Neurother.* – 2010. – T. 10 – № 5 – 729–45c.
153. Das P. Dysfunction of TGF-beta signaling in Alzheimer's disease. / P. Das, T. Golde // *J. Clin. Invest.* – 2006. – T. 116 – № 11 – 2855–7c.
154. Davis M.D. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. / M. D. Davis, R. E. Gangnon, L.-Y. Lee, L. D. Hubbard, B. E. Klein, R. Klein, F. L. Ferris, S. B. Bressler, R. C. Milton // *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) – 2005. – T. 123 – № 11 – 1484–98c.
155. De A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. / A. De // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). – 2011. – T. 43 – № 10 – 745–56c.

156. Dellu F. Reactivity to novelty during youth as a predictive factor of cognitive impairment in the elderly: a longitudinal study in rats. / F. Dellu, W. Mayo, M. Vallée, M. Le Moal, H. Simon // *Brain Res.* – 1994. – T. 653 – № 1-2 – 51–6c.
157. Deng A.Y. Sexual dimorphism on hypertension of quantitative trait loci entrapped in Dahl congenic rats. / A. Y. Deng, A. Ménard, C. Xiao, J. Roy // *Clin. Exp. Hypertens.* – 2008. – T. 30 – № 7 – 511–9c.
158. Dennis G. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. / G. Dennis, B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, R. A. Lempicki // *Genome Biol.* – 2003. – T. 4 – № 5 – P3c.
159. Deo M. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. / M. Deo, J.-Y. Yu, K.-H. Chung, M. Tippens, D. L. Turner // *Dev. Dyn.* – 2006. – T. 235 – № 9 – 2538–48c.
160. Desai B.S. Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. / B. S. Desai, J. A. Schneider, J.-L. Li, P. M. Carvey, B. Hendey // *J. Neural Transm.* – 2009. – T. 116 – № 5 – 587–97c.
161. Dewachter I. Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. / I. Dewachter, J. van Dorpe, K. Spittaels, I. Tesseur, C. Van Den Haute, D. Moechars, F. Van Leuven // *Exp. Gerontol.* – 2000. – T. 35 – № 6-7 – 831–41c.
162. Dickstein D.L. Changes in the structural complexity of the aged brain. / D. L. Dickstein, D. Kabaso, A. B. Rocher, J. I. Luebke, S. L. Wearne, P. R. Hof // *Aging Cell* – 2007. – T. 6 – № 3 – 275–84c.
163. Dijk E.L. van Ten years of next-generation sequencing technology. / E. L. van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn, C. Thermes // *Trends Genet.* – 2014. – T. 30 – № 9 – 418–26c.
164. Dijk E.L. van Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. / E. L. van Dijk, Y. Jaszczyszyn, C. Thermes // *Exp. Cell Res.* – 2014. – T. 322 – № 1 – 12–20c.
165. Dincheva I. Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics. / I. Dincheva, C. E. Glatt, F. S. Lee // *Neuroscientist* – 2012. – T. 18 – № 5 – 439–51c.
166. Ding J.-D. Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related macular degeneration. / J.-D. Ding, L. V Johnson, R. Herrmann, S. Farsiu, S. G. Smith, M. Groelle, B. E. Mace, P. Sullivan, J. A. Jamison, U. Kelly, O. Harrabi, S. S. Bollini, J. Dilley, D. Kobayashi, B. Kuang, W. Li, J. Pons, J. C. Lin, C. Bowes Rickman // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – T. 108 – № 28 – E279–87c.



167. Ding J.-D. Targeting age-related macular degeneration with Alzheimer's disease based immunotherapies: anti-amyloid-beta antibody attenuates pathologies in an age-related macular degeneration mouse model. / J.-D. Ding, J. Lin, B. E. Mace, R. Herrmann, P. Sullivan, C. Bowes Rickman // *Vision Res.* – 2008. – T. 48 – № 3 – 339–45c.
168. Doncheva N.T. Recent approaches to the prioritization of candidate disease genes. / N. T. Doncheva, T. Kacprowski, M. Albrecht // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – T. 4 – № 5 – 429–42c.
169. Dong Z. Transcriptomics: advances and approaches. / Z. Dong, Y. Chen // *Sci. China. Life Sci.* – 2013. – T. 56 – № 10 – 960–7c.
170. Drake T.A. Integrating genetic and gene expression data: application to cardiovascular and metabolic traits in mice. / T. A. Drake, E. E. Schadt, A. J. Lusis // *Mamm. Genome* – 2006. – T. 17 – № 6 – 466–79c.
171. Du H. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. / H. Du, S. S. Yan // *Biochim. Biophys. Acta* – 2010. – T. 1802 – № 1 – 198–204c.
172. Duara R. Alzheimer's disease: interaction of apolipoprotein E genotype, family history of dementia, gender, education, ethnicity, and age of onset. / R. Duara, W. W. Barker, R. Lopez-Alberola, D. A. Loewenstein, L. B. Grau, D. Gilchrist, S. Sevush, S. St George-Hyslop // *Neurology* – 1996. – T. 46 – № 6 – 1575–9c.
173. Duffy T.E. Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. / T. E. Duffy, S. J. Kohle, R. C. Vannucci // *J. Neurochem.* – 1975. – T. 24 – № 2 – 271–6c.
174. Eckert A. Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. / A. Eckert, S. Hauptmann, I. Scherping, J. Meinhardt, V. Rhein, S. Dröse, U. Brandt, M. Fändrich, W. E. Müller, J. Götz // *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2008. – T. 86 – № 11 – 1255–67c.
175. Edwards A.O. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. / A. O. Edwards, R. Ritter, K. J. Abel, A. Manning, C. Panhuysen, L. A. Farrer // *Science* – 2005. – T. 308 – № 5720 – 421–4c.
176. Eichler E.E. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. / E. E. Eichler, J. Flint, G. Gibson, A. Kong, S. M. Leal, J. H. Moore, J. H. Nadeau // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – T. 11 – № 6 – 446–50c.
177. Elias-Sonnenschein L. S. Relationship between genetic risk factors and markers for Alzheimer's disease pathology / L. S. Elias-Sonnenschein, L. Bertram, P. J. Visser // *Biomark Med.* – 2012. – 6. – P. 477–495.

178. Emilsson L. Alzheimer's disease: mRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling. / L. Emilsson, P. Saetre, E. Jazin // *Neurobiol. Dis.* – 2006. – T. 21 – № 3 – 618–25c.
179. Falconer D.S. The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives / D. S. Falconer // *Ann. Hum. Genet.* – 1965. – T. 29 – 51–76c.
180. Fang D. Increased neuronal PreP activity reduces A $\beta$  accumulation, attenuates neuroinflammation and improves mitochondrial and synaptic function in Alzheimer disease's mouse model. / D. Fang, Y. Wang, Z. Zhang, H. Du, S. Yan, Q. Sun, C. Zhong, L. Wu, J. R. Vangavaragu, S. Yan, G. Hu, L. Guo, M. Rabinowitz, E. Glaser, O. Arancio, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, J. X. Chen, S. S. Yan // *Hum. Mol. Genet.* – 2015.
181. Fang F. Familial aggregation of amyotrophic lateral sclerosis. / F. Fang, F. Kamel, P. Lichtenstein, R. Bellocco, P. Sparén, D. P. Sandler, W. Ye // *Ann. Neurol.* – 2009. – T. 66 – № 1 – 94–9c.
182. Farnebo M. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. / M. Farnebo, V. J. N. Bykov, K. G. Wiman // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – T. 396 – № 1 – 85–9c.
183. Felsenstein J. A mathematically tractable family of genetic mapping functions with different amounts of interference / J. Felsenstein // *Genetics.* – 1979. – Apr; 91(4), – P. 769–75.
184. Ferrer I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. / I. Ferrer // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2009. – T. 41 – № 5 – 425–31c.
185. File S.E. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? / S. E. File, H. Zangrossi, M. Viana, F. G. Graeff // *Psychopharmacology (Berl.)*. – 1993. – T. 111 – № 4 – 491–4c.
186. Finan G.M. BACE1 retrograde trafficking is uniquely regulated by the cytoplasmic domain of sortilin. / G. M. Finan, H. Okada, T.-W. Kim // *J. Biol. Chem.* – 2011. – T. 286 – № 14 – 12602–16c.
187. Finotello F. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. / F. Finotello, B. Di Camillo // *Brief. Funct. Genomics* – 2015. – T. 14 – № 2 – 130–42c.
188. Fonseca M.I. Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. / M. I. Fonseca, J. Zhou, M. Botto, A. J. Tenner // *J. Neurosci.* – 2004. – T. 24 – № 29 – 6457–65c.
189. Fonseca N.A. RNA-Seq gene profiling--a systematic empirical comparison. / N. A. Fonseca, J. Marioni, A. Brazma // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 9 – e107026c.

190. Franceschini N. Mapping of a blood pressure QTL on chromosome 17 in American Indians of the strong heart family study. / N. Franceschini, R. Tao, L. Liu, S. Rutherford, K. Haack, L. Almasy, H. H. Göring, S. Laston, E. T. Lee, L. G. Best, R. Fabsitz, S. A. Cole, K. E. North // *BMC Cardiovasc. Disord.* – 2014. – T. 14 – 158c.
191. Frey K.G. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. / K. G. Frey, J. E. Herrera-Galeano, C. L. Redden, T. V. Luu, S. L. Servetas, A. J. Mateczun, V. P. Mokashi, K. A. Bishop-Lilly // *BMC Genomics* – 2014. – T. 15 – 96c.
192. Friberg T.R. Is drusen area really so important? An assessment of risk of conversion to neovascular AMD based on computerized measurements of drusen. / T. R. Friberg, R. A. Bilonick, P. Brennen // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – T. 53 – № 4 – 1742–51c.
193. Friedlander R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. / R. M. Friedlander // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – T. 348 – № 14 – 1365–75c.
194. Friedman J.E. Major differences in Ca<sup>2+</sup> response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>. / J. E. Friedman, G. G. Haddad // *J. Neurosci.* – 1993. – T. 13 – № 1 – 63–72c.
195. Frisoni G.B. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. / G. B. Frisoni, N. C. Fox, C. R. Jack, P. Scheltens, P. M. Thompson // *Nat. Rev. Neurol.* – 2010. – T. 6 – № 2 – 67–77c.
196. Fritsche L.G. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. / L. G. Fritsche, W. Chen, M. Schu, B. L. Yaspan, Y. Yu, G. Thorleifsson, D. J. Zack, S. Arakawa, V. Cipriani, S. Ripke, R. P. Igo, G. H. S. Buitendijk, X. Sim, D. E. Weeks, R. H. Guymer, J. E. Merriam, P. J. Francis, G. Hannum, A. Agarwal, A. M. Ambrecht, I. Audo, T. Aung, G. R. Barile, M. Benchaboune, A. C. Bird, P. N. Bishop, K. E. Branham, M. Brooks, A. J. Brucker, W. H. Cade, M. S. Cain, P. A. Campochiaro, C.-C. Chan, C.-Y. Cheng, E. Y. Chew, K. A. Chin, I. Chowers, D. G. Clayton, R. Cojocaru, Y. P. Conley, B. K. Cornes, M. J. Daly, B. Dhillon, A. O. Edwards, E. Evangelou, J. Fagerness, H. A. Ferreyra, J. S. Friedman, A. Geirsdottir, R. J. George, C. Gieger, N. Gupta, S. A. Hagstrom, S. P. Harding, C. Haritoglou, J. R. Heckenlively, F. G. Holz, G. Hughes, J. P. A. Ioannidis, T. Ishibashi, P. Joseph, G. Jun, Y. Kamatani, N. Katsanis, C. N. Keilhauer, J. C. Khan, I. K. Kim, Y. Kiyohara, B. E. K. Klein, R. Klein, J. L. Kovach, I. Kozak, C. J. Lee, K. E. Lee, P. Lichtner, A. J. Lotery, T. Meitinger, P. Mitchell, S. Mohand-Saïd, A. T. Moore, D. J. Morgan, M. A. Morrison, C. E. Myers, A. C. Naj, Y. Nakamura, Y. Okada, A. Orlin, M. C. Ortube, M. I. Othman, C. Pappas, K. H. Park, G. J. T. Pauer, N. S. Peachey, O. Poch, R. R. Priya, R. Reynolds, A. J. Richardson, R. Ripp, G. Rudolph, E. Ryu, J.-A. Sahel, D. A. Schaumberg, H. P. N. Scholl, S. G. Schwartz, W. K. Scott,

- H. Shahid, H. Sigurdsson, G. Silvestri, T. A. Sivakumaran, R. T. Smith, L. Sobrin, E. H. Souied, D. E. Stambolian, H. Stefansson, G. M. Sturgill-Short, A. Takahashi, N. Tosakulwong, B. J. Truitt, E. E. Tsironi, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, L. Vijaya, J. R. Vingerling, E. N. Vithana, A. R. Webster, H.-E. Wichmann, T. W. Winkler, T. Y. Wong, A. F. Wright, D. Zelenika, M. Zhang, L. Zhao, K. Zhang, M. L. Klein, G. S. Hageman, G. M. Lathrop, K. Stefansson, R. Allikmets, P. N. Baird, M. B. Gorin, J. J. Wang, C. C. W. Klaver, J. M. Seddon, M. A. Pericak-Vance, S. K. Iyengar, J. R. W. Yates, A. Swaroop, B. H. F. Weber, M. Kubo, M. M. Deangelis, T. Léveillard, U. Thorsteinsdottir, J. L. Haines, L. A. Farrer, I. M. Heid, G. R. Abecasis // *Nat. Genet.* – 2013. – T. 45 – № 4 – 433–9, 439e1–2c.
197. Frussa-Filho R. Effect of age on antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure. / R. Frussa-Filho, J. R. Otoboni, A. D. Giannotti, A. C. Amaral, I. M. Conceição // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1992. – T. 25 – № 8 – 827–9c.
198. Fu W. Genetic architecture of quantitative traits and complex diseases. / W. Fu, T. D. O'Connor, J. M. Akey // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2013. – T. 23 – № 6 – 678–83c.
199. Fu W. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. / W. Fu, T. D. O'Connor, G. Jun, H. M. Kang, G. Abecasis, S. M. Leal, S. Gabriel, M. J. Rieder, D. Altshuler, J. Shendure, D. A. Nickerson, M. J. Bamshad, J. M. Akey // *Nature* – 2013. – T. 493 – № 7431 – 216–20c.
200. Fur I. Le Association study of the CFH Y402H polymorphism with Alzheimer's disease. / I. Le Fur, G. Laumet, F. Richard, N. Fievet, C. Berr, O. Rouaud, C. Delcourt, P. Amouyel, J.-C. Lambert // *Neurobiol. Aging* – 2010. – T. 31 – № 1 – 165–6c.
201. Gambuzza M.E. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. / M. E. Gambuzza, V. Sofu, F. M. Salmeri, L. Soraci, S. Marino, P. Bramanti // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2014. – T. 13 – № 9 – 1542–58c.
202. Gao H.-M. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. / H.-M. Gao, P. T. Kotzbauer, K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee // *J. Neurosci.* – 2008. – T. 28 – № 30 – 7687–98c.
203. Gauguier D. A gene map of the rat derived from linkage analysis and related regions in the mouse and human genomes. / D. Gauguier, P. J. Kaisaki, M. Rouard, R. H. Wallis, J. Browne, J. P. Rapp, M. T. Bihoreau // *Mamm. Genome* – 1999. – T. 10 – № 7 – 675–86c.
204. Gehrs K.M. Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. / K. M. Gehrs, D. H. Anderson, L. V Johnson, G. S. Hageman // *Ann. Med.* – 2006. – T. 38 – № 7 – 450–71c.
205. Gemenetzi M. The role of epigenetics in age-related macular degeneration. / M. Gemenetzi, A. J. Lotery // *Eye (Lond)*. – 2014. – T. 28 – № 12 – 1407–17c.

206. Genin E. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance / E. Genin, D. Hannequin, D. Wallon, et al. // *Mol Psychiatry*. – 2011. – 16. – P. 903–907.
207. Gibson G. Hints of hidden heritability in GWAS. / G. Gibson // *Nat. Genet.* – 2010. – T. 42 – № 7 – 558–60c.
208. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. / G. Gibson // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – T. 13 – № 2 – 135–45c.
209. Giménez-Llort L. Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. / L. Giménez-Llort, G. Blázquez, T. Cañete, B. Johansson, S. Oddo, A. Tobeña, F. M. LaFerla, A. Fernández-Teruel // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2007. – T. 31 – № 1 – 125–47c.
210. Girard F. Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain. / F. Girard, S. Eichenberger, M. R. Celio // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2014. – T. 61 – 176–86c.
211. Glonek T. P-31 nuclear magnetic resonance analysis of brain: the perchloric acid extract spectrum. / T. Glonek, S. J. Kopp, E. Kot, J. W. Pettegrew, W. H. Harrison, M. M. Cohen // *J. Neurochem.* – 1982. – T. 39 – № 5 – 1210–9c.
212. Gold B. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. / B. Gold, J. E. Merriam, J. Zernant, L. S. Hancox, A. J. Taiber, K. Gehrs, K. Cramer, J. Neel, J. Bergeron, G. R. Barile, R. T. Smith, G. S. Hageman, M. Dean, R. Allikmets // *Nat. Genet.* – 2006. – T. 38 – № 4 – 458–62c.
213. Goldowitz D. Molecular pathways underpinning ethanol-induced neurodegeneration. / D. Goldowitz, A. A. Lussier, J. K. Boyle, K. Wong, S. L. Lattimer, C. Dubose, L. Lu, M. S. Kobor, K. M. Hamre // *Front. Genet.* – 2014. – T. 5 – 203c.
214. Gomez-Isla T. Neuropathology of Alzheimer's disease. / T. Gomez-Isla, T. Spires, A. De Calignon, B. T. Hyman // *Handb. Clin. Neurol.* – 2008. – T. 89 – 233–43c.
215. Gorin M.B. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. / M. B. Gorin // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – T. 33 – № 4 – 467–86c.
216. Goto K. Microsatellite-directed selection of breeders for the next backcross generation by using a minimal number of loci. / K. Goto, M. Ebukuro, T. Itoh // *Comp. Med.* – 2005. – T. 55 – № 1 – 34–6c.
217. Gottesman I.I. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. / I. I. Gottesman, T. D. Gould // *Am. J. Psychiatry* – 2003. – T. 160 – № 4 – 636–45c.

218. Gray T.A. An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins / T. A. Gray, S. Saitoh, R. D. Nicholls // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – T. 96 – № 10 – 5616–5621c.
219. Green D.R. Immunogenic and tolerogenic cell death. / D. R. Green, T. Ferguson, L. Zitvogel, G. Kroemer // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – T. 9 – № 5 – 353–63c.
220. Griffith R.M. Next-generation sequencing analysis of gene regulation in the rat model of retinopathy of prematurity. / R. M. Griffith, H. Li, N. Zhang, T. L. Favazza, A. B. Fulton, R. M. Hansen, J. D. Akula // *Doc. Ophthalmol.* – 2013. – T. 127 – № 1 – 13–31c.
221. Guerreiro R. TREM2 variants in Alzheimer's disease. / R. Guerreiro, A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J. S. K. Kauwe, S. Younkin, L. Hazrati, J. Collinge, J. Pocock, T. Lashley, J. Williams, J.-C. Lambert, P. Amouyel, A. Goate, R. Rademakers, K. Morgan, J. Powell, P. St George-Hyslop, A. Singleton, J. Hardy // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – T. 368 – № 2 – 117–27c.
222. Guglielmo M. Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. / M. Guglielmo, E. Tamagno, O. Danni // *ScientificWorldJournal.* – 2009. – T. 9 – 781–91c.
223. Guillot-Sestier M.-V. Innate immunity in Alzheimer's disease: a complex affair. / M.-V. Guillot-Sestier, T. Town // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2013. – T. 12 – № 5 – 593–607c.
224. Gulesserian T. Superoxide dismutase SOD1, encoded on chromosome 21, but not SOD2 is overexpressed in brains of patients with Down syndrome. / T. Gulesserian, R. Seidl, R. Hardmeier, N. Cairns, G. Lubec // *J. Investig. Med.* – 2001. – T. 49 – № 1 – 41–6c.
225. Gulinelli S. IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS/TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation. / S. Gulinelli, E. Salaro, M. Vuerich, D. Bozzato, C. Pizzirani, G. Bolognesi, M. Idzko, F. Di Virgilio, D. Ferrari // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – T. 42 – № 12 – 3334–45c.
226. Guney E. Exploiting protein-protein interaction networks for genome-wide disease-gene prioritization. / E. Guney, B. Oliva // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 9 – e43557c.
227. Güntert A. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. / A. Güntert, H. Döbeli, B. Bohrmann // *Neuroscience* – 2006. – T. 143 – № 2 – 461–75c.
228. Günther C. Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. / C. Günther, K. von Hadeln, T. Müller-Thomsen, A. Alberici, G. Binetti, C. Hock, R. M. Nitsch, G. Stoppe, J. Reiss, A. Gal, U. Finckh // *Neurosci. Lett.* – 2004. – T. 369 – № 3 – 219–23c.

229. Gutchess A. Plasticity of the aging brain: new directions in cognitive neuroscience. / A. Gutchess // *Science* – 2014. – T. 346 – № 6209 – 579–82c.
230. Hageman G.S. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. / G. S. Hageman, D. H. Anderson, L. V Johnson, L. S. Hancox, A. J. Taiber, L. I. Hardisty, J. L. Hageman, H. A. Stockman, J. D. Borchardt, K. M. Gehrs, R. J. H. Smith, G. Silvestri, S. R. Russell, C. C. W. Klaver, I. Barbazetto, S. Chang, L. A. Yannuzzi, G. R. Barile, J. C. Merriam, R. T. Smith, A. K. Olsh, J. Bergeron, J. Zernant, J. E. Merriam, B. Gold, M. Dean, R. Allikmets // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – T. 102 – № 20 – 7227–32c.
231. Haines J.L. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. / J. L. Haines, M. A. Hauser, S. Schmidt, W. K. Scott, L. M. Olson, P. Gallins, K. L. Spencer, S. Y. Kwan, M. Noureddine, J. R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A. Agarwal, E. A. Postel, M. A. Pericak-Vance // *Science* – 2005. – T. 308 – № 5720 – 419–21c.
232. Haj M. El Autobiographical memory decline in Alzheimer’s disease, a theoretical and clinical overview / M. El Haj, P. Antoine, J. L. Nandrino, D. Kapogiannis // *Ageing Res. Rev.* – 2015.
233. Hamza T.H. The heritability of risk and age at onset of Parkinson’s disease after accounting for known genetic risk factors. / T. H. Hamza, H. Payami // *J. Hum. Genet.* – 2010. – T. 55 – № 4 – 241–3c.
234. Handa J.T. How does the macula protect itself from oxidative stress? / J. T. Handa // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – T. 33 – № 4 – 418–35c.
235. Hansen K.D. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. / K. D. Hansen, S. E. Brenner, S. Dudoit // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – T. 38 – № 12 – e131c.
236. Hansson C.A. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma- secretase complexes in mitochondria / C. A. Hansson, S. Frykman, M. R. Farmery, et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – 279. – P. 51654–51660.
237. Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. / J. Hardy, D. J. Selkoe // *Science* – 2002. – T. 297 – № 5580 – 353–6c.
238. Harel A. Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking. / A. Harel, F. Wu, M. P. Mattson, C. M. Morris, P. J. Yao // *Traffic* – 2008. – T. 9 – № 3 – 417–29c.
239. Harold D. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer’s disease. / D. Harold, R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A. R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C.

- Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, S. Love, P. G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schürmann, R. Heun, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frölich, H. Hampel, M. Hüll, D. Rujescu, A. M. Goate, J. S. K. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Mühleisen, M. M. Nöthen, S. Moebus, K.-H. Jöckel, N. Klopp, H.-E. Wichmann, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, S. G. Younkin, P. A. Holmans, M. O'Donovan, M. J. Owen, J. Williams // *Nat. Genet.* – 2009. – T. 41 – № 10 – 1088–93c.
240. Harvey H. The role of glial cells and the complement system in retinal diseases and Alzheimer's disease: common neural degeneration mechanisms. / H. Harvey, S. Durant // *Exp. brain Res.* – 2014. – T. 232 – № 11 – 3363–77c.
241. Hashiguchi M. Truncation of CDK5 activator p35 induces intensive phosphorylation of Ser202/Thr205 of human tau. / M. Hashiguchi, T. Saito, S. Hisanaga, T. Hashiguchi // *J. Biol. Chem.* – 2002. – T. 277 – № 46 – 44525–30c.
242. Hashimoto R. Identification of QTLs involved in the development of amygdala kindling in the rat. / R. Hashimoto, B. Voigt, Y. Ishimaru, R. Hokao, S. Chiba, T. Serikawa, M. Sasa, T. Kuramoto // *Exp. Anim.* – 2013. – T. 62 – № 3 – 181–7c.
243. Hashimoto Y. A mutation protective against Alzheimer's disease renders amyloid  $\beta$  precursor protein incapable of mediating neurotoxicity. / Y. Hashimoto, M. Matsuoka // *J. Neurochem.* – 2014. – T. 130 – № 2 – 291–300c.
244. Hassan M.A. Incorporating alternative splicing and mRNA editing into the genetic analysis of complex traits. / M. A. Hassan, J. P. J. Saeij // *Bioessays* – 2014. – T. 36 – № 11 – 1032–40c.
245. Hatem A. Benchmarking short sequence mapping tools. / A. Hatem, D. Bozdağ, A. E. Toland, Ü. V Çatalyürek // *BMC Bioinformatics* – 2013. – T. 14 – 184c.
246. Hébert S.S. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. / S. S. Hébert, K. Horré, L. Nicolai, B. Bergmans, A. S. Papadopoulou, A. Delacourte, B. De Strooper // *Neurobiol. Dis.* – 2009. – T. 33 – № 3 – 422–8c.
247. Hébert S.S. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. / S. S. Hébert, B. De Strooper // *Trends Neurosci.* – 2009. – T. 32 – № 4 – 199–206c.
248. Hedskog L. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. / L. Hedskog, C. M. Pinho, R. Filadi, A. Rönnbäck, L.



- Hertwig, B. Wiehager, P. Larssen, S. Gellhaar, A. Sandebring, M. Westerlund, C. Graff, B. Winblad, D. Galter, H. Behbahani, P. Pizzo, E. Glaser, M. Ankarcrona // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – T. 110 – № 19 – 7916–21c.
249. Hemminki K. The “common disease-common variant” hypothesis and familial risks. / K. Hemminki, A. Försti, J. L. Bermejo // *PLoS One* – 2008. – T. 3 – № 6 – e2504c.
250. Hendrie H.C. Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer’s disease in a community study of elderly African Americans. / H. C. Hendrie, K. S. Hall, S. Hui, F. W. Unverzagt, C. E. Yu, D. K. Lahiri, A. Sahota, M. Farlow, B. Musick, C. A. Class // *Ann. Neurol.* – 1995. – T. 37 – № 1 – 118–20c.
251. Heneka M.T. NLRP3 is activated in Alzheimer’s disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. / M. T. Heneka, M. P. Kummer, A. Stutz, A. Delekate, S. Schwartz, A. Vieira-Saecker, A. Griep, D. Axt, A. Remus, T.-C. Tzeng, E. Gelpi, A. Halle, M. Korte, E. Latz, D. T. Golenbock // *Nature* – 2013. – T. 493 – № 7434 – 674–8c.
252. Hernández F. Tauopathies. / F. Hernández, J. Avila // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2007. – T. 64 – № 17 – 2219–33c.
253. Hernández-Zimbrón L.F. Oxidative stress caused by ozone exposure induces  $\beta$ -amyloid 1-42 overproduction and mitochondrial accumulation by activating the amyloidogenic pathway. / L. F. Hernández-Zimbrón, S. Rivas-Arancibia // *Neuroscience* – 2015. – T. 304 – 340–8c.
254. Heuvel L.P. van den Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. / L. P. van den Heuvel, J. A. Smeitink, R. J. T. Rodenburg // *Mitochondrion* – 2004. – T. 4 – № 5-6 – 395–401c.
255. Hewing N.J. Intravitreal injection of TIMP3 or the EGFR inhibitor erlotinib offers protection from oxygen-induced retinopathy in mice. / N. J. Hewing, G. Weskamp, J. Vermaat, E. Farage, K. Glomski, S. Swendeman, R. V. P. Chan, M. F. Chiang, R. Khokha, B. Anand-Apte, C. P. Blobel // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2013. – T. 54 – № 1 – 864–70c.
256. Hickman S.E. TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer’s disease. / S. E. Hickman, J. El Khoury // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – T. 88 – № 4 – 495–8c.
257. Hiltunen M. Focal cerebral ischemia in rats alters APP processing and expression of Abeta peptide degrading enzymes in the thalamus. / M. Hiltunen, P. Mäkinen, S. Peräniemi, J. Sivenius, T. van Groen, H. Soininen, J. Jolkkonen // *Neurobiol. Dis.* – 2009. – T. 35 – № 1 – 103–13c.
258. Hindorff L.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. / L. A. Hindorff, P. Sethupathy, H. A. Junkins, E.

- M. Ramos, J. P. Mehta, F. S. Collins, T. A. Manolio // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – T. 106 – № 23 – 9362–7c.
259. Hirano Y. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. / Y. Hirano, H. Hayashi, S.-I. Iemura, K. B. Hendil, S.-I. Niwa, T. Kishimoto, M. Kasahara, T. Natsume, K. Tanaka, S. Murata // *Mol. Cell* – 2006. – T. 24 – № 6 – 977–84c.
260. Hirschhorn J.N. Genomewide association studies--illuminating biologic pathways. / J. N. Hirschhorn // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – T. 360 – № 17 – 1699–701c.
261. Ho C.-Y. Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of Alzheimer's and Parkinson's disease patients. / C.-Y. Ho, J. C. Troncoso, D. Knox, W. Stark, C. G. Eberhart // *Brain Pathol.* – 2014. – T. 24 – № 1 – 25–32c.
262. Hoh Kam J. Viewing ageing eyes: diverse sites of amyloid Beta accumulation in the ageing mouse retina and the up-regulation of macrophages. / J. Hoh Kam, E. Lenassi, G. Jeffery // *PLoS One* – 2010. – T. 5 – № 10.
263. Holmans P. Gene ontology analysis of GWA study data sets provides insights into the biology of bipolar disorder. / P. Holmans, E. K. Green, J. S. Pahwa, M. A. R. Ferreira, S. M. Purcell, P. Sklar, M. J. Owen, M. C. O'Donovan, N. Craddock // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – T. 85 – № 1 – 13–24c.
264. Holtzman D. Maturation increase in mouse brain creatine kinase reaction rates shown by phosphorus magnetic resonance. / D. Holtzman, E. W. McFarland, D. Jacobs, M. C. Offutt, L. J. Neuringer // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1991. – T. 58 – № 2 – 181–8c.
265. Hommet C. Review of cerebral microangiopathy and Alzheimer's disease: relation between white matter hyperintensities and microbleeds. / C. Hommet, K. Mondon, T. Constans, E. Beaufils, T. Desmidt, V. Camus, J. P. Cottier // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* – 2011. – T. 32 – № 6 – 367–78c.
266. Hong M.-G. Genome-wide pathway analysis implicates intracellular transmembrane protein transport in Alzheimer disease. / M.-G. Hong, A. Alexeyenko, J.-C. Lambert, P. Amouyel, J. A. Prince // *J. Hum. Genet.* – 2010. – T. 55 – № 10 – 707–9c.
267. Hoopes R.R. Quantitative trait loci for hypercalciuria in a rat model of kidney stone disease. / R. R. Hoopes, R. Reid, S. Sen, C. Szpirer, P. Dixon, A. A. J. Pannett, R. V Thakker, D. A. Bushinsky, S. J. Scheinman // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – T. 14 – № 7 – 1844–50c.
268. Hosler M.R. Role of the proteasome in TGF-beta signaling in lens epithelial cells. / M. R. Hosler, S.-T. Wang-Su, B. J. Wagner // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – T. 47 – № 5 – 2045–52c.

269. Hosokawa M. Management and design of the maintenance of SAM mouse strains: an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders. / M. Hosokawa, T. Abe, K. Higuchi, K. Shimakawa, Y. Omori, T. Matsushita, K. Kogishi, E. Deguchi, Y. Kishimoto, K. Yasuoka, T. Takeda // *Exp. Gerontol.* – T. 32 – № 1-2 – 111–6c.
270. Hosokawa M. Aging of blood-brain barrier and neuronal cells of eye and ear in SAM mice. / M. Hosokawa, M. Ueno // *Neurobiol. Aging* – T. 20 – № 2 – 117–23c.
271. Houten S.M. Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. / S. M. Houten, S. Denis, C. A. Argmann, Y. Jia, S. Ferdinandusse, J. K. Reddy, R. J. A. Wanders // *J. Lipid Res.* – 2012. – T. 53 – № 7 – 1296–303c.
272. Hroudová J. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. / J. Hroudová, N. Singh, Z. Fišar // *Biomed Res. Int.* – 2014. – T. 2014 – 175062c.
273. Hu K. Noninvasive fractal biomarker of clock neurotransmitter disturbance in humans with dementia. / K. Hu, D. G. Harper, S. A. Shea, E. G. Stopa, F. A. J. L. Scheer // *Sci. Rep.* – 2013. – T. 3 – 2229c.
274. Hu Y. Pathogenic role of the Wnt signaling pathway activation in laser-induced choroidal neovascularization. / Y. Hu, Y. Chen, M. Lin, K. Lee, R. A. Mott, J. Ma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2013. – T. 54 – № 1 – 141–54c.
275. Huggins C.J. C/EBP $\gamma$  suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBP $\beta$ . / C. J. Huggins, R. Malik, S. Lee, J. Salotti, S. Thomas, N. Martin, O. A. Quiñones, W. G. Alvord, M. E. Olanich, J. R. Keller, P. F. Johnson // *Mol. Cell. Biol.* – 2013. – T. 33 – № 16 – 3242–58c.
276. Humphries C. Rare Variants and Transcriptomics in Alzheimer disease. / C. Humphries, M. A. Kohli // *Curr. Genet. Med. Rep.* – 2014. – T. 2 – № 2 – 75–84c.
277. Hyne V. QTL analysis: further uses of “marker regression”. / V. Hyne, M. J. Kearsey // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – T. 91 – № 3 – 471–6c.
278. Imanishi H. Nuclear but not mitochondrial DNA involvement in respiratory complex I defects found in senescence-accelerated mouse strain, SAMP8. / H. Imanishi, M. Yokota, M. Mori, A. Shimizu, K. Nakada, J.-I. Hayashi // *Exp. Anim.* – 2011. – T. 60 – № 4 – 397–404c.
279. Inestrosa N.C. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. / N. C. Inestrosa, L. Varela-Nallar // *J. Mol. Cell Biol.* – 2014. – T. 6 – № 1 – 64–74c.
280. Iqbal K. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. / K. Iqbal, A. del C. Alonso, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C.-X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A.

- Rahman, H. Tanimukai, I. Grundke-Iqbal // *Biochim. Biophys. Acta* – 2005. – T. 1739 – № 2-3 – 198–210c.
281. Ishiura H. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. / H. Ishiura, W. Sako, M. Yoshida, T. Kawarai, O. Tanabe, J. Goto, Y. Takahashi, H. Date, J. Mitsui, B. Ahsan, Y. Ichikawa, A. Iwata, H. Yoshino, Y. Izumi, K. Fujita, K. Maeda, S. Goto, H. Koizumi, R. Morigaki, M. Ikemura, N. Yamauchi, S. Murayama, G. A. Nicholson, H. Ito, G. Sobue, M. Nakagawa, R. Kaji, S. Tsuji // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – T. 91 – № 2 – 320–9c.
282. Jack C.R. Alzheimer disease: new concepts on its neurobiology and the clinical role imaging will play. / C. R. Jack // *Radiology* – 2012. – T. 263 – № 2 – 344–61c.
283. Jack C.R. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. / C. R. Jack, M. S. Albert, D. S. Knopman, G. M. McKhann, R. A. Sperling, M. C. Carrillo, B. Thies, C. H. Phelps // *Alzheimers. Dement.* – 2011. – T. 7 – № 3 – 257–62c.
284. Jakobsdottir J. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. / J. Jakobsdottir, Y. P. Conley, D. E. Weeks, T. S. Mah, R. E. Ferrell, M. B. Gorin // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – T. 77 – № 3 – 389–407c.
285. Janssen S.F. Systematic review of the association between Alzheimer's disease and chronic glaucoma. / S. F. Janssen, N. M. Jansonius, F. Bouwman, F. D. Verbraak, A. A. Bergen // *Clin. Ophthalmol.* – 2015. – T. 9 – 783–4c.
286. Jarero-Basulto J.J. Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease. / J. J. Jarero-Basulto, J. Luna-Muñoz, R. Mena, Z. Kristofikova, D. Ripova, G. Perry, L. I. Binder, F. Garcia-Sierra // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2013. – T. 72 – № 12 – 1145–61c.
287. Jarrett S.G. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. / S. G. Jarrett, M. E. Boulton // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – T. 33 – № 4 – 399–417c.
288. Järveläinen H. Pivotal role for decorin in angiogenesis. / H. Järveläinen, A. Sainio, T. N. Wight // *Matrix Biol.* – 2015. – T. 43 – 15–26c.
289. Jeffs B. Applicability of a “speed” congenic strategy to dissect blood pressure quantitative trait loci on rat chromosome 2. / B. Jeffs, C. D. Negrin, D. Graham, J. S. Clark, N. H. Anderson, D. Gauguier, A. F. Dominiczak // *Hypertension* – 2000. – T. 35 – № 1 Pt 2 – 179–87c.
290. Jensen J.R. Genetic control of renal tumorigenesis by the mouse *Rtm1* locus. / J. R. Jensen, A. Galvan, A. Borrego, W. H. K. Cabrera, O. G. Ribeiro, N. Starobinas, M. De Franco,

- M. Colecchia, A. Bertolotti, T. A. Dragani, O. C. M. Ibañez // *BMC Genomics* – 2013. – T. 14 – 724c.
291. Jiao Y. Genetic dissection of strain dependent paraquat-induced neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. / Y. Jiao, L. Lu, R. W. Williams, R. J. Smeyne // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 1 – e29447c.
292. Jicha G.A. Conceptual evolution in Alzheimer's disease: implications for understanding the clinical phenotype of progressive neurodegenerative disease. / G. A. Jicha, S. A. Carr // *J. Alzheimers. Dis.* – 2010. – T. 19 – № 1 – 253–72c.
293. Jin C. An updated meta-analysis of the association between SORL1 variants and the risk for sporadic Alzheimer's disease. / C. Jin, X. Liu, F. Zhang, Y. Wu, J. Yuan, J. Zhu, F. Zhang, G. Wang, Z. Cheng // *J. Alzheimers. Dis.* – 2013. – T. 37 – № 2 – 429–37c.
294. Jin K. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. / K. Jin, A. L. Peel, X. O. Mao, L. Xie, B. A. Cottrell, D. C. Henshall, D. A. Greenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2004. – T. 101 – № 1 – 343–7c.
295. Jobling A.I. Expression of the ETS transcription factor ELF3 in the retinal pigment epithelium. / A. I. Jobling, Z. Fang, D. Koleski, M. J. Tymms // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – T. 43 – № 11 – 3530–7c.
296. Johnson L. V The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. / L. V Johnson, W. P. Leitner, A. J. Rivest, M. K. Staples, M. J. Radeke, D. H. Anderson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – T. 99 – № 18 – 11830–5c.
297. Johnson L.A. Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor interaction affects spatial memory retention and brain ApoE levels in an isoform-dependent manner. / L. A. Johnson, R. H. J. Olsen, L. S. Merkens, A. DeBarber, R. D. Steiner, P. M. Sullivan, N. Maeda, J. Raber // *Neurobiol. Dis.* – 2014. – T. 64 – 150–62c.
298. Jonsson T. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. / T. Jonsson, J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jönsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts, K. Stefansson // *Nature* – 2012. – T. 488 – № 7409 – 96–9c.
299. Joshi P. Microglia convert aggregated amyloid- $\beta$  into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. / P. Joshi, E. Turola, A. Ruiz, A. Bergami, D. D. Libera, L. Benussi, P. Giussani, G. Magnani, G. Comi, G. Legname, R. Ghidoni, R. Furlan, M. Matteoli, C. Verderio // *Cell Death Differ.* – 2014. – T. 21 – № 4 – 582–93c.

300. Jost C.R. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. / C. R. Jost, C. E. E. M. Van Der Zee, H. J. A. In 't Zandt, F. Oerlemans, M. Verheij, F. Streijger, J. Fransen, A. Heerschap, A. R. Cools, B. Wieringa // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – T. 15 – № 10 – 1692–706c.
301. Jun G. Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. / G. Jun, A. C. Naj, G. W. Beecham, L.-S. Wang, J. Buross, P. J. Gallins, J. D. Buxbaum, N. Ertekin-Taner, M. D. Fallin, R. Friedland, R. Inzelberg, P. Kramer, E. Rogaeva, P. St George-Hyslop, L. B. Cantwell, B. A. Dombroski, A. J. Saykin, E. M. Reiman, D. A. Bennett, J. C. Morris, K. L. Lunetta, E. R. Martin, T. J. Montine, A. M. Goate, D. Blacker, D. W. Tsuang, D. Beekly, L. A. Cupples, H. Hakonarson, W. Kukull, T. M. Foroud, J. Haines, R. Mayeux, L. A. Farrer, M. A. Pericak-Vance, G. D. Schellenberg // *Arch. Neurol.* – 2010. – T. 67 – № 12 – 1473–84c.
302. Kaarniranta K. Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? / K. Kaarniranta, A. Salminen, A. Haapasalo, H. Soininen, M. Hiltunen // *J. Alzheimers. Dis.* – 2011. – T. 24 – № 4 – 615–31c.
303. Kaisaki P.J. Detailed comparative gene map of rat chromosome 1 with mouse and human genomes and physical mapping of an evolutionary chromosomal breakpoint. / P. J. Kaisaki, M. Rouard, P. A. Danoy, R. H. Wallis, S. C. Collins, M. Rice, E. R. Levy, M. Lathrop, M. T. Bihoreau, D. Gauguier // *Genomics* – 2000. – T. 64 – № 1 – 32–43c.
304. Kalaria R.N. Vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease and experimental cerebral ischemia. / R. N. Kalaria, D. L. Cohen, D. R. Premkumar, S. Nag, J. C. LaManna, W. D. Lust // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1998. – T. 62 – № 1 – 101–5c.
305. Kalashikam R.R. Obese locus in WNIN/obese rat maps on chromosome 5 upstream of leptin receptor. / R. R. Kalashikam, K. K. Battula, V. Kirlampalli, J. M. Friedman, G. Nappanveetil // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 10 – e77679c.
306. Kaldis P. "Hot spots" of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. / P. Kaldis, W. Hemmer, E. Zanolla, D. Holtzman, T. Wallimann // *Dev. Neurosci.* – 1996. – T. 18 – № 5-6 – 542–54c.
307. Kalou M. Postnatal development of energy metabolism in the rat brain. / M. Kalou, H. Rauchová, Z. Drahota // *Physiol. Res.* – 2001. – T. 50 – № 3 – 315–9c.
308. Kamboh M.I. Genome-wide association study of Alzheimer's disease / M. I. Kamboh, F. Y. Demirci, X. Wang, R. L. Minster, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz et al. // *Transl Psychiatry.* – 2012. – 2. – e117.

309. Kaminsky Y.G. Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. / Y. G. Kaminsky, L. A. Tikhonova, E. A. Kosenko // *Front. Biosci. (Landmark Ed.* – 2015. – T. 20 – 173–97c.
310. Kandalepas P.C. The Normal and Pathologic Roles of the Alzheimer's  $\beta$ -secretase, BACE1 / P. C. Kandalepas, R. Vassar // *Curr Alzheimer Res.* – 2014. – 11. – P. 441–449.
311. Kandiah N. Association between white matter hyperintensity and medial temporal atrophy at various stages of Alzheimer's disease. / N. Kandiah, R. J. Chander, A. Ng, M. C. Wen, A. R. Cenina, P. N. Assam // *Eur. J. Neurol.* – 2015. – T. 22 – № 1 – 150–5c.
312. Kaneko H. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. / H. Kaneko, S. Dridi, V. Tarallo, B. D. Gelfand, B. J. Fowler, W. G. Cho, M. E. Kleinman, S. L. Ponicsan, W. W. Hauswirth, V. A. Chiodo, K. Karikó, J. W. Yoo, D. Lee, M. Hadziahmetovic, Y. Song, S. Misra, G. Chaudhuri, F. W. Buaas, R. E. Braun, D. R. Hinton, Q. Zhang, H. E. Grossniklaus, J. M. Provis, M. C. Madigan, A. H. Milam, N. L. Justice, R. J. C. Albuquerque, A. D. Blandford, S. Bogdanovich, Y. Hirano, J. Witta, E. Fuchs, D. R. Littman, B. K. Ambati, C. M. Rudin, M. M. W. Chong, P. Provost, J. F. Kugel, J. A. Goodrich, J. L. Dunaief, J. Z. Baffi, J. Ambati // *Nature* – 2011. – T. 471 – № 7338 – 325–30c.
313. Karim S. Transcriptomics study of neurodegenerative disease: emphasis on synaptic dysfunction mechanism in Alzheimer's disease. / S. Karim, Z. Mirza, S. A. Ansari, M. Rasool, Z. Iqbal, S. S. Sohrab, M. A. Kamal, A. M. Abuzenadah, M. H. Al-Qahtani // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2014. – T. 13 – № 7 – 1202–12c.
314. Karunadharma P.P. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. / P. P. Karunadharma, C. L. Nordgaard, T. W. Olsen, D. A. Ferrington // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – T. 51 – № 11 – 5470–9c.
315. Katoh M. Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). / M. Katoh // *Int. J. Mol. Med.* – 2013. – T. 32 – № 4 – 763–7c.
316. Keenan T.D.L. Associations between age-related macular degeneration, Alzheimer disease, and dementia: record linkage study of hospital admissions. / T. D. L. Keenan, R. Goldacre, M. J. Goldacre // *JAMA Ophthalmol.* – 2014. – T. 132 – № 1 – 63–8c.
317. Keller J.N. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. / J. N. Keller, E. Dimayuga, Q. Chen, J. Thorpe, J. Gee, Q. Ding // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – T. 36 – № 12 – 2376–91c.
318. Keller M.F. Using genome-wide complex trait analysis to quantify “missing heritability” in Parkinson's disease. / M. F. Keller, M. Saad, J. Bras, F. Bettella, N. Nicolaou, J. Simón-Sánchez, F. Mittag, F. Büchel, M. Sharma, J. R. Gibbs, C. Schulte, V. Moskvina, A.

- Durr, P. Holmans, L. L. Kilarski, R. Guerreiro, D. G. Hernandez, A. Brice, P. Ylikotila, H. Stefánsson, K. Majamaa, H. R. Morris, N. Williams, T. Gasser, P. Heutink, N. W. Wood, J. Hardy, M. Martinez, A. B. Singleton, M. A. Nalls // *Hum. Mol. Genet.* – 2012. – T. 21 – № 22 – 4996–5009c.
319. Kennelly S.P. Blood pressure and dementia - a comprehensive review. / S. P. Kennelly, B. A. Lawlor, R. A. Kenny // *Ther. Adv. Neurol. Disord.* – 2009. – T. 2 – № 4 – 241–60c.
320. Kenney M.C. Characterization of retinal and blood mitochondrial DNA from age-related macular degeneration patients. / M. C. Kenney, S. R. Atilano, D. Boyer, M. Chwa, G. Chak, S. Chinichian, P. Coskun, D. C. Wallace, A. B. Nesburn, N. S. Udar // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – T. 51 – № 8 – 4289–97c.
321. Keogh M.J. Next generation sequencing for neurological diseases: new hope or new hype? / M. J. Keogh, P. F. Chinnery // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2013. – T. 115 – № 7 – 948–53c.
322. Khandhadia S. Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. / S. Khandhadia, A. Lotery // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2010. – T. 12 – e34c.
323. Kim D. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. / D. Kim, G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, S. L. Salzberg // *Genome Biol.* – 2013. – T. 14 – № 4 – R36c.
324. Kim K.H. RNA-Seq analysis of frontal cortex and cerebellum from 5XFAD mice at early stage of disease pathology. / K. H. Kim, M. Moon, S.-B. Yu, I. Mook-Jung, J.-I. Kim // *J. Alzheimers. Dis.* – 2012. – T. 29 – № 4 – 793–808c.
325. Kim W.S. ABCA8 stimulates sphingomyelin production in oligodendrocytes. / W. S. Kim, J.-H. T. Hsiao, S. Bhatia, E. N. Glaros, A. S. Don, S. Tsuruoka, C. Shannon Weickert, G. M. Halliday // *Biochem. J.* – 2013. – T. 452 – № 3 – 401–10c.
326. Kirkby D.L. Characterization of perforant path lesions in rodent models of memory and attention. / D. L. Kirkby, G. A. Higgins // *Eur. J. Neurosci.* – 1998. – T. 10 – № 3 – 823–38c.
327. Kirschner R. RPGR Transcription Studies in Mouse and Human Tissues Reveal a Retina-Specific Isoform That Is Disrupted in a Patient With X-Linked Retinitis Pigmentosa / R. Kirschner, T. Rosenberg, R. Schultz-Heienbrok, S. Lenzner, S. Feil, R. Roepman, F. P. M. Cremers, H.-H. Ropers, W. Berger // *Hum. Mol. Genet.* – 1999. – T. 8 – № 8 – 1571–1578c.
328. Kitado H. Molecular genetic characterization of the senescence-accelerated mouse (SAM) strains. / H. Kitado, K. Higuchi, T. Takeda // *J. Gerontol.* – 1994. – T. 49 – № 6 – B247–54c.



329. Kivipelto M. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. / M. Kivipelto, E. L. Helkala, M. P. Laakso, T. Hänninen, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, A. Nissinen // *BMJ* – 2001. – T. 322 – № 7300 – 1447–51c.
330. Kleiman T. Apolipoprotein E epsilon4 allele is unrelated to cognitive or functional decline in Alzheimer's disease: retrospective and prospective analysis. / T. Kleiman, K. Zdanys, B. Black, T. Rightmer, M. Grey, K. Garman, M. Macavoy, J. Gelernter, C. van Dyck // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* – 2006. – T. 22 – № 1 – 73–82c.
331. Knobloch M. Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms. / M. Knobloch, M. Farinelli, U. Konietzko, R. M. Nitsch, I. M. Mansuy // *J. Neurosci.* – 2007. – T. 27 – № 29 – 7648–53c.
332. Koldamova R. Genome-wide approaches reveal EGR1-controlled regulatory networks associated with neurodegeneration. / R. Koldamova, J. Schug, M. Lefterova, A. A. Cronican, N. F. Fitz, F. A. Davenport, A. Carter, E. L. Castranio, I. Lefterov // *Neurobiol. Dis.* – 2014. – T. 63 – 107–14c.
333. Kolev M. V Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. / M. V Kolev, M. M. Ruseva, C. L. Harris, B. P. Morgan, R. M. Donev // *Curr. Neuropharmacol.* – 2009. – T. 7 – № 1 – 1–8c.
334. Kolosova N.G. [Age-related changes in protein and lipid oxidation in the liver of prematurely aging rats OXYS]. / N. G. Kolosova, A. I. Grishanova, Z. S. Krysanova, T. V Zueva, I. A. Sidorova, O. I. Sinitsyna // *Biomeditsinskaiâ khimiia* – T. 50 – № 1 – 73–8c.
335. Kolosova N.G. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. / N. G. Kolosova, T. V Shcheglova, S. V Sergeeva, L. V Loskutova // *Neurobiol. Aging* – 2006. – T. 27 – № 9 – 1289–97c.
336. Kondo D.G. A review of MR spectroscopy studies of pediatric bipolar disorder. / D. G. Kondo, T. L. Hellem, X.-F. Shi, Y. H. Sung, A. P. Prescott, T. S. Kim, R. S. Huber, L. N. Forrest, P. F. Renshaw // *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* – 2014. – T. 35 – № 6 Suppl – S64–80c.
337. Kondo D.G. Review: magnetic resonance spectroscopy studies of pediatric major depressive disorder. / D. G. Kondo, T. L. Hellem, Y.-H. Sung, N. Kim, E.-K. Jeong, K. K. Delmastro, X. Shi, P. F. Renshaw // *Depress. Res. Treat.* – 2011. – T. 2011 – 650450c.
338. Koolwijk L.M.E. van Common genetic determinants of intraocular pressure and primary open-angle glaucoma. / L. M. E. van Koolwijk, W. D. Ramdas, M. K. Ikram, N. M. Jansonius, F. Pasutto, P. G. Hysi, S. Macgregor, S. F. Janssen, A. W. Hewitt, A. C. Viswanathan, J. B. ten Brink, S. M. Hosseini, N. Amin, D. D. G. Despriet, J. J. M. Willems-

- Assink, R. Kramer, F. Rivadeneira, M. Struchalin, Y. S. Aulchenko, N. Weisschuh, M. Zenkel, C. Y. Mardin, E. Gramer, U. Welge-Lüssen, G. W. Montgomery, F. Carbonaro, T. L. Young, C. Bellenguez, P. McGuffin, P. J. Foster, F. Topouzis, P. Mitchell, J. J. Wang, T. Y. Wong, M. A. Czudowska, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, R. C. W. Wolfs, P. T. V. M. de Jong, B. A. Oostra, A. D. Paterson, D. A. Mackey, A. A. B. Bergen, A. Reis, C. J. Hammond, J. R. Vingerling, H. G. Lemij, C. C. W. Klaver, C. M. van Duijn // *PLoS Genet.* – 2012. – T. 8 – № 5 – e1002611c.
339. Korbolina E., Agafonova I., Sergeeva S., Trofimova N., Mishenko N. K.N. Early-life hypoxia in the development of behavioral dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats and its correction with antioxidants / K. N. Korbolina E., Agafonova I., Sergeeva S., Trofimova N., Mishenko N. // *Adv. Gerontol.* – 2007. – T. 20 – № 3 – 46c.
340. Korbolina E.E. Application of quantitative trait locus mapping and transcriptomics to studies of the senescence-accelerated phenotype in rats. / E. E. Korbolina, N. I. Ershov, L. O. Bryzgalov, N. G. Kolosova // *BMC Genomics* – 2014. – T. 15 Suppl 1 – S3c.
341. Korbolina E.E. Quantitative trait loci on chromosome 1 for cataract and AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. / E. E. Korbolina, O. S. Kozhevnikova, N. A. Stefanova, N. G. Kolosova // *Aging (Albany. NY).* – 2012. – T. 4 – № 1 – 49–59c.
342. Koronyo Y. Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal  $\text{A}\beta$  plaques for early diagnosis and therapy assessment. / Y. Koronyo, B. C. Salumbides, K. L. Black, M. Koronyo-Hamaoui // *Neurodegener. Dis.* – 2012. – T. 10 – № 1-4 – 285–93c.
343. Koronyo-Hamaoui M. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. / M. Koronyo-Hamaoui, Y. Koronyo, A. V Ljubimov, C. A. Miller, M. K. Ko, K. L. Black, M. Schwartz, D. L. Farkas // *Neuroimage* – 2011. – T. 54 Suppl 1 – S204–17c.
344. Kotelevtsev Y. V Interstrain restriction fragment length polymorphism in the c-src correlates with Na,K cotransport and calcium content in hybrid rat erythrocytes. / Y. V Kotelevtsev, D. D. Spitkovski, S. N. Orlov, Y. V Postnov // *J. Hypertens. Suppl.* – 1989. – T. 7 – № 6 – S112–3c.
345. Kowalski J.R. The role of deubiquitinating enzymes in synaptic function and nervous system diseases. / J. R. Kowalski, P. Juo // *Neural Plast.* – 2012. – T. 2012 – 892749c.
346. Kozhevnikova O.S. Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy. / O. S. Kozhevnikova, E. E. Korbolina, N. I. Ershov, N. G. Kolosova // *Cell Cycle* – 2013. – T. 12 – № 11 – 1745–61c.
347. Kozhevnikova O.S. Association of AMD-like retinopathy development with an Alzheimer's disease metabolic pathway in OXYS rats. / O. S. Kozhevnikova, E. E. Korbolina,

- N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, Y. L. Orlov, N. G. Kolosova // *Biogerontology* – 2013. – T. 14 – № 6 – 753–62c.
348. Kumar P. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. / P. Kumar, S. Henikoff, P. C. Ng // *Nat. Protoc.* – 2009. – T. 4 – № 7 – 1073–81c.
349. Kuznetsova E.  $\beta$ -Amyloid, cholinergic transmission, and cerebrovascular system -- a developmental study in a mouse model of Alzheimer's disease. / E. Kuznetsova, R. Schliebs // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. – T. 19 – № 38 – 6749–65c.
350. Kvam V.M. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. / V. M. Kvam, P. Liu, Y. Si // *Am. J. Bot.* – 2012. – T. 99 – № 2 – 248–56c.
351. Kwitek A.E. Automated construction of high-density comparative maps between rat, human, and mouse. / A. E. Kwitek, P. J. Tonellato, D. Chen, J. Gullings-Handley, Y. S. Cheng, S. Twigger, T. E. Scheetz, T. L. Casavant, M. Stoll, M. A. Nobrega, M. Shiozawa, M. B. Soares, V. C. Sheffield, H. J. Jacob // *Genome Res.* – 2001. – T. 11 – № 11 – 1935–43c.
352. la Monte S.M. de Oxygen free radical injury is sufficient to cause some Alzheimer-type molecular abnormalities in human CNS neuronal cells. / S. M. de la Monte, N. Ganju, N. Feroz, T. Luong, K. Banerjee, J. Cannon, J. R. Wands // *J. Alzheimers. Dis.* – 2000. – T. 2 – № 3-4 – 261–81c.
353. la Torre J.C. de Alzheimer Disease as a Vascular Disorder: Nosological Evidence / J. C. de la Torre // *Stroke* – 2002. – T. 33 – № 4 – 1152–1162c.
354. la Torre J.C. de The vascular hypothesis of Alzheimer's disease: bench to bedside and beyond. / J. C. de la Torre // *Neurodegener. Dis.* – 2010. – T. 7 – № 1-3 – 116–21c.
355. Lagna G. Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIC. / G. Lagna, R. Kovelman, J. Sukegawa, R. G. Roeder // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – T. 14 – № 5 – 3053–64c.
356. Lalande J. <sup>1</sup>H NMR metabolomic signatures in five brain regions of the A $\beta$ PPswe Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease at four ages. / J. Lalande, H. Halley, S. Balayssac, V. Gilard, S. Déjean, R. Martino, B. Francés, J.-M. Lassalle, M. Malet-Martino // *J. Alzheimers. Dis.* – 2014. – T. 39 – № 1 – 121–43c.
357. Lambert J.-C. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. / J.-C. Lambert, S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M. J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fiévet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon, M. M. de Pancorbo, C. Lendon, C.

- Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossù, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanché, J.-F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, P. Amouyel // *Nat. Genet.* – 2009. – T. 41 – № 10 – 1094–9c.
358. Lambert J.C. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. / J. C. Lambert, C. A. Ibrahim-Verbaas, D. Harold, A. C. Naj, R. Sims, C. Bellenguez, A. L. DeStafano, J. C. Bis, G. W. Beecham, B. Grenier-Boley, G. Russo, T. A. Thornton-Wells, N. Jones, A. V Smith, V. Chouraki, C. Thomas, M. A. Ikram, D. Zelenika, B. N. Vardarajan, Y. Kamatani, C. F. Lin, A. Gerrish, H. Schmidt, B. Kunkle, M. L. Dunstan, A. Ruiz, M. T. Bihoreau, S. H. Choi, C. Reitz, F. Pasquier, C. Cruchaga, D. Craig, N. Amin, C. Berr, O. L. Lopez, P. L. De Jager, V. Deramecourt, J. A. Johnston, D. Evans, S. Lovestone, L. Letenneur, F. J. Morón, D. C. Rubinsztein, G. Eiriksdottir, K. Sleegers, A. M. Goate, N. Fiévet, M. W. Huentelman, M. Gill, K. Brown, M. I. Kamboh, L. Keller, P. Barberger-Gateau, B. McGuinness, E. B. Larson, R. Green, A. J. Myers, C. Dufouil, S. Todd, D. Wallon, S. Love, E. Rogaeva, J. Gallacher, P. St George-Hyslop, J. Clarimon, A. Lleo, A. Bayer, D. W. Tsuang, L. Yu, M. Tsolaki, P. Bossù, G. Spalletta, P. Proitsi, J. Collinge, S. Sorbi, F. Sanchez-Garcia, N. C. Fox, J. Hardy, M. C. Deniz Naranjo, P. Bosco, R. Clarke, C. Brayne, D. Galimberti, M. Mancuso, F. Matthews, S. Moebus, P. Mecocci, M. Del Zompo, W. Maier, H. Hampel, A. Pilotto, M. Bullido, F. Panza, P. Caffarra, B. Nacmias, J. R. Gilbert, M. Mayhaus, L. Lannefelt, H. Hakonarson, S. Pichler, M. M. Carrasquillo, M. Ingelsson, D. Beekly, V. Alvarez, F. Zou, O. Valladares, S. G. Younkin, E. Coto, K. L. Hamilton-Nelson, W. Gu, C. Razquin, P. Pastor, I. Mateo, M. J. Owen, K. M. Faber, P. V Jonsson, O. Combarros, M. C. O'Donovan, L. B. Cantwell, H. Soininen, D. Blacker, S. Mead, T. H. Mosley, D. A. Bennett, T. B. Harris, L. Fratiglioni, C. Holmes, R. F. de Bruijn, P. Passmore, T. J. Montine, K. Bettens, J. I. Rotter, A. Brice, K. Morgan, T. M. Foroud, W. A. Kukull, D. Hannequin, J. F. Powell, M. A. Nalls, K. Ritchie, K. L. Lunetta, J. S. Kauwe, E. Boerwinkle, M. Riemenschneider, M. Boada, M. Hiltunen, E. R. Martin, R. Schmidt, D. Rujescu, L. S. Wang, J. F. Dartigues, R. Mayeux, C. Tzourio, A. Hofman, M. M. Nöthen, C. Graff, B. M. Psaty, L. Jones, J. L. Haines, P. A. Holmans, M. Lathrop, M. A. Pericak-Vance, L. J. Launer, L. A. Farrer, C. M. van Duijn, C. Van Broeckhoven, V. Moskvina, S. Seshadri, J. Williams, G. D. Schellenberg, P. Amouyel // *Nat. Genet.* – 2013. – T. 45 – № 12 – 1452–8c.
359. Landau S.M. Associations between cognitive, functional, and FDG-PET measures of decline in AD and MCI. / S. M. Landau, D. Harvey, C. M. Madison, R. A. Koeppe, E. M. Reiman, N. L. Foster, M. W. Weiner, W. J. Jagust // *Neurobiol. Aging* – 2011. – T. 32 – № 7 – 1207–18c.

360. Landis G. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. / G. Landis, J. Shen, J. Tower // *Aging* (Albany, NY). – 2012. – T. 4 – № 11 – 768–89c.
361. Landreth G.E. Toll-like receptors in Alzheimer's disease. / G. E. Landreth, E. G. Reed-Geaghan // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2009. – T. 336 – 137–53c.
362. Laragione T. The arthritis severity quantitative trait loci *Cia4* and *Cia6* regulate neutrophil migration into inflammatory sites and levels of TNF-alpha and nitric oxide. / T. Laragione, N. C. Yarlett, M. Brenner, A. Mello, B. Sherry, E. J. Miller, C. N. Metz, P. S. Gulko // *J. Immunol.* – 2007. – T. 178 – № 4 – 2344–51c.
363. Latta C.H. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. / C. H. Latta, H. M. Brothers, D. M. Wilcock // *Neuroscience* – 2015. – T. 302 – 103–11c.
364. Lazarov O. All in the Family: How the APPs Regulate Neurogenesis. / O. Lazarov, M. P. Demars // *Front. Neurosci.* – 2012. – T. 6 – 81c.
365. Leboyer M. Psychiatric genetics: search for phenotypes. / M. Leboyer, F. Bellivier, M. Nosten-Bertrand, R. Jouvent, D. Pauls, J. Mallet // *Trends Neurosci.* – 1998. – T. 21 – № 3 – 102–5c.
366. Lee M.J. Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. / M. J. Lee, J. H. Lee, D. C. Rubinsztein // *Prog. Neurobiol.* – 2013. – T. 105 – 49–59c.
367. Lee M.J. Synergistic effects of ischemia and  $\beta$ -amyloid burden on cognitive decline in patients with subcortical vascular mild cognitive impairment. / M. J. Lee, S. W. Seo, D. L. Na, C. C. H. Kim, J. H. Park, G. H. Kim, Y. Noh, H. Cho, H. J. Kim, C. W. Yoon, B. S. Ye, J. Chin, S. Jeon, J.-M. J.-H. Lee, Y. S. Choe, K.-H. Lee, J. S. Kim, S. T. Kim, M. Ewers, D. J. Werring, M. W. Weiner // *JAMA psychiatry* – 2014. – T. 71 – № 4 – 412–22c.
368. Lee M.S. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. / M. S. Lee, Y. T. Kwon, M. Li, J. Peng, R. M. Friedlander, L. H. Tsai // *Nature* – 2000. – T. 405 – № 6784 – 360–4c.
369. Lee S.-J. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. / S.-J. Lee, H.-S. Lim, E. Masliah, H.-J. Lee // *Neurosci. Res.* – 2011. – T. 70 – № 4 – 339–48c.
370. Lenihan M.E. Relationship between education and age-related cognitive decline: a review of recent research. / M. E. Lenihan, M. J. Summers, N. L. Saunders, J. J. Summers, J. C. Vickers // *Psychogeriatrics* – 2014.

371. Lenkowski J.R. Retinal regeneration in adult zebrafish requires regulation of TGF $\beta$  signaling. / J. R. Lenkowski, Z. Qin, C. J. Sifuentes, R. Thummel, C. M. Soto, C. B. Moens, P. A. Raymond // *Glia* – 2013. – T. 61 – № 10 – 1687–97c.
372. Lepore S. Enlargement of cerebral ventricles as an early indicator of encephalomyelitis. / S. Lepore, H. Waiczies, J. Hentschel, Y. Ji, J. Skodowski, A. Pohlmann, J. M. Millward, F. Paul, J. Wuerfel, T. Niendorf, S. Waiczies // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 8 – e72841c.
373. Lerner L.E. Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx. / L. E. Lerner, G.-H. Peng, Y. E. Gribanova, S. Chen, D. B. Farber // *J. Biol. Chem.* – 2005. – T. 280 – № 21 – 20642–50c.
374. Li H. Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels. / H. Li, P. Dhanasekaran, E. T. Alexander, D. J. Rader, M. C. Phillips, S. Lund-Katz // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2013. – T. 33 – № 4 – 687–93c.
375. Li H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics* – 2009. – T. 25 – № 14 – 1754–60c.
376. Li H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics* – 2009. – T. 25 – № 16 – 2078–9c.
377. Li Y. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection and Genotype Calling from Massively Parallel Sequencing (MPS) Data. / Y. Li, W. Chen, E. Y. Liu, Y.-H. Zhou // *Stat. Biosci.* – 2013. – T. 5 – № 1 – 3–25c.
378. Li Y. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. / Y. Li, L. Liu, S. W. Barger, W. S. T. Griffin // *J. Neurosci.* – 2003. – T. 23 – № 5 – 1605–11c.
379. Licatalosi D.D. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. / D. D. Licatalosi, R. B. Darnell // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – T. 11 – № 1 – 75–87c.
380. Lieven O. The Dkk1 dose is critical for eye development. / O. Lieven, U. R  ther // *Dev. Biol.* – 2011. – T. 355 – № 1 – 124–37c.
381. Lill C.M. Towards unveiling the genetics of neurodegenerative diseases. / C. M. Lill, L. Bertram // *Semin. Neurol.* – 2011. – T. 31 – № 5 – 531–41c.
382. Lin H. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. / H. Lin, H. Xu, F.-Q. Liang, H. Liang, P. Gupta, A. N. Havey, M. E. Boulton, B. F. Godley // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – T. 52 – № 6 – 3521–9c.
383. Lin S. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. / S. Lin, Y. Lin, J. R. Nery, M. A. Urich, A. Breschi, C. A. Davis, A. Dobin, C. Zaleski, M. A.

- Beer, W. C. Chapman, T. R. Gingeras, J. R. Ecker, M. P. Snyder // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – T. 111 – № 48 – 17224–9c.
384. Lindekleiv H. Cognitive function, drusen, and age-related macular degeneration: a cross-sectional study / H. Lindekleiv, M. G. Erke, G. Bertelsen, T. Peto, K. A. Arntzen, H. Schirmer, T. Wilsgaard, E. B. Mathiesen, I. Njølstad // *Eye* – 2013. – T. 27 – № 11 – 1281–1287c.
385. Lista S. Paths to Alzheimer's disease prevention: from modifiable risk factors to biomarker enrichment strategies. / S. Lista, B. Dubois, H. Hampel // *J. Nutr. Health Aging* – 2015. – T. 19 – № 2 – 154–63c.
386. Liu B. Amyloid-peptide vaccinations reduce  $\beta$ -amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. / B. Liu, S. Rasool, Z. Yang, C. G. Glabe, S. S. Schreiber, J. Ge, Z. Tan // *Am. J. Pathol.* – 2009. – T. 175 – № 5 – 2099–110c.
387. Liu K. Altered ubiquitin causes perturbed calcium homeostasis, hyperactivation of calpain, dysregulated differentiation, and cataract. / K. Liu, L. Lyu, D. Chin, J. Gao, X. Sun, F. Shang, A. Caceres, M.-L. Chang, S. Rowan, J. Peng, R. Mathias, H. Kasahara, S. Jiang, A. Taylor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – T. 112 – № 4 – 1071–6c.
388. Liu Y. Evaluating the impact of sequencing depth on transcriptome profiling in human adipose. / Y. Liu, J. F. Ferguson, C. Xue, I. M. Silverman, B. Gregory, M. P. Reilly, M. Li // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 6 – e66883c.
389. Liu Z. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway in RPE alters the expression of inflammation related genes. / Z. Liu, T. Qin, J. Zhou, A. Taylor, J. R. Sparrow, F. Shang // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2014. – T. 801 – 237–50c.
390. Lloret A. Molecular mechanisms linking amyloid  $\beta$  toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. / A. Lloret, T. Fuchsberger, E. Giraldo, J. Viña // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – T. 83 – 186–91c.
391. Lobanova E.S. Proteasome overload is a common stress factor in multiple forms of inherited retinal degeneration. / E. S. Lobanova, S. Finkelstein, N. P. Skiba, V. Y. Arshavsky // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – T. 110 – № 24 – 9986–91c.
392. Logue M.W. Search for age-related macular degeneration risk variants in Alzheimer disease genes and pathways. / M. W. Logue, M. Schu, B. N. Vardarajan, J. Farrell, K. L. Lunetta, G. Jun, C. T. Baldwin, M. M. Deangelis, L. A. Farrer // *Neurobiol. Aging* – 2014. – T. 35 – № 6 – 1510.e7–18c.

393. Lookeren Campagne M. van Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. / M. van Lookeren Campagne, J. LeCouter, B. L. Yaspan, W. Ye // *J. Pathol.* – 2014. – T. 232 – № 2 – 151–64c.
394. Loskutova L. V Emotional state and one-trial learning in OXYS rats with hereditarily elevated production of oxygen radicals. / L. V Loskutova, N. G. Kolosova // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2000. – T. 130 – № 8 – 746–8c.
395. Lu B. Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. / B. Lu // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* – 2009. – T. 9 – № 3 – 212–9c.
396. Lu R.-C. Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. / R.-C. Lu, M.-S. Tan, H. Wang, A.-M. Xie, J.-T. Yu, L. Tan // *Biomed Res. Int.* – 2014. – T. 2014 – 435203c.
397. Luedecke D. A novel presenilin 1 mutation (Ala275Val) as cause of early-onset familial Alzheimer disease. / D. Luedecke, J. S. Becktepe, J. T. Lehmbeck, U. Finckh, R. Yamamoto, H. Jahn, K. Boelmans // *Neurosci. Lett.* – 2014. – T. 566 – 115–9c.
398. Luibl V. Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. / V. Luibl, J. M. Isas, R. Kaye, C. G. Glabe, R. Langen, J. Chen // *J. Clin. Invest.* – 2006. – T. 116 – № 2 – 378–85c.
399. Lundkvist A. Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. / A. Lundkvist, A. Reichenbach, C. Betsholtz, P. Carmeliet, H. Wolburg, M. Pekny // *J. Cell Sci.* – 2004. – T. 117 – № Pt 16 – 3481–8c.
400. Luo C. Complement expression in retinal pigment epithelial cells is modulated by activated macrophages. / C. Luo, J. Zhao, A. Madden, M. Chen, H. Xu // *Exp. Eye Res.* – 2013. – T. 112 – 93–101c.
401. Lyros O. Dickkopf-1, the Wnt antagonist, is induced by acidic pH and mediates epithelial cellular senescence in human reflux esophagitis. / O. Lyros, P. Rafiee, L. Nie, R. Medda, N. Jovanovic, J. Schmidt, A. Mackinnon, N. Venu, R. Shaker // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2014. – T. 306 – № 7 – G557–74c.
402. Ma W. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. / W. Ma, L. Zhao, A. M. Fontainhas, R. N. Fariss, W. T. Wong // *PLoS One* – 2009. – T. 4 – № 11 – e7945c.
403. Maddock R.J. MR spectroscopic studies of the brain in psychiatric disorders. / R. J. Maddock, M. H. Buonocore // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* – 2012. – T. 11 – 199–251c.
404. Maga A.M. Quantitative trait loci affecting the 3D skull shape and size in mouse and prioritization of candidate genes in-silico. / A. M. Maga, N. Navarro, M. L. Cunningham, T. C. Cox // *Front. Physiol.* – 2015. – T. 6 – 92c.



405. Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. / B. Maher // *Nature* – 2008. – T. 456 – № 7218 – 18–21c.
406. Majewski J. The study of eQTL variations by RNA-seq: from SNPs to phenotypes. / J. Majewski, T. Pastinen // *Trends Genet.* – 2011. – T. 27 – № 2 – 72–9c.
407. Majji A.B. Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. / A. B. Majji, J. Cao, K. Y. Chang, A. Hayashi, S. Aggarwal, R. R. Grebe, E. De Juan // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – T. 41 – № 12 – 3936–42c.
408. Maller J. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. / J. Maller, S. George, S. Purcell, J. Fagerness, D. Altshuler, M. J. Daly, J. M. Seddon // *Nat. Genet.* – 2006. – T. 38 – № 9 – 1055–9c.
409. Manahan-Vaughan D. Strain-dependent variations in spatial learning and in hippocampal synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely behaving rats. / D. Manahan-Vaughan, H. Schwegler // *Front. Behav. Neurosci.* – 2011. – T. 5 – 7c.
410. Mandas A. Cognitive Impairment and Age-Related Vision Disorders: Their Possible Relationship and the Evaluation of the Use of Aspirin and Statins in a 65 Years-and-Over Sardinian Population. / A. Mandas, R. M. Mereu, O. Catta, A. Saba, L. Serchisu, D. Costaggiu, E. Peiretti, G. Caminiti, M. Vinci, M. Casu, S. Piludu, M. Fossarello, P. E. Manconi, S. Dessí // *Front. Aging Neurosci.* – 2014. – T. 6 – 309c.
411. Mandrekar-Colucci S. Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. / S. Mandrekar-Colucci, G. E. Landreth // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2010. – T. 9 – № 2 – 156–67c.
412. Manich G. Characterization of amyloid- $\beta$  granules in the hippocampus of SAMP8 mice. / G. Manich, C. Mercader, J. del Valle, J. Duran-Vilaregut, A. Camins, M. Pallàs, J. Vilaplana, C. Pelegrí // *J. Alzheimers. Dis.* – 2011. – T. 25 – № 3 – 535–46c.
413. Manich G. Presence of a neo-epitope and absence of amyloid beta and tau protein in degenerative hippocampal granules of aged mice. / G. Manich, J. del Valle, I. Cabezón, A. Camins, M. Pallàs, C. Pelegrí, J. Vilaplana // *Age (Dordr).* – 2014. – T. 36 – № 1 – 151–65c.
414. Manolio T.A. Finding the missing heritability of complex diseases. / T. A. Manolio, F. S. Collins, N. J. Cox, D. B. Goldstein, L. A. Hindorff, D. J. Hunter, M. I. McCarthy, E. M. Ramos, L. R. Cardon, A. Chakravarti, J. H. Cho, A. E. Guttacher, A. Kong, L. Kruglyak, E. Mardis, C. N. Rotimi, M. Slatkin, D. Valle, A. S. Whittemore, M. Boehnke, A. G. Clark, E. E. Eichler, G. Gibson, J. L. Haines, T. F. C. Mackay, S. A. McCarroll, P. M. Visscher // *Nature* – 2009. – T. 461 – № 7265 – 747–53c.

415. Mao Y. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. / Y. Mao, S. C. Finnemann // *Small GTPases* – 2015. – 1–11c.
416. Markel P. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. / P. Markel, P. Shu, C. Ebeling, G. A. Carlson, D. L. Nagle, J. S. Smutko, K. J. Moore // *Nat. Genet.* – 1997. – T. 17 – № 3 – 280–4c.
417. Markova E. V Stimulation of cell component of the immune response activates exploratory behavior in senescence accelerated OXYS rats. / E. V Markova, V. A. Kozlov, N. A. Trofimova, N. G. Kolosova // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2005. – T. 140 – № 3 – 345–7c.
418. Markovets A.M. Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression. / A. M. Markovets, A. Z. Fursova, N. G. Kolosova // *PLoS One* – 2011. – T. 6 – № 7 – e21682c.
419. Marriage T.N. Fine-mapping nicotine resistance loci in *Drosophila* using a multiparent advanced generation inter-cross population. / T. N. Marriage, E. G. King, A. D. Long, S. J. Macdonald // *Genetics* – 2014. – T. 198 – № 1 – 45–57c.
420. Martin E.I. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. / E. I. Martin, K. J. Ressler, E. Binder, C. B. Nemeroff // *Clin. Lab. Med.* – 2010. – T. 30 – № 4 – 865–91c.
421. Martina J.A. Novel roles for the MiTF/TFE family of transcription factors in organelle biogenesis, nutrient sensing, and energy homeostasis. / J. A. Martina, H. I. Diab, H. Li, R. Puertollano // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – T. 71 – № 13 – 2483–97c.
422. Martinon F. The Inflammasome / F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp // *Mol. Cell* – 2002. – T. 10 – № 2 – 417–426c.
423. Martinon F. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. / F. Martinon, J. Tschopp // *Cell* – 2004. – T. 117 – № 5 – 561–74c.
424. Matsumoto H. Strain difference in photoreceptor cell death after retinal detachment in mice. / H. Matsumoto, K. Kataoka, P. Tsoka, K. M. Connor, J. W. Miller, D. G. Vavvas // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – T. 55 – № 7 – 4165–74c.
425. Mattson M.P. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. / M. P. Mattson, M. Gleichmann, A. Cheng // *Neuron* – 2008. – T. 60 – № 5 – 748–66c.
426. McGeer P.L. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. / P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Itagaki, E. G. McGeer // *Neurosci. Lett.* – 1989. – T. 107 – № 1-3 – 341–6c.
427. McKay G.J. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. / G. J. McKay, C. C. Patterson, U. Chakravarthy, S. Dasari, C. C. Klaver, J. R. Vingerling, L. Ho, P. T. V. M. de Jong, A. E. Fletcher, I. S. Young, J. H. Seland,

- M. Rahu, G. Soubrane, L. Tomazzoli, F. Topouzis, J. Vioque, A. D. Hingorani, R. Sofat, M. Dean, J. Sawitzke, J. M. Seddon, I. Peter, A. R. Webster, A. T. Moore, J. R. W. Yates, V. Cipriani, L. G. Fritsche, B. H. F. Weber, C. N. Keilhauer, A. J. Lotery, S. Ennis, M. L. Klein, P. J. Francis, D. Stambolian, A. Orlin, M. B. Gorin, D. E. Weeks, C.-L. Kuo, A. Swaroop, M. Othman, A. Kanda, W. Chen, G. R. Abecasis, A. F. Wright, C. Hayward, P. N. Baird, R. H. Guymer, J. Attia, A. Thakkinstian, G. Silvestri // *Hum. Mutat.* – 2011. – T. 32 – № 12 – 1407–16c.
428. McKusick V.A. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. / V. A. McKusick // *Am. J. Hum. Genet.* – 2007. – T. 80 – № 4 – 588–604c.
429. McLaren W. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. / W. McLaren, B. Pritchard, D. Rios, Y. Chen, P. Flicek, F. Cunningham // *Bioinformatics* – 2010. – T. 26 – № 16 – 2069–70c.
430. Melé M. The human transcriptome across tissues and individuals. / M. Melé, P. G. Ferreira, F. Reverter, D. S. DeLuca, J. Monlong, M. Sammeth, T. R. Young, J. M. Goldmann, D. D. Pervouchine, T. J. Sullivan, R. Johnson, A. V Segrè, S. Djebali, A. Niarchou, T. Gte. Consortium, F. A. Wright, T. Lappalainen, M. Calvo, G. Getz, E. T. Dermitzakis, K. G. Ardlie, R. Guigó // *Science* – 2015. – T. 348 – № 6235 – 660–665c.
431. Merkin J. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in Mammalian tissues. / J. Merkin, C. Russell, P. Chen, C. B. Burge // *Science* – 2012. – T. 338 – № 6114 – 1593–9c.
432. Merle N.S. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. / N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina // *Front. Immunol.* – 2015. – T. 6 – 262c.
433. Mertens C. Different functional modes of p300 in activation of RNA polymerase III transcription from chromatin templates. / C. Mertens, R. G. Roeder // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – T. 28 – № 18 – 5764–76c.
434. Miller J.A. Divergence of human and mouse brain transcriptome highlights Alzheimer disease pathways. / J. A. Miller, S. Horvath, D. H. Geschwind // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – T. 107 – № 28 – 12698–703c.
435. Miller J.W. Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. / J. W. Miller // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – T. 155 – № 1 – 1–35.e13c.
436. Miller S.E. The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM. / S. E. Miller, D. A. Sahlender, S. C. Graham, S. Höning, M. S. Robinson, A. A. Peden, D. J. Owen // *Cell* – 2011. – T. 147 – № 5 – 1118–31c.

437. Mills J.D. RNA-Seq analysis of the parietal cortex in Alzheimer's disease reveals alternatively spliced isoforms related to lipid metabolism. / J. D. Mills, T. Nalpathamkalam, H. I. L. Jacobs, C. Janitz, D. Merico, P. Hu, M. Janitz // *Neurosci. Lett.* – 2013. – T. 536 – 90–5c.
438. Misiak B. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease--the emerging role of systemic low-grade inflammation and adiposity. / B. Misiak, J. Leszek, A. Kiejna // *Brain Res. Bull.* – 2012. – T. 89 – № 3-4 – 144–9c.
439. Mitsui J. Genomic aspects of sporadic neurodegenerative diseases. / J. Mitsui, S. Tsuji // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – T. 452 – № 2 – 221–5c.
440. Miyazaki K. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse *Snurf/Snrpn* gene. / K. Miyazaki, C. K. Mapendano, T. Fuchigami, S. Kondo, T. Ohta, A. Kinoshita, K. Tsukamoto, K. Yoshiura, N. Niikawa, T. Kishino // *Gene* – 2009. – T. 432 – № 1-2 – 97–101c.
441. Mizumori S.J. Short- and long-term components of working memory in the rat. / S. J. Mizumori, V. Channon, M. R. Rosenzweig, E. L. Bennett // *Behav. Neurosci.* – 1987. – T. 101 – № 6 – 782–9c.
442. Mo J. Early growth response 1 (*Egr-1*) directly regulates GABAA receptor  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ , and  $\theta$  subunits in the hippocampus. / J. Mo, C.-H. Kim, D. Lee, W. Sun, H. W. Lee, H. Kim // *J. Neurochem.* – 2015. – T. 133 – № 4 – 489–500c.
443. Mochida Y. Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. / Y. Mochida, D. Parisuthiman, S. Pornprasertsuk-Damrongsri, P. Atsawasuwana, M. Sricholpech, A. L. Boskey, M. Yamauchi // *Matrix Biol.* – 2009. – T. 28 – № 1 – 44–52c.
444. Mondragón-Rodríguez S. Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease. / S. Mondragón-Rodríguez, G. Perry, X. Zhu, P. I. Moreira, M. C. Acevedo-Aquino, S. Williams // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2013. – T. 2013 – 940603c.
445. Mordes D. Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. / D. Mordes, X. Luo, A. Kar, D. Kuo, L. Xu, K. Fushimi, G. Yu, P. Sternberg, J. Y. Wu // *Mol. Vis.* – 2006. – T. 12 – 1259–71c.
446. Morgan B.P. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. / B. P. Morgan // *Immunobiology* – 2015.
447. Morris J.K. Is Alzheimer's disease a systemic disease? / J. K. Morris, R. A. Honea, E. D. Vidoni, R. H. Swerdlow, J. M. Burns // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – T. 1842 – № 9 – 1340–9c.
448. Mosher K.I. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. / K. I. Mosher, T. Wyss-Coray // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – T. 88 – № 4 – 594–604c.

449. Moskvina V. Analysis of genome-wide association studies of Alzheimer disease and of Parkinson disease to determine if these 2 diseases share a common genetic risk. / V. Moskvina, D. Harold, G. Russo, A. Vedernikov, M. Sharma, M. Saad, P. Holmans, J. M. Bras, F. Bettella, M. F. Keller, N. Nicolaou, J. Simón-Sánchez, J. R. Gibbs, C. Schulte, A. Durr, R. Guerreiro, D. Hernandez, A. Brice, H. Stefánsson, K. Majamaa, T. Gasser, P. Heutink, N. Wood, M. Martinez, A. B. Singleton, M. A. Nalls, J. Hardy, M. J. Owen, M. C. O'Donovan, J. Williams, H. R. Morris, N. M. Williams // *JAMA Neurol.* – 2013. – T. 70 – № 10 – 1268–76c.
450. Mousavi M. Genetic risk factors and age-related macular degeneration (AMD) / M. Mousavi, R. A. Armstrong // *J. Optom.* – 2013. – T. 6 – № 4 – 176–184c.
451. Muchnik C. Identification of PSEN2 mutation p.N141I in Argentine pedigrees with early-onset familial Alzheimer's disease. / C. Muchnik, N. Olivar, M. C. Dalmaso, P. J. Azurmendi, C. Liberczuk, L. Morelli, L. I. Brusco // *Neurobiol. Aging* – 2015.
452. Mullins D.N. CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. / D. N. Mullins, E. L. Crawford, S. A. Khuder, D.-A. Hernandez, Y. Yoon, J. C. Willey // *BMC Cancer* – 2005. – T. 5 – 141c.
453. Mullins R.F. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. / R. F. Mullins, S. R. Russell, D. H. Anderson, G. S. Hageman // *FASEB J.* – 2000. – T. 14 – № 7 – 835–46c.
454. Muraleva N.A. Efficacy of glucosamine alendronate alone & in combination with dihydroquercetin for treatment of osteoporosis in animal model. / N. A. Muraleva, E. N. Ofitserov, V. P. Tikhonov, N. G. Kolosova // *Indian J. Med. Res.* – 2012. – T. 135 – 221–7c.
455. Muraleva N.A. [Development of osteoporosis in prematurely aging OXYS rats]. / N. A. Muraleva, M. A. Sadovoï, N. G. Kolosova // *Adv. Gerontol. = Uspekhi Gerontol. / Ross. Akad. Nauk. Gerontol. Obs.* – 2010. – T. 23 – № 2 – 233–42c.
456. Murray M.E. Early Alzheimer's disease neuropathology detected by proton MR spectroscopy. / M. E. Murray, S. A. Przybelski, T. G. Lesnick, A. M. Liesinger, A. Spsychalla, B. Zhang, J. L. Gunter, J. E. Parisi, B. F. Boeve, D. S. Knopman, R. C. Petersen, C. R. Jack, D. W. Dickson, K. Kantarci // *J. Neurosci.* – 2014. – T. 34 – № 49 – 16247–55c.
457. Nadeau J.H. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. / J. H. Nadeau, J. B. Singer, A. Matin, E. S. Lander // *Nat. Genet.* – 2000. – T. 24 – № 3 – 221–5c.
458. Nägga K. Cerebral inflammation is an underlying mechanism of early death in Alzheimer's disease: a 13-year cause-specific multivariate mortality study. / K. Nägga, C.

- Wattmo, Y. Zhang, L.-O. Wahlund, S. Palmqvist // *Alzheimers. Res. Ther.* – 2014. – T. 6 – № 4 – 41c.
459. Nakagomi M. Synthetic retinoid Am80 results in improved exploratory and emotional behavior in the P8 substrain of senescence-accelerated mice. / M. Nakagomi, K. Shudo, A. Nakatani-Pawlak // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2013. – T. 104 – 1–9c.
460. Nakai A. Developmental changes in mitochondrial activity and energy metabolism in fetal and neonatal rat brain. / A. Nakai, Y. Taniuchi, H. Asakura, A. Oya, A. Yokota, T. Koshino, T. Araki // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 2000. – T. 121 – № 1 – 67–72c.
461. Nalls M.A. Genetic comorbidities in Parkinson's disease. / M. A. Nalls, M. Saad, A. J. Noyce, M. F. Keller, A. Schrag, J. P. Bestwick, B. J. Traynor, J. R. Gibbs, D. G. Hernandez, M. R. Cookson, H. R. Morris, N. Williams, T. Gasser, P. Heutink, N. Wood, J. Hardy, M. Martinez, A. B. Singleton // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – T. 23 – № 3 – 831–41c.
462. Neill T. Decorin: a guardian from the matrix. / T. Neill, L. Schaefer, R. V Iozzo // *Am. J. Pathol.* – 2012. – T. 181 – № 2 – 380–7c.
463. Nelson P.T. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. / P. T. Nelson, I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J. Castellani, B. J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, C. Duyckaerts, M. P. Frosch, V. Haroutunian, P. R. Hof, C. M. Hulette, B. T. Hyman, T. Iwatsubo, K. A. Jellinger, G. A. Jicha, E. Kövari, W. A. Kukull, J. B. Leverenz, S. Love, I. R. Mackenzie, D. M. Mann, E. Masliah, A. C. McKee, T. J. Montine, J. C. Morris, J. A. Schneider, J. A. Sonnen, D. R. Thal, J. Q. Trojanowski, J. C. Troncoso, T. Wisniewski, R. L. Woltjer, T. G. Beach // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2012. – T. 71 – № 5 – 362–81c.
464. Neroev V. V Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 4. Age-related eye disease. SkQ1 returns vision to blind animals. / V. V Neroev, M. M. Archipova, L. E. Bakeeva, A. Z. Fursova, E. N. Grigorian, A. Y. Grishanova, E. N. Iomdina, Z. N. Ivashchenko, L. A. Katargina, I. P. Khoroshilova-Maslova, O. V Kilina, N. G. Kolosova, E. P. Kopenkin, S. S. Korshunov, N. A. Kovaleva, Y. P. Novikova, P. P. Philippov, D. I. Pilipenko, O. V Robustova, V. B. Saprunova, I. I. Senin, M. V Skulachev, L. F. Sotnikova, N. A. Stefanova, N. K. Tikhomirova, I. V Tsapenko, A. I. Shchipanova, R. A. Zinovkin, V. P. Skulachev // *Biochem. Biokhimiia* – 2008. – T. 73 – № 12 – 1317–28c.
465. Ng P.C. Predicting deleterious amino acid substitutions. / P. C. Ng, S. Henikoff // *Genome Res.* – 2001. – T. 11 – № 5 – 863–74c.

466. Nielsen M.M. Identification of expressed and conserved human noncoding RNAs. / M. Nielsen, D. Tehler, S. Vang, F. Sudzina, J. Hedegaard, I. Nordentoft, T. F. Orntoft, A. H. Lund, J. S. Pedersen // *RNA* – 2014. – T. 20 – № 2 – 236–51c.
467. Nilsson S. Rat-mouse and rat-human comparative maps based on gene homology and high-resolution zoo-FISH. / S. Nilsson, K. Helou, A. Walentinsson, C. Szpirer, O. Nerman, F. Ståhl // *Genomics* – 2001. – T. 74 – № 3 – 287–98c.
468. Ning A. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. / A. Ning, J. Cui, E. To, K. H. Ashe, J. Matsubara // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2008. – T. 49 – № 11 – 5136–43c.
469. Nioka S. Relationship between intracellular pH and energy metabolism in dog brain as measured by <sup>31</sup>P-NMR. / S. Nioka, B. Chance, M. Hilberman, H. V Subramanian, J. S. Leigh, R. L. Veech, R. E. Forster // *J. Appl. Physiol.* – 1987. – T. 62 – № 5 – 2094–102c.
470. Nolan J.M. Macular pigment, visual function, and macular disease among subjects with Alzheimer's disease: an exploratory study. / J. M. Nolan, E. Loskutova, A. N. Howard, R. Moran, R. Mulcahy, J. Stack, M. Bolger, J. Dennison, K. O. Akuffo, N. Owens, D. I. Thurnham, S. Beatty // *J. Alzheimers. Dis.* – 2014. – T. 42 – № 4 – 1191–202c.
471. Nookala A.R. HIV-1 Tat-mediated induction of CCL5 in astrocytes involves NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\gamma$  transcription factors and JAK, PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways. / A. R. Nookala, A. Shah, R. J. Noel, A. Kumar // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 11 – e78855c.
472. Nowak J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. / J. Z. Nowak // *Pharmacol. Rep.* – T. 58 – № 3 – 353–63c.
473. O'Dushlaine C. Molecular pathways involved in neuronal cell adhesion and membrane scaffolding contribute to schizophrenia and bipolar disorder susceptibility. / C. O'Dushlaine, E. Kenny, E. Heron, G. Donohoe, M. Gill, D. Morris, A. Corvin // *Mol. Psychiatry* – 2011. – T. 16 – № 3 – 286–92c.
474. Obukhova L.A. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats. / L. A. Obukhova, V. P. Skulachev, N. G. Kolosova // *Aging (Albany. NY)*. – 2009. – T. 1 – № 4 – 389–401c.
475. Obulesu M. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. / M. Obulesu, M. J. Lakshmi // *Neurochem. Res.* – 2014. – T. 39 – № 12 – 2301–12c.
476. Ohno-Matsui K. Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease. / K. Ohno-Matsui // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2011. – T. 30 – № 4 – 217–38c.

477. Ong J.M. Effects of cholesterol and apolipoprotein E on retinal abnormalities in ApoE-deficient mice. / J. M. Ong, N. C. Zorapapel, K. A. Rich, R. E. Wagstaff, R. W. Lambert, S. E. Rosenberg, F. Moghaddas, A. Pirouzmanesh, A. M. Aoki, M. C. Kenney // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – T. 42 – № 8 – 1891–900c.
478. Oshlack A. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. / A. Oshlack, M. J. Wakefield // *Biol. Direct* – 2009. – T. 4 – 14c.
479. Otsen M. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the rat. / M. Otsen, M. den Bieman, M. T. Kuiper, M. Pravenec, V. Kren, T. W. Kurtz, H. J. Jacob, A. Lankhorst, B. F. van Zutphen // *Genomics* – 1996. – T. 37 – № 3 – 289–94c.
480. Ou J.-R. Heat shock protein 90 in Alzheimer's disease. / J.-R. Ou, M.-S. Tan, A.-M. Xie, J.-T. Yu, L. Tan // *Biomed Res. Int.* – 2014. – T. 2014 – 796869c.
481. Pahnke J. Cerebral ABC transporter-common mechanisms may modulate neurodegenerative diseases and depression in elderly subjects. / J. Pahnke, C. Fröhlich, K. Paarmann, M. Krohn, N. Bogdanovic, D. Årslund, B. Winblad // *Arch. Med. Res.* – 2014. – T. 45 – № 8 – 738–43c.
482. Pallas M. From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). / M. Pallas, A. Camins, M. A. Smith, G. Perry, H. Lee, G. Casadesus // *J. Alzheimers. Dis.* – 2008. – T. 15 – № 4 – 615–24c.
483. Pan P. Brain phenotype of carbonic anhydrase IX-deficient mice. / P. Pan, A.-K. Parkkila, S. Autio, M. Hilvo, R. Sormunen, S. Pastorekova, J. Pastorek, H. Haapasalo, S. Parkkila // *Transgenic Res.* – 2012. – T. 21 – № 1 – 163–76c.
484. Panza F. Age-related hearing impairment-a risk factor and frailty marker for dementia and AD. / F. Panza, V. Solfrizzi, G. Logroscino // *Nat. Rev. Neurol.* – 2015. – T. 11 – № 3 – 166–75c.
485. Parisi V. Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients. / V. Parisi, R. Restuccia, F. Fattapposta, C. Mina, M. G. Bucci, F. Pierelli // *Clin. Neurophysiol.* – 2001. – T. 112 – № 10 – 1860–7c.
486. Parkin S.E. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (I $\epsilon$ /EBP). / S. E. Parkin, M. Baer, T. D. Copeland, R. C. Schwartz, P. F. Johnson // *J. Biol. Chem.* – 2002. – T. 277 – № 26 – 23563–72c.
487. Parnell M. Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models. / M. Parnell, L. Guo, M. Abdi, M. F. Cordeiro // *Int. J. Alzheimers. Dis.* – 2012. – T. 2012 – 786494c.
488. Pasmooij A.M.G. Natural gene therapy may occur in all patients with generalized non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa with COL17A1 mutations. / A. M. G. Pasmooij, M.



- Nijenhuis, R. Brander, M. F. Jonkman // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – T. 132 – № 5 – 1374–83c.
489. Pastorino L. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. / L. Pastorino, A. Sun, P.-J. Lu, X. Z. Zhou, M. Balastik, G. Finn, G. Wulf, J. Lim, S.-H. Li, X. Li, W. Xia, L. K. Nicholson, K. P. Lu // *Nature* – 2006. – T. 440 – № 7083 – 528–34c.
490. Patrick G.N. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. / G. N. Patrick, L. Zukerberg, M. Nikolic, S. de la Monte, P. Dikkes, L. H. Tsai // *Nature* – 1999. – T. 402 – № 6762 – 615–22c.
491. Pauer G.J.T. Protective effect of paraoxonase 1 gene variant Gln192Arg in age-related macular degeneration. / G. J. T. Pauer, G. M. Sturgill, N. S. Peachey, S. A. Hagstrom // *Am. J. Ophthalmol.* – 2010. – T. 149 – № 3 – 513–22c.
492. Pei J.-J. Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. / J.-J. Pei, E. Braak, H. Braak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, B. Winblad, R. F. Cowburn // *J. Alzheimers. Dis.* – 2001. – T. 3 – № 1 – 41–48c.
493. Pennesi M.E. Animal models of age related macular degeneration. / M. E. Pennesi, M. Neuringer, R. J. Courtney // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – T. 33 – № 4 – 487–509c.
494. Penrod N.M. Systems genetics for drug target discovery. / N. M. Penrod, R. Cowper-Sal-lari, J. H. Moore // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2011. – T. 32 – № 10 – 623–30c.
495. Perez S.E. Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup> transgenic mouse model of Alzheimer's disease. / S. E. Perez, S. Lumayag, B. Kovacs, E. J. Mufson, S. Xu // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – T. 50 – № 2 – 793–800c.
496. Perings S.M. Age-related decline of PCr/ATP-ratio in progressively hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. / S. M. Perings, K. Schulze, U. Decking, M. Kelm, B. E. Strauer // *Heart Vessels* – 2000. – T. 15 – № 4 – 197–202c.
497. Perry V.H. Microglial priming in neurodegenerative disease. / V. H. Perry, C. Holmes // *Nat. Rev. Neurol.* – 2014. – T. 10 – № 4 – 217–24c.
498. Petersen G. RatMap--rat genome tools and data. / G. Petersen, P. Johnson, L. Andersson, K. Klinga-Levan, P. M. Gómez-Fabre, F. Ståhl // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – T. 33 – № Database issue – D492–4c.
499. Petrukhin K. Pharmacological inhibition of lipofuscin accumulation in the retina as a therapeutic strategy for dry AMD treatment. / K. Petrukhin // *Drug Discov. Today. Ther. Strateg.* – 2013. – T. 10 – № 1 – e11–e20c.

500. Pettegrew J.W. Changes in brain energy and phospholipid metabolism during development and aging in the Fischer 344 rat. / J. W. Pettegrew, K. Panchalingam, G. Withers, D. McKeag, S. Strychor // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1990. – T. 49 – № 3 – 237–49c.
501. Phillips M.C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. / M. C. Phillips // *IUBMB Life* – 2014. – T. 66 – № 9 – 616–23c.
502. Pickrell J.K. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. / J. K. Pickrell, J. C. Marioni, A. A. Pai, J. F. Degner, B. E. Engelhardt, E. Nkadori, J.-B. Veyrieras, M. Stephens, Y. Gilad, J. K. Pritchard // *Nature* – 2010. – T. 464 – № 7289 – 768–72c.
503. Pinho C.M. Mitochondrial import and degradation of amyloid- $\beta$  peptide. / C. M. Pinho, P. F. Teixeira, E. Glaser // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – T. 1837 – № 7 – 1069–74c.
504. Plaschke K. Interrelation between cerebral energy metabolism and behaviour in a rat model of permanent brain vessel occlusion. / K. Plaschke, S. W. Yun, E. Martin, S. Hoyer, H. J. Bardenheuer // *Brain Res.* – 1999. – T. 830 – № 2 – 320–9c.
505. Ploper D. MITF drives endolysosomal biogenesis and potentiates Wnt signaling in melanoma cells. / D. Ploper, V. F. Taelman, L. Robert, B. S. Perez, B. Titz, H.-W. Chen, T. G. Graeber, E. von Euw, A. Ribas, E. M. De Robertis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – T. 112 – № 5 – E420–9c.
506. Pretorius P.R. Identification and functional analysis of the vision-specific BBS3 (ARL6) long isoform. / P. R. Pretorius, L. M. Baye, D. Y. Nishimura, C. C. Searby, K. Bugge, B. Yang, R. F. Mullins, E. M. Stone, V. C. Sheffield, D. C. Slusarski // *PLoS Genet.* – 2010. – T. 6 – № 3 – e1000884c.
507. Price J.L. Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer’s disease. / J. L. Price, J. C. Morris // *Ann. Neurol.* – 1999. – T. 45 – № 3 – 358–68c.
508. Priller C. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. / C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar, J. Herms // *J. Neurosci.* – 2006. – T. 26 – № 27 – 7212–21c.
509. Proitsi P. Alzheimer’s disease and age-related macular degeneration have different genetic models for complement gene variation. / P. Proitsi, M. K. Lupton, F. Dudbridge, M. Tsolaki, G. Hamilton, M. Daniilidou, M. Pritchard, K. Lord, B. M. Martin, J. Johnson, D. Craig, S. Todd, B. McGuinness, P. Hollingworth, D. Harold, I. Kloszewska, H. Soininen, P. Mecocci, B. Velas, M. Gill, B. Lawlor, D. C. Rubinsztein, C. Brayne, P. A. Passmore, J. Williams, S. Lovestone, J. F. Powell // *Neurobiol. Aging* – 2012. – T. 33 – № 8 – 1843.e9–17c.
510. Querfurth H.W. Alzheimer’s disease. / H. W. Querfurth, F. M. LaFerla // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – T. 362 – № 4 – 329–44c.

511. Quigley H.A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. / H. A. Quigley, A. T. Broman // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – T. 90 – № 3 – 262–7c.
512. Rabchevsky A.G. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. / A. G. Rabchevsky, P. G. Sullivan, I. Fugaccia, S. W. Scheff // *J. Neurotrauma* – 2003. – T. 20 – № 7 – 659–69c.
513. Rajagopalan P. TREM2 and neurodegenerative disease / P. Rajagopalan, D. P. Hibar, P. M. Thompson // *N Engl J Med.* – 2013. – 369. – P. 1565–1567.
514. Ramanan V.K. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. / V. K. Ramanan, A. J. Saykin // *Am. J. Neurodegener. Dis.* – 2013. – T. 2 – № 3 – 145–75c.
515. Rapaport F. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. / F. Rapaport, R. Khanin, Y. Liang, M. Pirun, A. Krek, P. Zumbo, C. E. Mason, N. D. Socci, D. Betel // *Genome Biol.* – 2013. – T. 14 – № 9 – R95c.
516. Rapp J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. / J. P. Rapp // *Physiol. Rev.* – 2000. – T. 80 – № 1 – 135–72c.
517. Rapp J.P. Detection and positional cloning of blood pressure quantitative trait loci: is it possible? Identifying the genes for genetic hypertension. / J. P. Rapp, A. Y. Deng // *Hypertension* – 1995. – T. 25 – № 6 – 1121–8c.
518. Ratnapriya R. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. / R. Ratnapriya, E. Y. Chew // *Clin. Genet.* – 2013. – T. 84 – № 2 – 160–6c.
519. Ratnapriya R. Genetic architecture of retinal and macular degenerative diseases: the promise and challenges of next-generation sequencing. / R. Ratnapriya, A. Swaroop // *Genome Med.* – 2013. – T. 5 – № 10 – 84c.
520. Ratnayaka J.A. Dementia of the eye: the role of amyloid beta in retinal degeneration. / J. A. Ratnayaka, L. C. Serpell, A. J. Lotery // *Eye (Lond).* – 2015. – T. 29 – № 8 – 1013–26c.
521. Rattner A. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. / A. Rattner, J. Nathans // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – T. 7 – № 11 – 860–72c.
522. Raychaudhuri S. A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. / S. Raychaudhuri, O. Iartchouk, K. Chin, P. L. Tan, A. K. Tai, S. Ripke, S. Gowrisankar, S. Vemuri, K. Montgomery, Y. Yu, R. Reynolds, D. J. Zack, B. Campochiaro, P. Campochiaro, N. Katsanis, M. J. Daly, J. M. Seddon // *Nat. Genet.* – 2011. – T. 43 – № 12 – 1232–6c.
523. Rhinn H. Integrative genomics identifies APOE ε4 effectors in Alzheimer's disease / H. Rhinn, R. Fujita, L. Qiang, R. Cheng, J. H. Lee, A. Abeliovich // *Nature.* – 2013. – 500. – P. 45–50.

524. Rebeck G.W. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. / G. W. Rebeck, J. S. Reiter, D. K. Strickland, B. T. Hyman // *Neuron*. – 1993. – T. 11 – № 4 – 575–80c.
525. Redina O.E. Rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH strain) display specific quantitative trait loci for blood pressure and for body and kidney weight on chromosome 1. / O. E. Redina, N. A. Machanova, V. M. Efimov, A. L. Markel // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – T. 33 – № 5-6 – 456–64c.
526. Reed-Geaghan E.G. Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. / E. G. Reed-Geaghan, Q. W. Reed, P. E. Cramer, G. E. Landreth // *J. Neurosci.* – 2010. – T. 30 – № 46 – 15369–73c.
527. Reitz C. The role of the retromer complex in aging-related neurodegeneration: a molecular and genomic review. / C. Reitz // *Mol. Genet. Genomics* – 2015. – T. 290 – № 2 – 413–27c.
528. Reitz C. Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. / C. Reitz, M.-X. Tang, J. Luchsinger, R. Mayeux // *Arch. Neurol.* – 2004. – T. 61 – № 5 – 705–14c.
529. Rhein V. Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. / V. Rhein, G. Baysang, S. Rao, F. Meier, A. Bonert, F. Müller-Spahn, A. Eckert // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2009. – T. 29 – № 6-7 – 1063–71c.
530. Rienzo M. RNA-Seq for the identification of novel Mediator transcripts in endothelial progenitor cells. / M. Rienzo, V. Costa, M. Scarpato, C. Schiano, A. Casamassimi, V. Grimaldi, A. Ciccodicola, C. Napoli // *Gene* – 2014. – T. 547 – № 1 – 98–105c.
531. Riley K.P. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study. / K. P. Riley, D. A. Snowdon, W. R. Markesbery // *Ann. Neurol.* – 2002. – T. 51 – № 5 – 567–77c.
532. Risacher S.L. Visual contrast sensitivity in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and older adults with cognitive complaints. / S. L. Risacher, D. Wudunn, S. M. Pepin, T. R. MaGee, B. C. McDonald, L. A. Flashman, H. A. Wishart, H. S. Pixley, L. A. Rabin, N. Paré, J. J. Englert, E. Schwartz, J. R. Curtain, J. D. West, D. P. O'Neill, R. B. Santulli, R. W. Newman, A. J. Saykin // *Neurobiol. Aging* – 2013. – T. 34 – № 4 – 1133–44c.
533. Risch N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. / N. J. Risch // *Nature* – 2000. – T. 405 – № 6788 – 847–56c.
534. Rivera A. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease

- risk. / A. Rivera, S. A. Fisher, L. G. Fritsche, C. N. Keilhauer, P. Lichtner, T. Meitinger, B. H. F. Weber // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – T. 14 – № 21 – 3227–36c.
535. Rizzo V. Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons. / V. Rizzo, J. Richman, S. V Puthanveetil // *Front. Aging Neurosci.* – 2014. – T. 6 – 337c.
536. Robertson I.H. A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. / I. H. Robertson // *Neurobiol. Aging* – 2013. – T. 34 – № 1 – 298–308c.
537. Rogers J. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. / J. Rogers, N. R. Cooper, S. Webster, J. Schultz, P. L. McGeer, S. D. Styren, W. H. Civin, L. Brachova, B. Bradt, P. Ward // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1992. – T. 89 – № 21 – 10016–20c.
538. Rogozin I.B. Gene family level comparative analysis of gene expression in mammals validates the ortholog conjecture. / I. B. Rogozin, D. Managadze, S. A. Shabalina, E. V Koonin // *Genome Biol. Evol.* – 2014. – T. 6 – № 4 – 754–62c.
539. Rohan R.M. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. / R. M. Rohan, A. Fernandez, T. Udagawa, J. Yuan, R. J. D'Amato // *FASEB J.* – 2000. – T. 14 – № 7 – 871–6c.
540. Rosso S.B. WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. / S. B. Rosso, N. C. Inestrosa // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – T. 7 – 103c.
541. Rougemont J. Computational analysis of protein-DNA interactions from ChIP-seq data. / J. Rougemont, F. Naef // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 786 – 263–73c.
542. Ruan Y. Loss of Yme1L perturbs mitochondrial dynamics. / Y. Ruan, H. Li, K. Zhang, F. Jian, J. Tang, Z. Song // *Cell Death Dis.* – 2013. – T. 4 – e896c.
543. Rudnicka A.R. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. / A. R. Rudnicka, Z. Jarrar, R. Wormald, D. G. Cook, A. Fletcher, C. G. Owen // *Ophthalmology* – 2012. – T. 119 – № 3 – 571–80c.
544. Ruggiero R. Mitosis in neurons: Roughex and APC/C maintain cell cycle exit to prevent cytokinetic and axonal defects in *Drosophila* photoreceptor neurons. / R. Ruggiero, A. Kale, B. Thomas, N. E. Baker // *PLoS Genet.* – 2012. – T. 8 – № 11 – e1003049c.
545. Rummyantseva Y. V Changes in physicochemical parameters and alpha-crystallin expression in the lens during cataract development in OXYS rats. 5. / Y. V Rummyantseva, A. Z. Fursova, L. A. Fedoseeva, N. G. Kolosova // *Biochem. Biokhimiia* – 2008. – T. 73 – № 11 – 1176–82c.
546. Ryman D. Genetic loci modulating amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. / D. Ryman, Y. Gao, B. T. Lamb // *Neurobiol. Aging* – 2008. – T. 29 – № 8 – 1190–8c.

547. Saad Y. Fine-mapping and comprehensive transcript analysis reveals nonsynonymous variants within a novel 1.17 Mb blood pressure QTL region on rat chromosome 10. / Y. Saad, M. R. Garrett, E. Manickavasagam, S. Yerga-Woolwine, P. Farms, T. Radecki, B. Joe // *Genomics* – 2007. – T. 89 – № 3 – 343–53c.
548. Sabharwal P. Novel immunological approaches for the treatment of Alzheimer's disease. / P. Sabharwal, T. Wisniewski // *Zhongguo xian dai shen jing ji bing za zhi* – 2014. – T. 14 – № 3 – 139–151c.
549. Sadee W. Missing heritability of common diseases and treatments outside the protein-coding exome. / W. Sadee, K. Hartmann, M. Seweryn, M. Pietrzak, S. K. Handelman, G. A. Rempala // *Hum. Genet.* – 2014. – T. 133 – № 10 – 1199–215c.
550. Sagin F.G. Lipids as key players in Alzheimer disease: alterations in metabolism and genetics. / F. G. Sagin, E. Y. Sozmen // *Curr. Alzheimer Res.* – 2008. – T. 5 – № 1 – 4–14c.
551. Sahay S. Familial Parkinson disease-associated mutations alter the site-specific microenvironment and dynamics of  $\alpha$ -synuclein. / S. Sahay, D. Ghosh, S. Dwivedi, A. Anoop, G. M. Mohite, M. Kombrabail, G. Krishnamoorthy, S. K. Maji // *J. Biol. Chem.* – 2015. – T. 290 – № 12 – 7804–22c.
552. Saito H. Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. / H. Saito, K.-I. Yasumoto, K. Takeda, K. Takahashi, H. Yamamoto, S. Shibahara // *Pigment Cell Res.* – 2003. – T. 16 – № 3 – 261–5c.
553. Salganik R.I. Impairment of respiratory functions in mitochondria of rats with an inherited hyperproduction of free radicals. / R. I. Salganik, I. G. Shabalina, N. A. Solovyova, N. G. Kolosova, V. N. Solovyov, A. R. Kolpakov // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – T. 205 – № 1 – 180–5c.
554. Sanchez-Ruiz J.M. Protein kinetic stability. / J. M. Sanchez-Ruiz // *Biophys. Chem.* – 2010. – T. 148 – № 1-3 – 1–15c.
555. SanGiovanni J.P. Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. / J. P. SanGiovanni, D. E. Arking, S. K. Iyengar, M. Elashoff, T. E. Clemons, G. F. Reed, A. K. Henning, T. A. Sivakumaran, X. Xu, A. DeWan, E. Agrón, E. Roichtchina, C. M. Sue, J. J. Wang, P. Mitchell, J. Hoh, P. J. Francis, M. L. Klein, E. Y. Chew, A. Chakravarti // *PLoS One* – 2009. – T. 4 – № 5 – e5508c.
556. Sankowski R. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. / R. Sankowski, S. Mader, S. I. Valdés-Ferrer // *Front. Cell. Neurosci.* – 2015. – T. 9 – 28c.

557. Saprunova V.B. SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of wistar and OXYS rats. / V. B. Saprunova, M. A. Lelekova, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva // *Biochem. Biokhimiia* – 2012. – T. 77 – № 6 – 648–58c.
558. Saraceno C. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. / C. Saraceno, S. Musardo, E. Marcello, S. Pelucchi, M. Di Luca // *Front. Pharmacol.* – 2013. – T. 4 – 77c.
559. Sarkar A. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. / A. Sarkar, S. Mitra, S. Mehta, R. Raices, M. D. Wewers // *PLoS One* – 2009. – T. 4 – № 9 – e7140c.
560. Saunders A. M. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease / A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. Schmechel, P. H. George-Hyslop, M.A. Pericak-Vance, S. H. Joo, B.L. Rosi, J. F. Gusella, D.R. Crapper-MacLachlan, M. J. Alberts, et al. // *Neurology*. – 1993. – 43. – P. 1467–1472.
561. Savvateeva-Popova E. Non-coding RNA as a trigger of neuropathologic disorder phenotypes in transgenic *Drosophila*. / E. Savvateeva-Popova, A. Popov, A. Grossman, E. Nikitina, A. Medvedeva, D. Molotkov, N. Kamyshev, K. Pyatkov, O. Zatsepina, N. Schostak, E. Zelentsova, G. Pavlova, D. Panteleev, P. Riederer, M. Evgen'ev // *J. Neural Transm.* – 2008. – T. 115 – № 12 – 1629–42c.
562. Sayi J.G. Apolipoprotein E polymorphism in elderly east Africans. / J. G. Sayi, N. B. Patel, D. R. Premkumar, A. Adem, B. Winblad, W. B. Matuja, E. P. Mtui, S. Gatere, R. P. Friedland, E. Koss, R. N. Kalaria // *East Afr. Med. J.* – 1997. – T. 74 – № 10 – 668–70c.
563. Schauwecker P.E. Congenic strains provide evidence that a mapped locus on chromosome 15 influences excitotoxic cell death. / P. E. Schauwecker // *Genes. Brain. Behav.* – 2011. – T. 10 – № 1 – 100–10c.
564. Schipper H.M. A heme oxygenase-1 transducer model of degenerative and developmental brain disorders. / H. M. Schipper, W. Song // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – T. 16 – № 3 – 5400–19c.
565. Schlessinger K. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. / K. Schlessinger, A. Hall, N. Tolwinski // *Genes Dev.* – 2009. – T. 23 – № 3 – 265–77c.
566. Schmand B. Meta-analysis of CSF and MRI biomarkers for detecting preclinical Alzheimer's disease. / B. Schmand, H. M. Huizenga, W. A. van Gool // *Psychol. Med.* – 2010. – T. 40 – № 1 – 135–45c.
567. Schmidt V. Apolipoprotein E receptor pathways in Alzheimer disease / V. Schmidt, A. S. Carlo, T. E. Willnow // *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* – 2014. – 6. – P. 255–270.
568. Schöbel S. A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. / S. Schöbel, S. Neumann, M. Hertweck, B. Dislich,

- P.-H. Kuhn, E. Kremmer, B. Seed, R. Baumeister, C. Haass, S. F. Lichtenthaler // *J. Biol. Chem.* – 2008. – T. 283 – № 21 – 14257–68c.
569. Scholl H.P.N. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. / H. P. N. Scholl, P. Charbel Issa, M. Walier, S. Janzer, B. Pollok-Kopp, F. Börncke, L. G. Fritsche, N. V Chong, R. Fimmers, T. Wienker, F. G. Holz, B. H. F. Weber, M. Oppermann // *PLoS One* – 2008. – T. 3 – № 7 – e2593c.
570. Schultz D.W. Lack of an association of apolipoprotein E gene polymorphisms with familial age-related macular degeneration. / D. W. Schultz, M. L. Klein, A. Humpert, J. Majewski, M. Schain, R. G. Weleber, J. Ott, T. S. Acott // *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* – 2003. – T. 121 – № 5 – 679–83c.
571. Schultz D.W. Lack of an association of apolipoprotein E gene polymorphisms with familial age-related macular degeneration. / D. W. Schultz, M. L. Klein, A. Humpert, J. Majewski, M. Schain, R. G. Weleber, J. Ott, T. S. Acott // *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* – 2003. – T. 121 – № 5 – 679–83c.
572. Schweitzer K. CSN-associated USP48 confers stability to nuclear NF- $\kappa$ B/RelA by trimming K48-linked Ub-chains. / K. Schweitzer, M. Naumann // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – T. 1853 – № 2 – 453–69c.
573. Scott E.L. Estrogen regulation of Dkk1 and Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in neurodegenerative disease. / E. L. Scott, D. W. Brann // *Brain Res.* – 2013. – T. 1514 – 63–74c.
574. Seddon J.M. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. / J. M. Seddon, R. Reynolds, Y. Yu, M. J. Daly, B. Rosner // *Ophthalmology* – 2011. – T. 118 – № 11 – 2203–11c.
575. Sergeeva S. Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism. / S. Sergeeva, E. Bagryanskaya, E. Korbolina, N. Kolosova // *Exp. Gerontol.* – 2006. – T. 41 – № 2 – 141–50c.
576. Seripa D. The genetics of the human APOE polymorphism. / D. Seripa, G. D'Onofrio, F. Panza, L. Cascavilla, C. Masullo, A. Pilotto // *Rejuvenation Res.* – 2011. – T. 14 – № 5 – 491–500c.
577. Serpente M. Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment. / M. Serpente, R. Bonsi, E. Scarpini, D. Galimberti // *Neuroimmunomodulation* – 2014. – T. 21 – № 2-3 – 79–87c.
578. Serrano-Pozo A. APOE $\epsilon$ 2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer disease. / A. Serrano-Pozo, J. Qian, S. E. Monsell, R. A. Betensky, B. T. Hyman // *Ann. Neurol.* – 2015. – T. 77 – № 6 – 917–29c.



579. Serý O. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. / O. Serý, J. Povová, I. Míšek, L. Pešák, V. Janout // *Folia Neuropathol.* – 2013. – T. 51 – № 1 – 1–9c.
580. Seth A. Complement-associated deposits in the human retina. / A. Seth, J. Cui, E. To, M. Kwee, J. Matsubara // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2008. – T. 49 – № 2 – 743–50c.
581. Shabalina I.G. [Oxidative phosphorylation activity, F0F1-ATPase and level of liver mitochondrial cytochromes in rats with congenitally increased ability for free radical formation]. / I. G. Shabalina, N. G. Kolosova, A. I. Grishanova, V. N. Solov'ev, R. I. Salganik, N. A. Solov'eva // *Biokhimiia* (Moscow, Russ. – 1995. – T. 60 – № 12 – 2045–52c.
582. Shah S. sorLA: sorting out APP. / S. Shah, G. Yu // *Mol. Interv.* – 2006. – T. 6 – № 2 – 74–6, 58c.
583. Shang F. Roles for the ubiquitin-proteasome pathway in protein quality control and signaling in the retina: implications in the pathogenesis of age-related macular degeneration. / F. Shang, A. Taylor // *Mol. Aspects Med.* – 2012. – T. 33 – № 4 – 446–66c.
584. Sharma P.C. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. / P. C. Sharma, A. Grover, G. Kahl // *Trends Biotechnol.* – 2007. – T. 25 – № 11 – 490–8c.
585. Sharma Y. V Protective gene expression changes elicited by an inherited defect in photoreceptor structure. / Y. V Sharma, R. I. Cojocaru, L. M. Ritter, N. Khattree, M. Brooks, A. Scott, A. Swaroop, A. F. X. Goldberg // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 2 – e31371c.
586. Shea T.B. Cyclin-dependent kinase 5 increases perikaryal neurofilament phosphorylation and inhibits neurofilament axonal transport in response to oxidative stress. / T. B. Shea, Y.-L. Zheng, D. Ortiz, H. C. Pant // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – T. 76 – № 6 – 795–800c.
587. Shen W. Expression of creatine kinase isoenzyme genes during postnatal development of rat brain cerebellum: evidence for transcriptional regulation. / W. Shen, D. Willis, Y. Zhang, U. Schlattner, T. Wallimann, G. R. Molloy // *Biochem. J.* – 2002. – T. 367 – № Pt 2 – 369–80c.
588. Sher R.B. A major QTL on mouse chromosome 17 resulting in lifespan variability in SOD1-G93A transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. / R. B. Sher, T. D. Heiman-Patterson, E. A. Blankenhorn, J. Jiang, G. Alexander, J. S. Deitch, G. A. Cox // *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* – 2014. – T. 15 – № 7-8 – 588–600c.
589. Shi H. Genetic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium, Morgan K; Alzheimer's Research UK Consortium. Genetic variants influencing human aging from late-onset Alzheimer's disease (LOAD) genome-wide association studies (GWAS) / H. Shi, O. Belbin, C. Medway, K. Brown, N. Kalsheker, M. Carrasquillo, P. Proitsi, J. Powell, S.

- Lovestone, A. Goate, S. Younkin, P. Passmore // *Neurobiol Aging*. – 2012. – 33. – P. 1849. e5–e18.
590. Shimkets R.A. Recent advances in the molecular genetics of hypertension. / R. A. Shimkets, R. P. Lifton // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. – 1996. – T. 5 – № 2 – 162–5c.
591. Shokouhi S. Longitudinal progression of cognitive decline correlates with changes in the spatial pattern of brain 18F-FDG PET. / S. Shokouhi, D. Claassen, H. Kang, Z. Ding, B. Rogers, A. Mishra, W. R. Riddle // *J. Nucl. Med*. – 2013. – T. 54 – № 9 – 1564–9c.
592. Shukla V. Oxidative stress in neurodegeneration. / V. Shukla, S. K. Mishra, H. C. Pant // *Adv. Pharmacol. Sci*. – 2011. – T. 2011 – 572634c.
593. Silva A.R.T. Transcriptional alterations related to neuropathology and clinical manifestation of Alzheimer's disease. / A. R. T. Silva, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, B. S. Diniz, L. A. Lima, P. J. S. Silva, R. E. L. Ferretti, R. M. Rocha, W. J. Filho, D. M. Carraro, H. Brentani // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 11 – e48751c.
594. Silva A.R.T. Repair of oxidative DNA damage, cell-cycle regulation and neuronal death may influence the clinical manifestation of Alzheimer's disease. / A. R. T. Silva, A. C. F. Santos, J. M. Farfel, L. T. Grinberg, R. E. L. Ferretti, A. H. J. F. M. Campos, I. W. Cunha, M. D. Begnami, R. M. Rocha, D. M. Carraro, C. A. de Bragança Pereira, W. Jacob-Filho, H. Brentani // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 6 – e99897c.
595. Sindi S. Advances in the prevention of Alzheimer's Disease. / S. Sindi, F. Mangialasche, M. Kivipelto // *F1000Prime Rep*. – 2015. – T. 7 – 50c.
596. Sirk D. Chronic exposure to sub-lethal beta-amyloid (A $\beta$ ) inhibits the import of nuclear-encoded proteins to mitochondria in differentiated PC12 cells. / D. Sirk, Z. Zhu, J. S. Wadia, N. Shulyakova, N. Phan, J. Fong, L. R. Mills // *J. Neurochem*. – 2007. – T. 103 – № 5 – 1989–2003c.
597. Sisternes L. de Quantitative SD-OCT imaging biomarkers as indicators of age-related macular degeneration progression. / L. de Sisternes, N. Simon, R. Tibshirani, T. Leng, D. L. Rubin // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2014. – T. 55 – № 11 – 7093–103c.
598. Sivak J.M. The aging eye: common degenerative mechanisms between the Alzheimer's brain and retinal disease. / J. M. Sivak // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2013. – T. 54 – № 1 – 871–80c.
599. Skaper S.D. Rodent retinal ganglion cell cultures. / S. D. Skaper // *Methods Mol. Biol*. – 2012. – T. 846 – 117–29c.
600. Smedley D. Walking the interactome for candidate prioritization in exome sequencing studies of Mendelian diseases. / D. Smedley, S. Köhler, J. C. Czeschik, J. Amberger, C.

- Bocchini, A. Hamosh, J. Veldboer, T. Zemojtel, P. N. Robinson // *Bioinformatics* – 2014. – T. 30 – № 22 – 3215–22c.
601. Smith A.G. Emerging treatments for wet age-related macular degeneration. / A. G. Smith, P. K. Kaiser // *Expert Opin. Emerg. Drugs* – 2014. – T. 19 – № 1 – 157–64c.
602. Sobrin L. Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. / L. Sobrin, J. M. Seddon // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2014. – T. 40 – 1–15c.
603. Song B. Inhibition of Polo-like kinase 1 reduces beta-amyloid-induced neuronal cell death in Alzheimer's disease. / B. Song, K. Davis, X. S. Liu, H. Lee, M. Smith, X. Liu // *Aging (Albany, NY)*. – 2011. – T. 3 – № 9 – 846–51c.
604. Song F. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. / F. Song, A. Poljak, G. A. Smythe, P. Sachdev // *Brain Res. Rev.* – 2009. – T. 61 – № 2 – 69–80c.
605. Song M.-G. Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. / M.-G. Song, S. Bail, M. Kiledjian // *RNA* – 2013. – T. 19 – № 3 – 390–9c.
606. Soreq L. Long non-coding RNA and alternative splicing modulations in Parkinson's leukocytes identified by RNA sequencing. / L. Soreq, A. Guffanti, N. Salomonis, A. Simchovitz, Z. Israel, H. Bergman, H. Soreq // *PLoS Comput. Biol.* – 2014. – T. 10 – № 3 – e1003517c.
607. Southan C. A tale of two drug targets: the evolutionary history of BACE1 and BACE2. / C. Southan, J. M. Hancock // *Front. Genet.* – 2013. – T. 4 – 293c.
608. Sperling R. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. / R. Sperling, E. Mormino, K. Johnson // *Neuron* – 2014. – T. 84 – № 3 – 608–22c.
609. Spires-Jones T.L. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. / T. L. Spires-Jones, W. H. Stoothoff, A. de Calignon, P. B. Jones, B. T. Hyman // *Trends Neurosci.* – 2009. – T. 32 – № 3 – 150–9c.
610. Spisak K. rs2070424 of the SOD1 gene is associated with risk of Alzheimer's disease. / K. Spisak, A. Klimkowicz-Mrowiec, J. Pera, T. Dziedzic, G. Aleksandra, A. Slowik // *Neurol. Neurochir. Pol.* – 2014. – T. 48 – № 5 – 342–5c.
611. Stark C. BioGRID: a general repository for interaction datasets. / C. Stark, B.-J. Breitkreutz, T. Reguly, L. Boucher, A. Breitkreutz, M. Tyers // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – T. 34 – № Database issue – D535–9c.
612. Stefanova N.A. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats. / N. A. Stefanova, A. Z. Fursova, N. G. Kolosova // *J. Alzheimers. Dis.* – 2010. – T. 21 – № 2 – 479–91c.

613. Stefanova N.A. Effects of *Cistanche deserticola* on behavior and signs of cataract and retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats. / N. A. Stefanova, A. Z. Fursova, K. N. Sarsenbaev, N. G. Kolosova // *J. Ethnopharmacol.* – 2011. – T. 138 – № 2 – 624–32c.
614. Stefanova N.A. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. / N. A. Stefanova, O. S. Kozhevnikova, A. O. Vitovtov, K. Y. Maksimova, S. V Logvinov, E. A. Rudnitskaya, E. E. Korbolina, N. A. Muraleva, N. G. Kolosova // *Cell Cycle* – 2014. – T. 13 – № 6 – 898–909c.
615. Stefanova N.A. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology. / N. A. Stefanova, K. Y. Maksimova, E. Kiseleva, E. A. Rudnitskaya, N. A. Muraleva, N. G. Kolosova // *J. Pineal Res.* – 2015. – T. 59 – № 2 – 163–77c.
616. Stefanova N.A. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. / N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, E. E. Korbolina, E. Kiseleva, K. Y. Maksimova, N. G. Kolosova // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 3 – 1396–413c.
617. Stefanova N.A. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. / N. A. Stefanova, N. A. Muraleva, V. P. Skulachev, N. G. Kolosova // *J. Alzheimers. Dis.* – 2014. – T. 38 – № 3 – 681–94c.
618. Steinfeld J. RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. / J. Steinfeld, I. Steinfeld, N. Coronato, M.-L. Hampel, P. G. Layer, M. Araki, A. Vogel-Höpker // *Development* – 2013. – T. 140 – № 24 – 4959–69c.
619. Stiburek L. YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. / L. Stiburek, J. Cesnekova, O. Kostkova, D. Fornuskova, K. Vinsova, L. Wenchich, J. Houstek, J. Zeman // *Mol. Biol. Cell* – 2012. – T. 23 – № 6 – 1010–23c.
620. Stork C. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. / C. Stork, P. F. Renshaw // *Mol. Psychiatry* – 2005. – T. 10 – № 10 – 900–19c.
621. Strohmeyer R. Association of factor H of the alternative pathway of complement with agrin and complement receptor 3 in the Alzheimer's disease brain. / R. Strohmeyer, M. Ramirez, G. J. Cole, K. Mueller, J. Rogers // *J. Neuroimmunol.* – 2002. – T. 131 – № 1-2 – 135–46c.
622. Strohmeyer R. Detection of complement alternative pathway mRNA and proteins in the Alzheimer's disease brain. / R. Strohmeyer, Y. Shen, J. Rogers // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2000. – T. 81 – № 1-2 – 7–18c.

623. Sultan M. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. / M. Sultan, V. Amstislavskiy, T. Risch, M. Schuette, S. Dökel, M. Ralser, D. Balzereit, H. Lehrach, M.-L. Yaspo // *BMC Genomics* – 2014. – T. 15 – 675c.
624. Sun K.-H. Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. / K.-H. Sun, Y. de Pablo, F. Vincent, K. Shah // *J. Neurochem.* – 2008. – T. 107 – № 1 – 265–78c.
625. Swanberg M. Fine mapping of gene regions regulating neurodegeneration. / M. Swanberg, K. Harnesk, M. Ström, M. Diez, O. Lidman, F. Piehl // *PLoS One* – 2009. – T. 4 – № 6 – e5906c.
626. Swaroop A. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. / A. Swaroop, E. Y. Chew, C. B. Rickman, G. R. Abecasis // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2009. – T. 10 – 19–43c.
627. Swerdlow R.H. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. / R. H. Swerdlow, J. M. Burns, S. M. Khan // *J. Alzheimers. Dis.* – 2010. – T. 20 Suppl 2 – S265–79c.
628. Swerdlow R.H. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. / R. H. Swerdlow, J. M. Burns, S. M. Khan // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – T. 1842 – № 8 – 1219–31c.
629. Swertfeger D.K. Apolipoprotein E: a cholesterol transport protein with lipid transport-independent cell signaling properties. / D. K. Swertfeger, D. Y. Hui // *Front. Biosci.* – 2001. – T. 6 – D526–35c.
630. Szekely C.A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease: the epidemiological evidence. / C. A. Szekely, P. P. Zandi // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* – 2010. – T. 9 – № 2 – 132–9c.
631. Takamura Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. / Y. Takamura, E. Kubo, S. Tsuzuki, Y. Akagi // *Exp. Eye Res.* – 2003. – T. 77 – № 1 – 51–7c.
632. Takeda T. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). / T. Takeda, M. Hosokawa, K. Higuchi, M. Hosono, I. Akiguchi, H. Katoh // *Arch. Gerontol. Geriatr.* – T. 19 – № 2 – 185–92c.
633. Takeuchi A. Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. / A. Takeuchi, M. C. Irizarry, K. Duff, T. C. Saido, K. Hsiao Ashe, M. Hasegawa, D. M. Mann, B. T. Hyman, T. Iwatsubo // *Am. J. Pathol.* – 2000. – T. 157 – № 1 – 331–9c.
634. Talarico G. The London APP mutation (Val717Ile) associated with early shifting abilities and behavioral changes in two Italian families with early-onset Alzheimer's disease. /

- G. Talarico, P. Piscopo, M. Gasparini, E. Salati, M. Pignatelli, S. Pietracupa, L. Malvezzi-Campeggi, A. Crestini, S. Boschi, G. L. Lenzi, A. Confaloni, G. Bruno // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* – 2010. – T. 29 – № 6 – 484–90c.
635. Talbot K. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. / K. Talbot, H.-Y. Wang, H. Kazi, L.-Y. Han, K. P. Bakshi, A. Stucky, R. L. Fuino, K. R. Kawaguchi, A. J. Samoyedny, R. S. Wilson, Z. Arvanitakis, J. A. Schneider, B. A. Wolf, D. A. Bennett, J. Q. Trojanowski, S. E. Arnold // *J. Clin. Invest.* – 2012. – T. 122 – № 4 – 1316–38c.
636. Tanzi R.E. A brief history of Alzheimer's disease gene discovery. / R. E. Tanzi // *J. Alzheimers. Dis.* – 2013. – T. 33 Suppl 1 – S5–13c.
637. Tarkowski E. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. / E. Tarkowski, R. Issa, M. Sjögren, A. Wallin, K. Blennow, A. Tarkowski, P. Kumar // *Neurobiol. Aging* – T. 23 – № 2 – 237–43c.
638. Tenreiro S. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? / S. Tenreiro, K. Eckermann, T. F. Outeiro // *Front. Mol. Neurosci.* – 2014. – T. 7 – 42c.
639. Terluk M.R. Investigating mitochondria as a target for treating age-related macular degeneration. / M. R. Terluk, R. J. Kapphahn, L. M. Soukup, H. Gong, C. Gallardo, S. R. Montezuma, D. A. Ferrington // *J. Neurosci.* – 2015. – T. 35 – № 18 – 7304–11c.
640. Tesseur I. A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. / I. Tesseur, T. Wyss-Coray // *Curr. Alzheimer Res.* – 2006. – T. 3 – № 5 – 505–13c.
641. Testi S. A novel PSEN1 mutation in a patient with sporadic early-onset Alzheimer's disease and prominent cerebellar ataxia. / S. Testi, S. Peluso, G. M. Fabrizi, A. Antenora, C. V. Russo, S. Pappatà, A. Padovani, M. Ferrarini, A. Filla // *J. Alzheimers. Dis.* – 2014. – T. 41 – № 3 – 709–14c.
642. Thacker E.L. Familial aggregation of Parkinson's disease: a meta-analysis. / E. L. Thacker, A. Ascherio // *Mov. Disord.* – 2008. – T. 23 – № 8 – 1174–83c.
643. Thanan R. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. / R. Thanan, S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Ohnishi, N. Ma, S. Pinlaor, P. Yongvanit, S. Kawanishi, M. Murata // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – T. 16 – № 1 – 193–217c.
644. Tian L. Transcriptome of the human retina, retinal pigmented epithelium and choroid. / L. Tian, K. L. Kazmierkiewicz, A. S. Bowman, M. Li, C. A. Curcio, D. E. Stambolian // *Genomics* – 2015. – T. 105 – № 5-6 – 253–64c.

645. Tiffin N. Integration of text- and data-mining using ontologies successfully selects disease gene candidates. / N. Tiffin, J. F. Kelso, A. R. Powell, H. Pan, V. B. Bajic, W. A. Hide // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – T. 33 – № 5 – 1544–52c.
646. Tiraboschi P. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. / P. Tiraboschi, L. A. Hansen, L. J. Thal, J. Corey-Bloom // *Neurology* – 2004. – T. 62 – № 11 – 1984–9c.
647. Tiraboschi P. Alzheimer disease without neocortical neurofibrillary tangles: “a second look”. / P. Tiraboschi, M. N. Sabbagh, L. A. Hansen, D. P. Salmon, A. Merdes, A. Gamst, E. Masliah, M. Alford, L. J. Thal, J. Corey-Bloom // *Neurology* – 2004. – T. 62 – № 7 – 1141–7c.
648. Tollervey J.R. Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain. / J. R. Tollervey, Z. Wang, T. Hortobágyi, J. T. Witten, K. Zarnack, M. Kayikci, T. A. Clark, A. C. Schweitzer, G. Rot, T. Curk, B. Zupan, B. Rogelj, C. E. Shaw, J. Ule // *Genome Res.* – 2011. – T. 21 – № 10 – 1572–82c.
649. Torras-Garcia M. Decreased anxiety levels related to aging. / M. Torras-Garcia, D. Costa-Miserachs, M. Coll-Andreu, I. Portell-Cortés // *Exp. brain Res.* – 2005. – T. 164 – № 2 – 177–84c.
650. Totan Y. Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration. / Y. Totan, R. Yağci, Y. Bardak, H. Ozyurt, F. Kendir, G. Yilmaz, S. Sahin, U. Sahin Tiğ // *Curr. Eye Res.* – 2009. – T. 34 – № 12 – 1089–93c.
651. Tóth G. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. / G. Tóth, Z. Gáspári, J. Jurka // *Genome Res.* – 2000. – T. 10 – № 7 – 967–81c.
652. Triarhou L.C. Centenary of Christfried Jakob’s discovery of the visceral brain: an unheeded precedence in affective neuroscience. / L. C. Triarhou // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2008. – T. 32 – № 5 – 984–1000c.
653. Tsai Y. Ocular changes in TgF344-AD rat model of Alzheimer’s disease. / Y. Tsai, B. Lu, A. V Ljubimov, S. Girman, F. N. Ross-Cisneros, A. A. Sadun, C. N. Svendsen, R. M. Cohen, S. Wang // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – T. 55 – № 1 – 523–34c.
654. Tsaih S.-W. Identification of a novel gene for diabetic traits in rats, mice, and humans. / S.-W. Tsaih, K. Holl, S. Jia, M. Kaldunski, M. Tschannen, H. He, J. W. Andrae, S.-H. Li, A. Stoddard, A. Wiederhold, J. Parrington, M. Ruas da Silva, A. Galione, J. Meigs, R. G. Hoffmann, P. Simpson, H. Jacob, M. Hessner, L. C. Solberg Woods // *Genetics* – 2014. – T. 198 – № 1 – 17–29c.
655. Tsaparas P. Global similarity and local divergence in human and mouse gene co-expression networks. / P. Tsaparas, L. Mariño-Ramírez, O. Bodenreider, E. V Koonin, I. K. Jordan // *BMC Evol. Biol.* – 2006. – T. 6 – 70c.

656. Tsuji M. Phosphocreatine and ATP regulation in the hypoxic developing rat brain. / M. Tsuji, E. Allred, F. Jensen, D. Holtzman // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1995. – T. 85 – № 2 – 192–200c.
657. Tsuji S. The neurogenomics view of neurological diseases. / S. Tsuji // *JAMA Neurol.* – 2013. – T. 70 – № 6 – 689–94c.
658. Turunen M. No association between high temperature requirement 1 (HTRA1) gene polymorphisms and Alzheimer's disease. / M. Turunen, S. Vepsäläinen, P. Mäkinen, S. Helisalmi, A. Haapasalo, H. Soininen, M. Hiltunen // *Neurobiol. Aging* – 2011. – T. 32 – № 3 – 547.e7–9c.
659. Udar N. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. / N. Udar, S. R. Atilano, M. Memarzadeh, D. S. Boyer, M. Chwa, S. Lu, B. Maguen, J. Langberg, P. Coskun, D. C. Wallace, A. B. Nesburn, N. Khatibi, D. Hertzog, K. Le, D. Hwang, M. C. Kenney // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – T. 50 – № 6 – 2966–74c.
660. Valenti D. Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway. / D. Valenti, G. A. Manente, L. Moro, E. Marra, R. A. Vacca // *Biochem. J.* – 2011. – T. 435 – № 3 – 679–88c.
661. Vannucci S.J. Hypoxia-ischemia in the immature brain. / S. J. Vannucci, H. Hagberg // *J. Exp. Biol.* – 2004. – T. 207 – № Pt 18 – 3149–54c.
662. Vays V.B. Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure. / V. B. Vays, C. M. Eldarov, I. M. Vangely, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva, V. P. Skulachev // *Aging (Albany, NY)*. – 2014. – T. 6 – № 2 – 140–8c.
663. Veerhuis R. Complement in the brain. / R. Veerhuis, H. M. Nielsen, A. J. Tenner // *Mol. Immunol.* – 2011. – T. 48 – № 14 – 1592–603c.
664. Venza I. Association between oxidative stress and macromolecular damage in elderly patients with age-related macular degeneration. / I. Venza, M. Visalli, M. Cucinotta, D. Teti, M. Venza // *Aging Clin. Exp. Res.* – 2012. – T. 24 – № 1 – 21–7c.
665. Verdaguer E. Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. / E. Verdaguer, S. Brox, D. Petrov, J. Olloquequi, R. Romero, M. L. de Lemos, A. Camins, C. Auladell // *Exp. Gerontol.* – 2015. – T. 69 – 176–88c.
666. Vicente Miranda H. The sour side of neurodegenerative disorders: the effects of protein glycation. / H. Vicente Miranda, T. F. Outeiro // *J. Pathol.* – 2010. – T. 221 – № 1 – 13–25c.



667. Viggiano E. Cortical spreading depression induces the expression of iNOS, HIF-1alpha, and LDH-A. / E. Viggiano, D. Ferrara, G. Izzo, A. Viggiano, S. Minucci, M. Monda, B. De Luca // *Neuroscience* – 2008. – T. 153 – № 1 – 182–8c.
668. Viola K.L. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. / K. L. Viola, W. L. Klein // *Acta Neuropathol.* – 2015. – T. 129 – № 2 – 183–206c.
669. Virarkar M. L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. / M. Virarkar, L. Alappat, P. G. Bradford, A. B. Awad // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2013. – T. 53 – № 11 – 1157–67c.
670. Visscher P.M. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. / P. M. Visscher, W. G. Hill, N. R. Wray // *Nat. Rev. Genet.* – 2008. – T. 9 – № 4 – 255–66c.
671. Vladan B. Melatonin and abeta, macular degeneration and alzheimers disease: same disease, different outcomes? / B. Vladan, I. Panfoli // *Med. hypothesis, Discov. Innov. Ophthalmol.* – 2012. – T. 1 – № 2 – 24–32c.
672. Volz H.P. High-energy phosphates in the frontal lobe correlate with Wisconsin Card Sort Test performance in controls, not in schizophrenics: a  $^{31}$ phosphorus magnetic resonance spectroscopic and neuropsychological investigation. / H. P. Volz, G. Hübner, R. Rzanny, G. Rössger, B. Preussler, M. Eichhorn, I. Kreitschmann-Andermahr, W. A. Kaiser, H. Sauer // *Schizophr. Res.* – 1998. – T. 31 – № 1 – 37–47c.
673. Waite M.R. Axial level-specific regulation of neuronal development: lessons from PITX2. / M. R. Waite, D. M. Martin // *J. Neurosci. Res.* – 2015. – T. 93 – № 2 – 195–8c.
674. Wakeland E. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). / E. Wakeland, L. Morel, K. Achey, M. Yui, J. Longmate // *Immunol. Today* – 1997. – T. 18 – № 10 – 472–7c.
675. Wan J. HB-EGF is necessary and sufficient for Müller glia dedifferentiation and retina regeneration. / J. Wan, R. Ramachandran, D. Goldman // *Dev. Cell* – 2012. – T. 22 – № 2 – 334–47c.
676. Wang B. The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons. / B. Wang, Z. Wang, L. Sun, L. Yang, H. Li, A. L. Cole, J. Rodriguez-Rivera, H.-C. Lu, H. Zheng // *J. Neurosci.* – 2014. – T. 34 – № 40 – 13314–25c.
677. Wang G.-S. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. / G.-S. Wang, T. A. Cooper // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – T. 8 – № 10 – 749–61c.
678. Wang J. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. / J. Wang, D. Duncan, Z. Shi, B. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – T. 41 – № Web Server issue – W77–83c.

679. Wang J. Altered function of factor I caused by amyloid beta: implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from Drusen. / J. Wang, K. Ohno-Matsui, T. Yoshida, A. Kojima, N. Shimada, K. Nakahama, O. Safranov, N. Iwata, T. C. Saido, M. Mochizuki, I. Morita // *J. Immunol.* – 2008. – T. 181 – № 1 – 712–20c.
680. Wang J. Amyloid-beta up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration. / J. Wang, K. Ohno-Matsui, T. Yoshida, N. Shimada, S. Ichinose, T. Sato, M. Mochizuki, I. Morita // *J. Cell. Physiol.* – 2009. – T. 220 – № 1 – 119–28c.
681. Wang J.-Z. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. / J.-Z. Wang, F. Liu // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – T. 85 – № 2 – 148–75c.
682. Wang K. Analysing biological pathways in genome-wide association studies. / K. Wang, M. Li, H. Hakonarson // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – T. 11 – № 12 – 843–54c.
683. Wang L. Abundant lipid and protein components of drusen. / L. Wang, M. E. Clark, D. K. Crossman, K. Kojima, J. D. Messinger, J. A. Mobley, C. A. Curcio // *PLoS One* – 2010. – T. 5 – № 4 – e10329c.
684. Wang X. Genetic regulatory network analysis for app based on genetical genomics approach. / X. Wang, Y. Chen, X. Wang, L. Lu // *Exp. Aging Res.* – T. 36 – № 1 – 79–93c.
685. Wang X. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. / X. Wang, B. Su, H. Lee, X. Li, G. Perry, M. A. Smith, X. Zhu // *J. Neurosci.* – 2009. – T. 29 – № 28 – 9090–103c.
686. Wang X. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. / X. Wang, B. Su, S. L. Siedlak, P. I. Moreira, H. Fujioka, Y. Wang, G. Casadesus, X. Zhu // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – T. 105 – № 49 – 19318–23c.
687. Wang Y. Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. / Y. Wang, E. Mandelkow // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – T. 40 – № 4 – 644–52c.
688. Wang Z. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. / Z. Wang, M. Gerstein, M. Snyder // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – T. 10 – № 1 – 57–63c.
689. Waring S.C. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. / S. C. Waring, R. N. Rosenberg // *Arch. Neurol.* – 2008. – T. 65 – № 3 – 329–34c.
690. Warwick A. Age-Related Macular Degeneration: A Disease of Systemic or Local Complement Dysregulation? / A. Warwick, S. Khandhadia, S. Ennis, A. Lotery // *J. Clin. Med.* – 2014. – T. 3 – № 4 – 1234–57c.

691. Watanabe T.K. Characterization of newly developed SSLP markers for the rat. / T. K. Watanabe, T. Ono, S. Okuno, A. Mizoguchi-Miyakita, Y. Yamasaki, N. Kanemoto, H. Hishigaki, K. Oga, E. Takahashi, Y. Irie, M. T. Bihoreau, M. R. James, G. M. Lathrop, T. Takagi, Y. Nakamura, A. Tanigami // *Mamm. Genome* – 2000. – T. 11 – № 4 – 300–5c.
692. Wen Y. SORL1 is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease. / Y. Wen, A. Miyashita, N. Kitamura, T. Tsukie, Y. Saito, H. Hatsuta, S. Murayama, A. Kakita, H. Takahashi, H. Akatsu, T. Yamamoto, K. Kosaka, H. Yamaguchi, K. Akazawa, Y. Ihara, R. Kuwano // *J. Alzheimers. Dis.* – 2013. – T. 35 – № 2 – 387–94c.
693. Whitmore S.S. Transcriptomic analysis across nasal, temporal, and macular regions of human neural retina and RPE/choroid by RNA-Seq. / S. S. Whitmore, A. H. Wagner, A. P. DeLuca, A. V Drack, E. M. Stone, B. A. Tucker, S. Zeng, T. A. Braun, R. F. Mullins, T. E. Scheetz // *Exp. Eye Res.* – 2014. – T. 129 – 93–106c.
694. Wilcock D.M. Down syndrome individuals with Alzheimer's disease have a distinct neuroinflammatory phenotype compared to sporadic Alzheimer's disease. / D. M. Wilcock, J. Hurban, A. M. Helman, T. L. Sudduth, K. L. McCarty, T. L. Beckett, J. C. Ferrell, M. P. Murphy, E. L. Abner, F. A. Schmitt, E. Head // *Neurobiol. Aging* – 2015. – T. 36 – № 9 – 2468–74c.
695. Williams P.A. Retinal ganglion cell dendritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. / P. A. Williams, R. A. Thirgood, H. Oliphant, A. Frizzati, E. Littlewood, M. Votruba, M. A. Good, J. Williams, J. E. Morgan // *Neurobiol. Aging* – 2013. – T. 34 – № 7 – 1799–806c.
696. Willnow T.E. Sorting receptor SORLA- a trafficking path to avoid Alzheimer disease / T. E. Willnow, O. M. Andersen OM. // *J Cell Sci.* – 2013. – 26. – P. 2751–2760.
697. Wirdefeldt K. Heritability of Parkinson disease in Swedish twins: a longitudinal study. / K. Wirdefeldt, M. Gatz, C. A. Reynolds, C. A. Prescott, N. L. Pedersen // *Neurobiol. Aging* – 2011. – T. 32 – № 10 – 1923.e1–8c.
698. Wirth M. Gene-environment interactions: lifetime cognitive activity, APOE genotype, and  $\beta$ -amyloid burden. / M. Wirth, S. Villeneuve, R. La Joie, S. M. Marks, W. J. Jagust // *J. Neurosci.* – 2014. – T. 34 – № 25 – 8612–7c.
699. Wiseman F.K. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. / F. K. Wiseman, T. Al-Janabi, J. Hardy, A. Karmiloff-Smith, D. Nizetic, V. L. J. Tybulewicz, E. M. C. Fisher, A. Strydom // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2015. – T. 16 – № 9 – 564–74c.

700. Witte M.E. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? / M. E. Witte, J. J. G. Geurts, H. E. de Vries, P. van der Valk, J. van Horssen // *Mitochondrion*. – 2010. – T. 10 – № 5 – 411–8c.
701. Wiwanitkit V. Physiological genomics analysis for Alzheimer's disease / V. Wiwanitkit // *Ann Indian Acad Neurol*. – 2013. – 16. – P. 72–74.
702. Won J. Genetic modifier loci of mouse Mfrp(rd6) identified by quantitative trait locus analysis. / J. Won, J. R. Charette, V. M. Philip, T. M. Stearns, W. Zhang, J. K. Naggert, M. P. Krebs, P. M. Nishina // *Exp. Eye Res*. – 2014. – T. 118 – 30–5c.
703. Wood S.J. Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress. / S. J. Wood, M. Yücel, C. Pantelis, M. Berk // *Ann. Acad. Med. Singapore* – 2009. – T. 38 – № 5 – 396–6c.
704. Woods N.K. Neuronal calcium signaling and Alzheimer's disease. / N. K. Woods, J. Padmanabhan // *Adv. Exp. Med. Biol*. – 2012. – T. 740 – 1193–217c.
705. Wyss M. Creatine and creatinine metabolism. / M. Wyss, R. Kaddurah-Daouk // *Physiol. Rev*. – 2000. – T. 80 – № 3 – 1107–213c.
706. Wyss-Coray T. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. / T. Wyss-Coray, L. Mucke // *Neuron* – 2002. – T. 35 – № 3 – 419–32c.
707. Xekardaki A. Neuropathological changes in aging brain. / A. Xekardaki, E. Kövari, G. Gold, A. Papadimitropoulou, E. Giacobini, F. Herrmann, P. Giannakopoulos, C. Bouras // *Adv. Exp. Med. Biol*. – 2015. – T. 821 – 11–7c.
708. Xie A. Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. / A. Xie, J. Gao, L. Xu, D. Meng // *Biomed Res. Int*. – 2014. – T. 2014 – 648740c.
709. Xing Y. Assessing the conservation of mammalian gene expression using high-density exon arrays. / Y. Xing, Z. Ouyang, K. Kapur, M. P. Scott, W. H. Wong // *Mol. Biol. Evol*. – 2007. – T. 24 – № 6 – 1283–5c.
710. Xu S. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. / S. Xu, P. D. Witmer, S. Lumayag, B. Kovacs, D. Valle // *J. Biol. Chem*. – 2007. – T. 282 – № 34 – 25053–66c.
711. Yagi R. Detecting gene mutations in Japanese Alzheimer's patients by semiconductor sequencing. / R. Yagi, R. Miyamoto, H. Morino, Y. Izumi, M. Kuramochi, T. Kurashige, H. Maruyama, N. Mizuno, H. Kurihara, H. Kawakami // *Neurobiol. Aging* – 2014. – T. 35 – № 7 – 1780.e1–5c.
712. Yamanaka R. CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis (Review). / R. Yamanaka, J. Lekstrom-Himes, C.

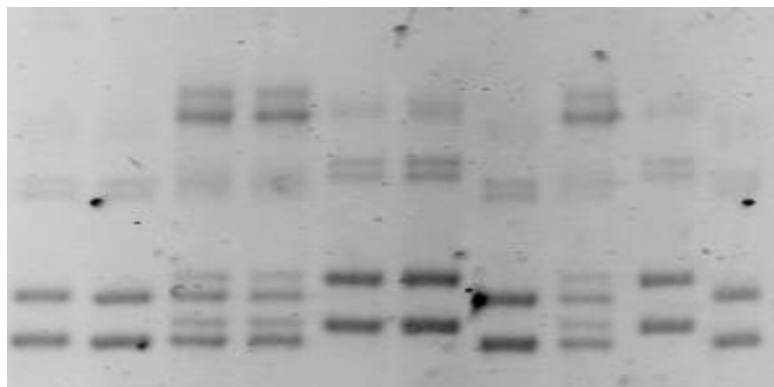
- Barlow, A. Wynshaw-Boris, K. G. Xanthopoulos // *Int. J. Mol. Med.* – 1998. – T. 1 – № 1 – 213–21c.
713. Yamane T. Visual-statistical interpretation of (18)F-FDG-PET images for characteristic Alzheimer patterns in a multicenter study: inter-rater concordance and relationship to automated quantitative evaluation. / T. Yamane, Y. Ikari, T. Nishio, K. Ishii, T. Kato, K. Ito, D. H. S. Silverman, M. Senda, T. Asada, H. Arai, M. Sugishita, T. Iwatsubo // *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* – 2014. – T. 35 – № 2 – 244–9c.
714. Yamashita S. Expression quantitative trait loci analysis of 13 genes in the rat prostate. / S. Yamashita, K. Wakazono, T. Nomoto, Y. Tsujino, T. Kuramoto, T. Ushijima // *Genetics* – 2005. – T. 171 – № 3 – 1231–8c.
715. Yang H.-J. Vision from next generation sequencing: multi-dimensional genome-wide analysis for producing gene regulatory networks underlying retinal development, aging and disease. / H.-J. Yang, R. Ratnapriya, T. Cogliati, J.-W. Kim, A. Swaroop // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2015. – T. 46 – 1–30c.
716. Yang J. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. / J. Yang, B. Benyamin, B. P. McEvoy, S. Gordon, A. K. Henders, D. R. Nyholt, P. A. Madden, A. C. Heath, N. G. Martin, G. W. Montgomery, M. E. Goddard, P. M. Visscher // *Nat. Genet.* – 2010. – T. 42 – № 7 – 565–9c.
717. Yang S.-P. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. / S.-P. Yang, D.-G. Bae, H. J. Kang, B. J. Gwag, Y. S. Gho, C.-B. Chae // *Neurobiol. Aging* – 2004. – T. 25 – № 3 – 283–90c.
718. Yildiz-Yesiloglu A. Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: a meta-analysis. / A. Yildiz-Yesiloglu, D. P. Ankerst // *Psychiatry Res.* – 2006. – T. 147 – № 1 – 1–25c.
719. Yin R.-H. Prion-like Mechanisms in Alzheimer's Disease. / R.-H. Yin, L. Tan, T. Jiang, J.-T. Yu // *Curr. Alzheimer Res.* – 2014. – T. 11 – № 8 – 755–64c.
720. Yonekawa Y. Age-Related Macular Degeneration: Advances in Management and Diagnosis. / Y. Yonekawa, J. W. Miller, I. K. Kim // *J. Clin. Med.* – 2015. – T. 4 – № 2 – 343–59c.
721. Yousef A. SFM: A novel sequence-based fusion method for disease genes identification and prioritization. / A. Yousef, N. Moghadam Charkari // *J. Theor. Biol.* – 2015. – T. 383 – 12–19c.
722. Yu Y. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. / Y. Yu, T. R. Bhangale, J. Fagerness, S. Ripke, G. Thorleifsson, P. L. Tan, E. H. Souied, A. J. Richardson, J. E. Merriam, G. H. S. Buitendijk, R.

- Reynolds, S. Raychaudhuri, K. A. Chin, L. Sobrin, E. Evangelou, P. H. Lee, A. Y. Lee, N. Leveziel, D. J. Zack, B. Campochiaro, P. Campochiaro, R. T. Smith, G. R. Barile, R. H. Guymer, R. Hogg, U. Chakravarthy, L. D. Robman, O. Gustafsson, H. Sigurdsson, W. Ortmann, T. W. Behrens, K. Stefansson, A. G. Uitterlinden, C. M. van Duijn, J. R. Vingerling, C. C. W. Klaver, R. Allikmets, M. A. Brantley, P. N. Baird, N. Katsanis, U. Thorsteinsdottir, J. P. A. Ioannidis, M. J. Daly, R. R. Graham, J. M. Seddon // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – T. 20 – № 18 – 3699–709c.
723. Zawia N.H. Environmental risk factors and the developmental basis for Alzheimer's disease. / N. H. Zawia, M. R. Basha // *Rev. Neurosci.* – 2005. – T. 16 – № 4 – 325–37c.
724. Zetterberg M. Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with Alzheimer's disease. / M. Zetterberg, S. Landgren, M. E. Andersson, M. S. Palmér, D. R. Gustafson, I. Skoog, L. Minthon, D. S. Thelle, A. Wallin, N. Bogdanovic, N. Andreasen, K. Blennow, H. Zetterberg // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* – 2008. – T. 147B – № 6 – 720–6c.
725. Zhang B. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. / B. Zhang, S. Kirov, J. Snoddy // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – T. 33 – № Web Server issue – W741–8c.
726. Zhang C. Characterization of ATP alternations in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. / C. Zhang, R. A. Rissman, J. Feng // *J. Alzheimers. Dis.* – 2015. – T. 44 – № 2 – 375–8c.
727. Zhang K.Y. Ubiquilin 2: a component of the ubiquitin-proteasome system with an emerging role in neurodegeneration. / K. Y. Zhang, S. Yang, S. T. Warraich, I. P. Blair // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – T. 50 – 123–6c.
728. Zhang W. A practical comparison of de novo genome assembly software tools for next-generation sequencing technologies. / W. Zhang, J. Chen, Y. Yang, Y. Tang, J. Shang, B. Shen // *PLoS One* – 2011. – T. 6 – № 3 – e17915c.
729. Zhang W. Role and mechanism of microglial activation in iron-induced selective and progressive dopaminergic neurodegeneration. / W. Zhang, Z. Yan, J. Gao, L. Sun, X. Huang, Z. Liu, S. Yu, C.-J. Cao, L. Zuo, Z.-J. Chen, Y. Hu, F. Wang, J. Hong, X. Wang // *Mol. Neurobiol.* – 2014. – T. 49 – № 3 – 1153–65c.
730. Zhao L. Antagonizing Wnt pathway in diabetic retinopathy. / L. Zhao, S. H. Patel, J. Pei, K. Zhang // *Diabetes* – 2013. – T. 62 – № 12 – 3993–5c.
731. Zhao Y. Sorting nexin 12 interacts with BACE1 and regulates BACE1-mediated APP processing. / Y. Zhao, Y. Wang, J. Yang, X. Wang, Y. Zhao, X. Zhang, Y. Zhang // *Mol. Neurodegener.* – 2012. – T. 7 – 30c.

732. Zhou J. Complement C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. / J. Zhou, M. I. Fonseca, K. Pisalyaput, A. J. Tenner // *J. Neurochem.* – 2008. – T. 106 – № 5 – 2080–92c.
733. Zhou T. The pathogenic role of the canonical Wnt pathway in age-related macular degeneration. / T. Zhou, Y. Hu, Y. Chen, K. K. Zhou, B. Zhang, G. Gao, J. Ma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – T. 51 – № 9 – 4371–9c.
734. Zhu X. Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. / X. Zhu, C. A. Rottkamp, A. Hartzler, Z. Sun, A. Takeda, H. Boux, S. Shimohama, G. Perry, M. A. Smith // *J. Neurochem.* – 2001. – T. 79 – № 2 – 311–8c.
735. Zitvogel L. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. / L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer // *Cell* – 2010. – T. 140 – № 6 – 798–804c.
736. Zou F. Gene expression levels as endophenotypes in genome-wide association studies of Alzheimer disease. / F. Zou, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, O. Belbin, K. Morgan, M. Allen, S. L. Wilcox, L. Ma, L. P. Walker, N. Kouri, J. D. Burgess, L. H. Younkin, S. G. Younkin, C. S. Younkin, G. D. Bisceglia, J. E. Crook, D. W. Dickson, R. C. Petersen, N. Graff-Radford, S. G. Younkin, N. Ertekin-Taner // *Neurology* – 2010. – T. 74 – № 6 – 480–6c.
737. Zou F. Brain expression genome-wide association study (eGWAS) identifies human disease-associated variants. / F. Zou, H. S. Chai, C. S. Younkin, M. Allen, J. Crook, V. S. Pankratz, M. M. Carrasquillo, C. N. Rowley, A. A. Nair, S. Middha, S. Maharjan, T. Nguyen, L. Ma, K. G. Malphrus, R. Palusak, S. Lincoln, G. Bisceglia, C. Georgescu, N. Kouri, C. P. Kolbert, J. Jen, J. L. Haines, R. Mayeux, M. A. Pericak-Vance, L. A. Farrer, G. D. Schellenberg, R. C. Petersen, N. R. Graff-Radford, D. W. Dickson, S. G. Younkin, N. Ertekin-Taner // *PLoS Genet.* – 2012. – T. 8 – № 6 – e1002707c.
738. Zou Z. Clinical genetics of Alzheimer's disease. / Z. Zou, C. Liu, C. Che, H. Huang // *Biomed Res. Int.* – 2014. – T. 2014 – 291862c.
739. Zouboulis C.C. Epidemiology of Adamantiades-Behçet's disease. / C. C. Zouboulis // *Ann. Med. Interne (Paris).* – 1999. – T. 150 – № 6 – 488–98c.
740. Zuk O. Searching for missing heritability: designing rare variant association studies. / O. Zuk, S. F. Schaffner, K. Samocha, R. Do, E. Hechter, S. Kathiresan, M. J. Daly, B. M. Neale, S. R. Sunyaev, E. S. Lander // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2014. – T. 111 – № 4 – E455–64c.
741. Zündorf G. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. / G. Zündorf, G. Reiser // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – T. 14 – № 7 – 1275–88c.
742. Rat Genome. Inbred Strains of Rats. 1996. -V.2. - N 2. - P.52-54.

**Приложение 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК.**

Показано разделение продуктов ПЦР с праймеров D1Rat81 в 6% ПААГ (определение аллелей микросателлитного маркера D1Rat81 крыс гибридов F<sub>2</sub>). Продукты амплификации тотальной геномной ДНК: 1-8 – крыс гибридной популяции F<sub>2</sub>, 9 – крыс OXYS, 10 – крыс WAG, где А, В – аллельные варианты длины маркерной последовательности, Г – гетерозигота.



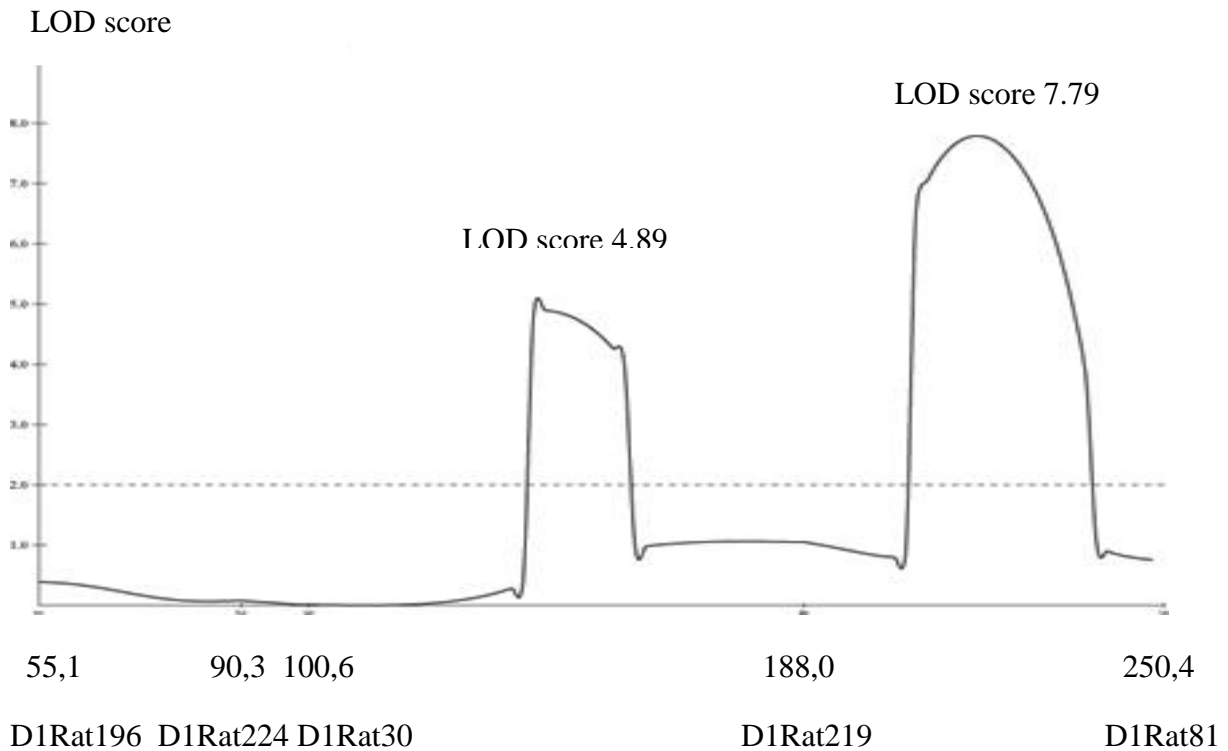
основной продукт  
амплификации

А	А	Г	Г	В	В	А	Г	В	А
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

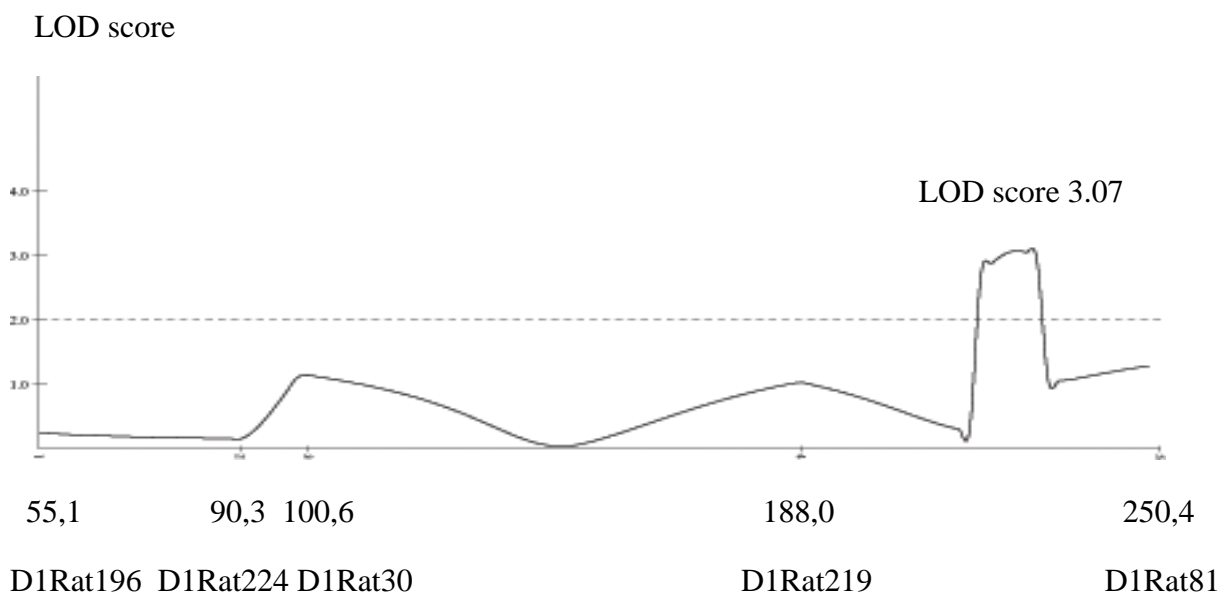


**Приложение 2. Графики распределения статистической значимости для значений фенотипических признаков в гибридной популяции F<sub>2</sub> на первой хромосоме крыс. По оси абсцисс - позиция микросателлитного маркера на карте хромосомы, Mb.**

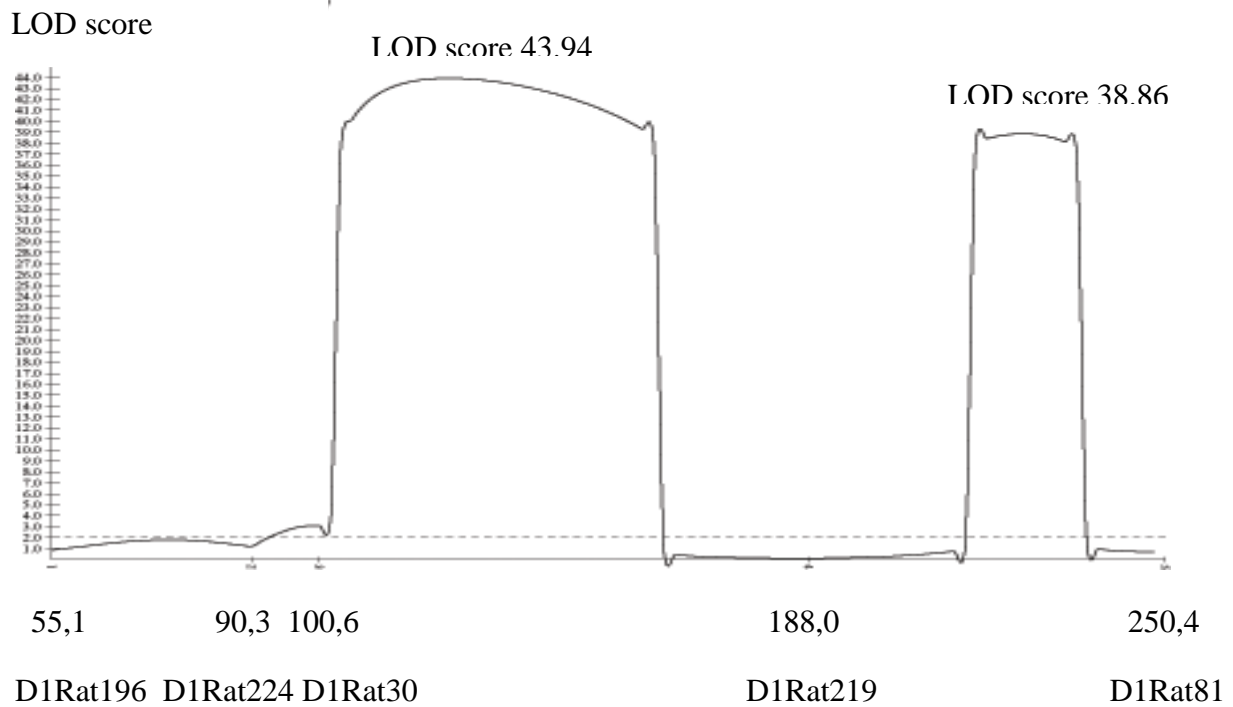
**График № 1. Заболеваемость ретинопатией.**



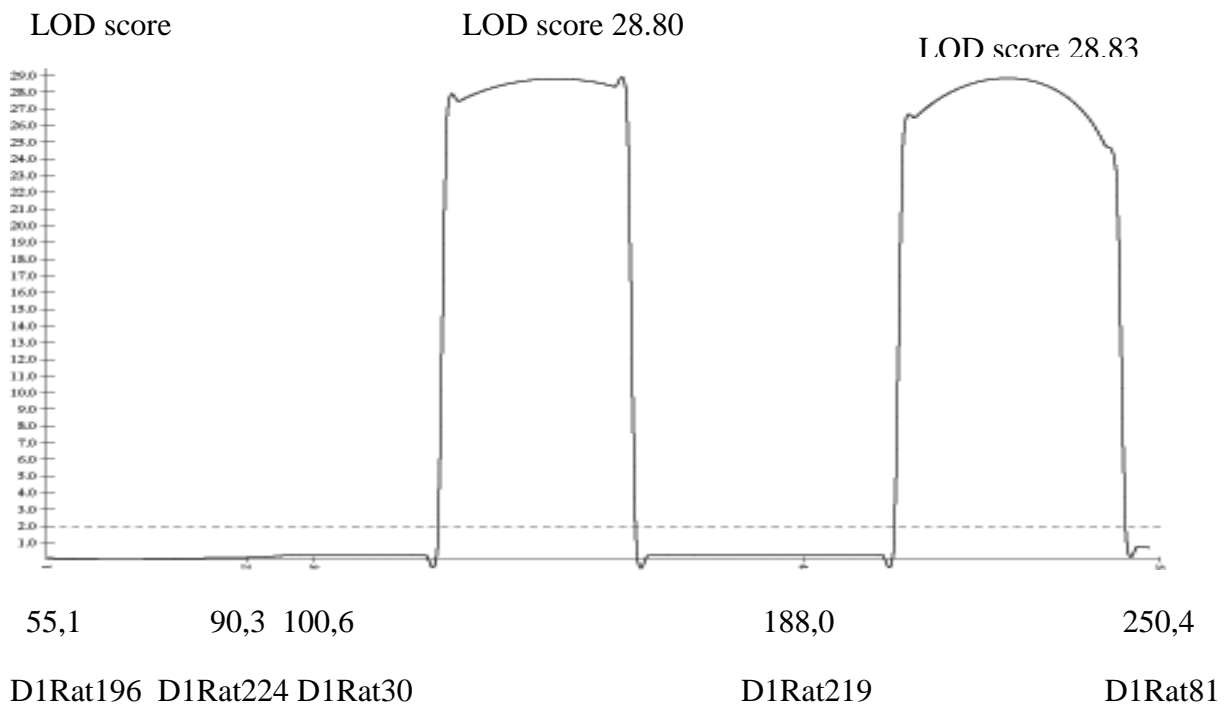
**График № 2. Заболеваемость катарактой.**



**График № 3. Латентный период выхода в центр в тесте «открытое поле».**

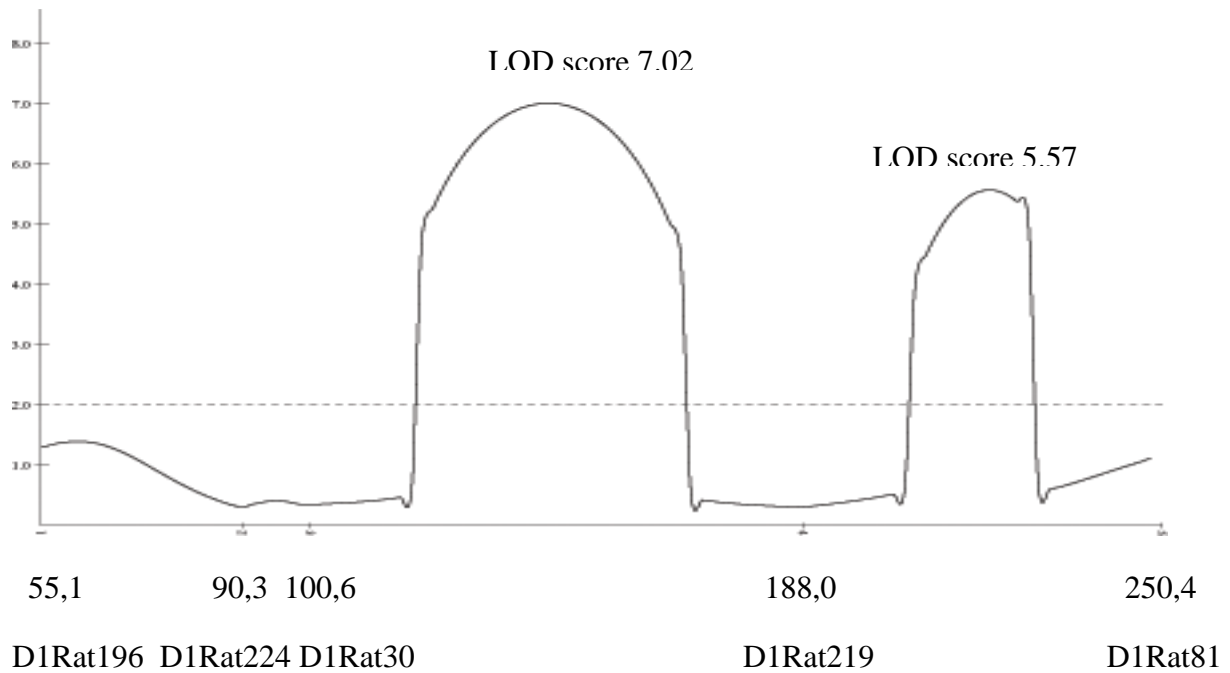


**График № 4. Латентный период выхода в центр в тесте «крестообразный лабиринт».**



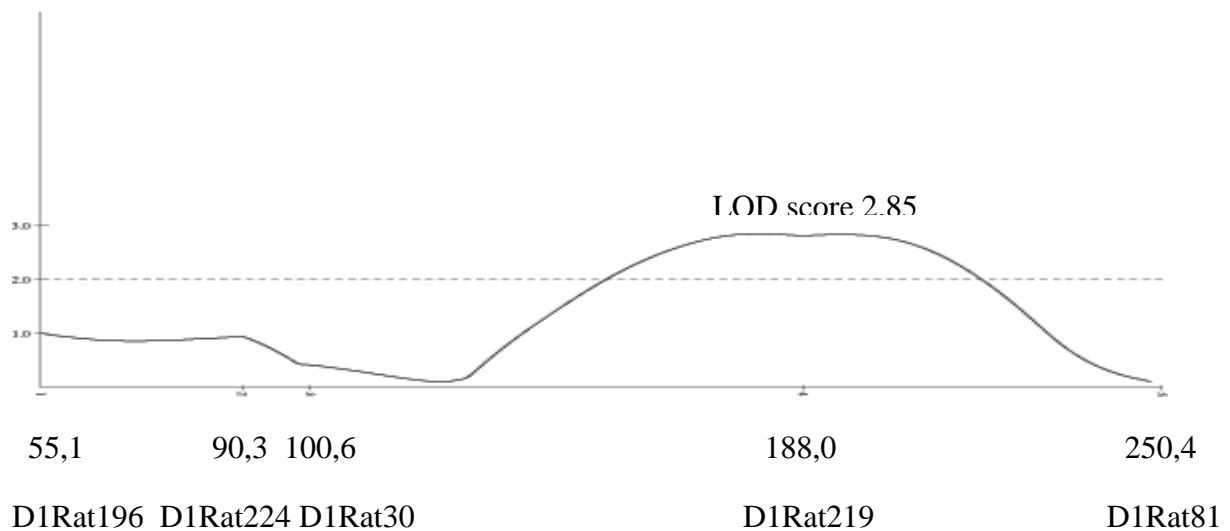
**График № 5. Время, проведенное в центре, в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



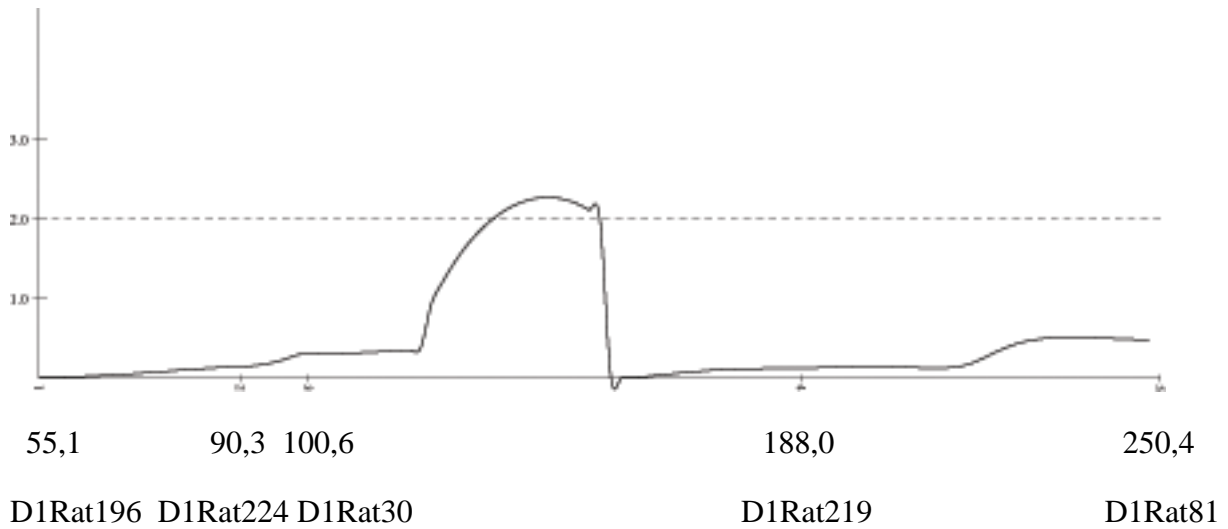
**График № 6. Количество актов груминга в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score

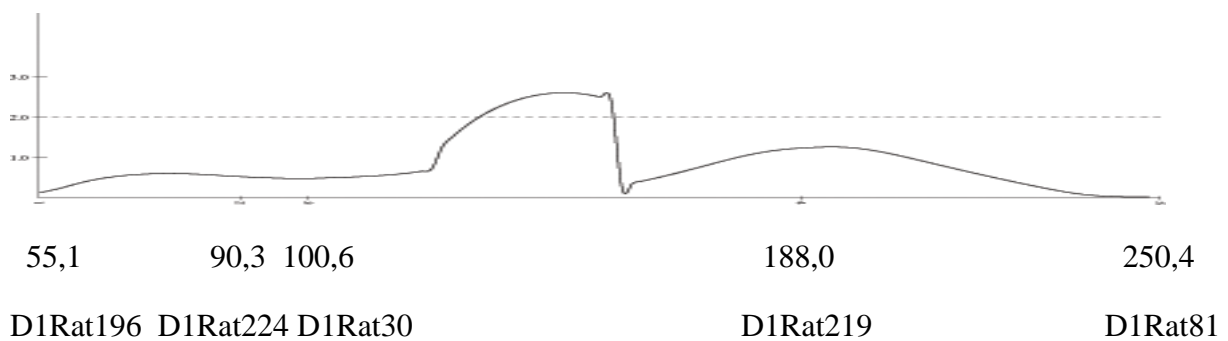


**График № 7. Количество вертикальных стоек в тесте «открытое поле».**

LOD score

**График № 8. Количество выглядываний в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score

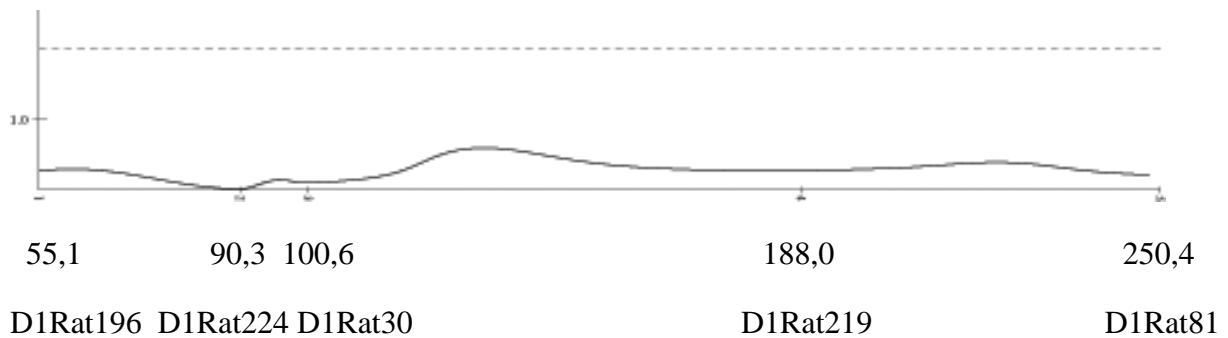
**График № 9. Количество выходов в центр в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



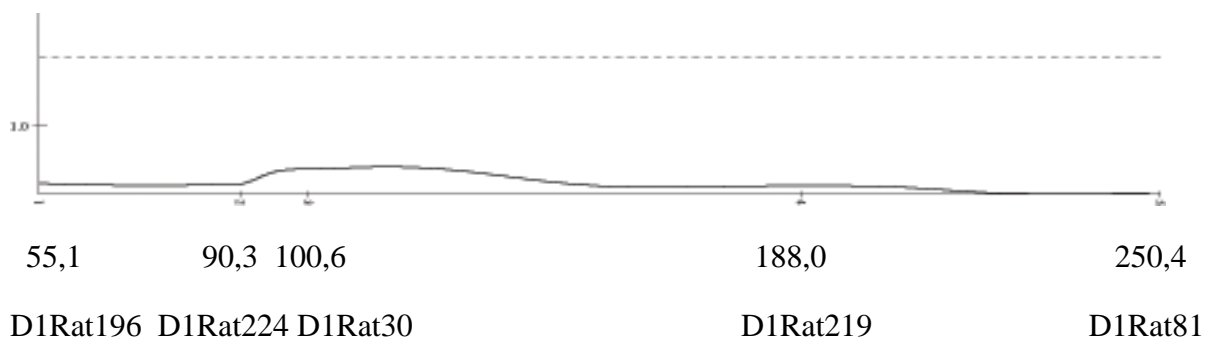
**График № 10. Количество переходов в открытые рукава в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



**График № 11. Количество переходов в закрытые рукава в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



**График № 12. Время, проведенное в открытом пространстве в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



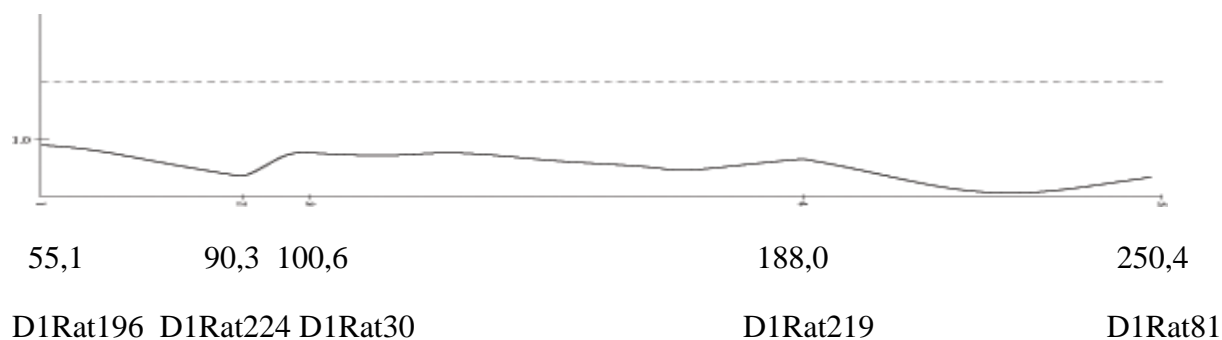
**График № 13. Время, проведенное в закрытом пространстве в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



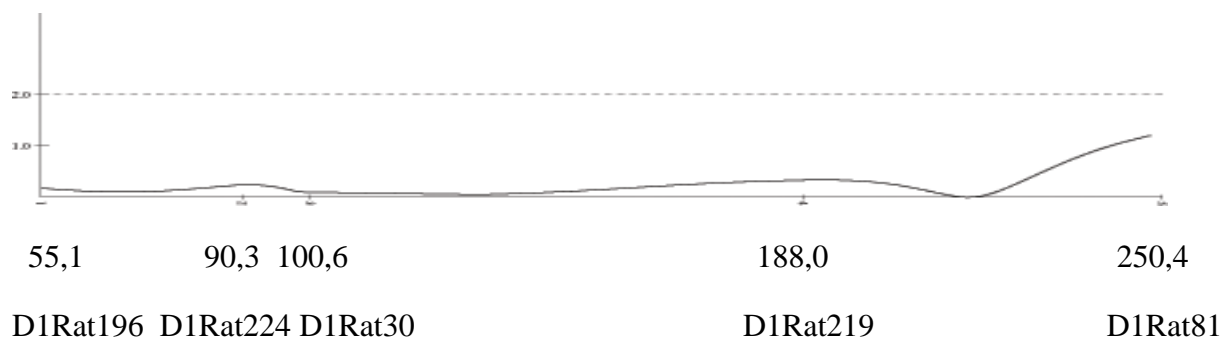
**График № 14. Количество дефекаций в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



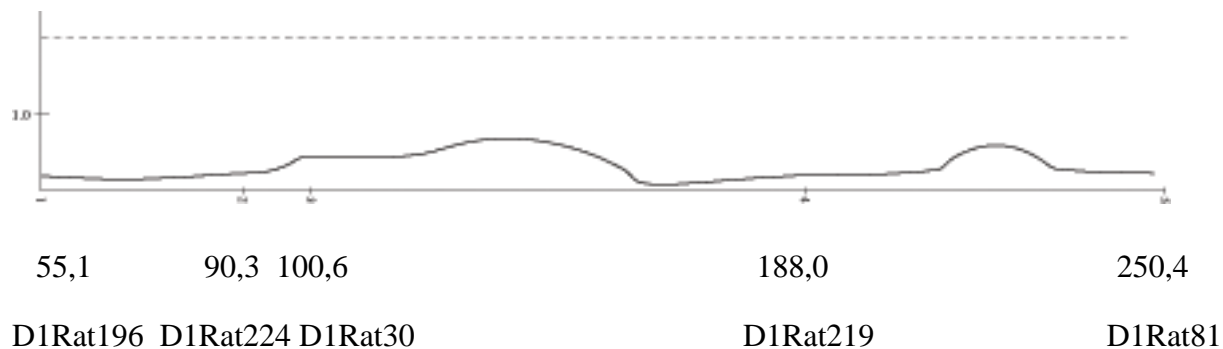
**График № 15. Количество вертикальных стоек в тесте «крестообразный лабиринт».**

LOD score



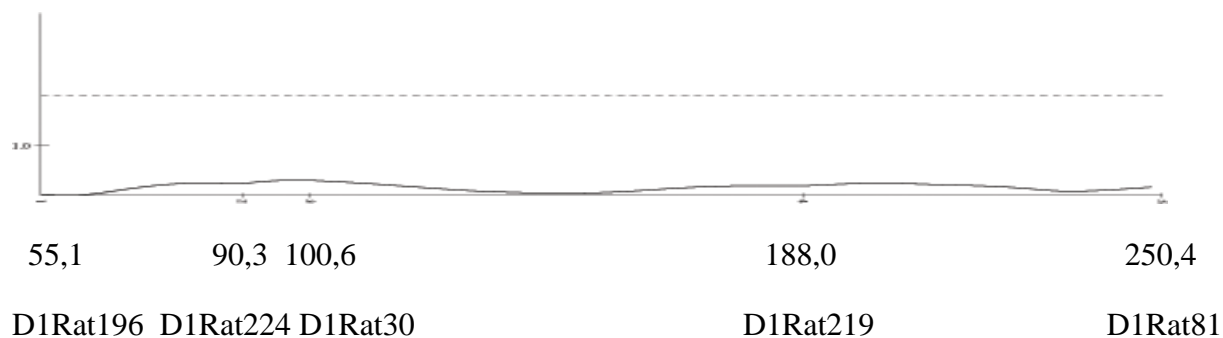
**График № 16. Количество дефекаций в тесте «открытое поле».**

LOD score



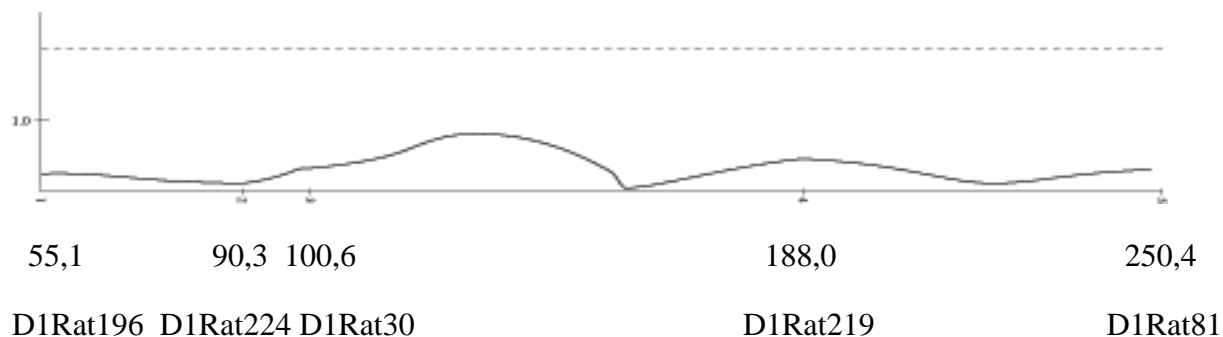
**График № 17. Количество актов груминга в тесте «открытое поле».**

LOD score



**График № 18. Количество пересеченных квадратов в тесте «открытое поле».**

LOD score



**Приложение 3. Гены, ассоциированные с развитием болезни Альцгеймера.** Перечислены исследованные в настоящей работе гены, согласно выполненному анализу литературных данных, ассоциированные с развитием аутосомно-доминантной или спорадической формы БА. Сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных в последовательности кДНК крыс OXYS и WAG, проводился для генов-ортологов.

Символ гена	Ассоциация с БА	Публикации
<i>APP, PSEN1, PSEN2</i>	Мутации приводят к развитию аутосомно-доминантной формы БА, в т.ч. за счет увеличения продукции форм $\beta$ -амилоида.	Jack <i>et al.</i> , 2011; Ryoichi Yagi <i>et al.</i> , 2014
<i>BACE1</i>	Кодирует аспарагиновую протеазу, инициирующую образование $\beta$ -амилоида из белка-предшественника.	Kandalepas, Vassar, 2014
<i>PICALM, BIN1, CD33, CD2AP, CLU, EPHA1, CRI, ABCA7, MS4A-4A, 4E, 6E</i>	Ассоциации выявлены согласно исследованиям GWAS.	Shi H. <i>et al.</i> , 2012 Kamboh <i>et al.</i> , 2012
<i>APOE</i>	4-изоморфный вариант гена признан основным генетическим фактором риска развития спорадической формы БА. Варианты приводят к увеличению отложения амилоида в бляшках и сосудах.	Genin <i>et al.</i> , 2011; Saunders <i>et al.</i> , 1993; Schmidt <i>et al.</i> , 2014
<i>PLD3</i>	Вариант <i>PLD3 V232M</i> ассоциирован с повышенным риском развития БА.	Cruchaga <i>et al.</i> , 2014
<i>HADH2, APBA1, AGER, GSK3B, CDKHR1, APPBP1, SNCA, APBA2,</i>	Ассоциация выявлена по данным физиологического геномного анализа.	Wiwanitkit, 2013



<i>GAL,</i> <i>APLP2,</i> <i>CASP3,</i>		
<i>NCSTN,</i> <i>PSENEN</i>	Кодируют компоненты $\gamma$ -секретазного комплекса, катализирующего расщепление белка-предшественника амилоида.	Hansson <i>et al.</i> , 2004
<i>SORL1</i>	Генетические варианты <i>SORL1</i> ассоциированы с развитием БА. Белковый продукт гена принимает участие в транспорте белка-предшественника амилоида.	Alexopoulos <i>et al.</i> , 2011; Willnow, Andersen, 2013; Capsoni <i>et al.</i> , 2013
<i>FYN, SV2a,</i> <i>RNF219</i>	Гены, функционально ассоциированные с эндоцитозом и метаболизмом белка-предшественника амилоида; потенциально являются регуляторными медиаторами эффекта АРОЕ4.	Rhinn <i>et al.</i> , 2013
<i>TREM2</i>	Отдельные аллельные варианты ассоциированы с уровнем содержания tau-белка в цереброспинальной жидкости и с выраженностью атрофических изменений мозга у пациентов с диагнозом БА.	Rajagopalan <i>et al.</i> , 2013; Cruchaga <i>et al.</i> , 2013