

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

Кожевникова Оюна Суранзановна

**ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА СЕТЧАТКИ КРЫС OXYS
С ВОЗРАСТОМ ПРИ РАЗВИТИИ РЕТИНОПАТИИ**

03.02.07 Генетика

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Колосова Наталия Гориславовна

Новосибирск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 10 |
| 1.1. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД)..... | 10 |
| 1.1.1. <i>Возрастные изменения сетчатки</i> | 12 |
| 1.1.2. <i>Патогенез ВМД</i> | 14 |
| 1.1.3. <i>Генетические факторы ВМД</i> | 23 |
| 1.2. Исследования транскриптома сетчатки..... | 25 |
| 1.3. Модели ВМД..... | 29 |
| 1.3.1. <i>Геномодифицированные модели ВМД</i> | 30 |
| 1.3.2. <i>«Естественные» модели ВМД</i> | 31 |
| 1.4. Функциональные и морфологические особенности крыс линии OXYS..... | 33 |
| 1.4.1. <i>Крысы OXYS – модель ВМД</i> | 39 |
| 1.5. Молекулярно-генетические методы выявления генов, участвующих в генетическом контроле и патогенезе комплексных заболеваний..... | 43 |
| 1.5.1. <i>Картирование генов комплексных заболеваний</i> | 45 |
| 1.5.2. <i>Методы определения транскрипционных профилей</i> | 47 |
| 1.1.5.1. <i>ДНК-микрочипы</i> | 48 |
| 1.1.5.2. <i>Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq)</i> | 51 |
| Заключение..... | 54 |
| ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 57 |
| 2.1. Материалы, использованные в работе..... | 57 |
| 2.2. Животные..... | 57 |
| 2.3. Офтальмологические осмотры..... | 58 |
| 2.4. Забор и хранение образцов..... | 58 |
| 2.5. Световая микроскопия..... | 58 |
| 2.6. Анализ ДНК-микрочипов..... | 58 |
| 2.6.1. <i>Выбор олигонуклеотидных зондов</i> | 59 |
| 2.6.2. <i>Изготовление ДНК-микрочипов</i> | 59 |
| 2.6.3. <i>Гибридизация</i> | 59 |
| 2.6.4. <i>Обработка данных</i> | 60 |
| 2.7. Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq)..... | 61 |
| 2.7.1. <i>Секвенирование на платформе Illumina</i> | 61 |
| 2.7.2. <i>Картирование и анализ дифференциальной экспрессии</i> | 61 |

| | |
|---|-----|
| 2.8. Выделение РНК..... | 62 |
| 2.9. Обратная транскрипция..... | 63 |
| 2.10. Полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ)..... | 63 |
| 2.10.1. Праймеры для ПЦР-РВ..... | 63 |
| 2.11. Выделение белка..... | 64 |
| 2.12. Содержание амилоидного пептида А β 42 в сетчатке крыс | 65 |
| 2.13. Содержание белка Сгуаb в сетчатке крыс..... | 65 |
| 2.14. Иммунофлуоресцентная микроскопия..... | 66 |
| 2.14.1. Приготовление препаратов..... | 66 |
| 2.14.2. Анализ и обработка изображений..... | 66 |
| 2.15. Статистический анализ..... | 66 |
| ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ | 67 |
| 3.1. Анализ заболеваемости конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 ретинопатией..... | 67 |
| 3.2. Функциональная аннотация локусов QTL, ассоциированных с развитием признаков преждевременного старения у крыс OXYS..... | 69 |
| 3.3. Отбор генов-кандидатов на целевой ДНК-микрочип..... | 71 |
| 3.4. Определение статуса экспрессии генов-кандидатов методом анализа ДНК-микрочипов.... | 73 |
| 3.5. Анализ данных RNA-seq..... | 76 |
| 3.6. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов..... | 88 |
| 3.7. Накопление амилоидного пептида А β в сетчатке крыс OXYS..... | 95 |
| ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ..... | 101 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 120 |
| ВЫВОДЫ..... | 121 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 122 |
| Приложение 1..... | 148 |
| Приложение 2..... | 151 |
| Приложение 3..... | 155 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК** – активные формы кислорода
- БСА** – бычий сывороточный альбумин
- БХ** – поправка Бенжамини-Хохберга
- ВМД** – возрастная макулярная дегенерация
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДЭ** – дифференциально экспрессирующиеся (гены)
- ИФА** – иммуноферментный анализ
- кДНК** – комплементарная ДНК
- мРНК** – матричная мРНК
- МРТ** – магниторезонансная томография
- н.о.** – нуклеотидные основания
- ПГАА** - полногеномный анализ ассоциаций
- ПОЛ** – продукты перекисного окисления липидов
- п.н.** – пар нуклеотидов
- ПЦР-РВ** – полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РНК** – рибонуклеиновая кислота
- РПЭ** – ретинальный пигментный эпителий
- Трис** – трис(гидроксиметил)аминометан
- ХНВ** – хориоретинальная неоваскуляризация
- ЦНС** – центральная нервная система
- ЭДТА** – этилендиаминтетрауксунная кислота
- A2E** – бис-ретиналиден-этаноламин
- A β** – амилоидный пептид
- CDCV** – гипотеза «распространенная болезнь – распространенный генетический вариант» (Common Disease – Common Variant hypothesis)
- CDRV** – гипотеза «распространенная болезнь – множественные редкие генетические варианты» (Common Disease – Multiple Rare Variants hypothesis)
- FDR** – false discovery rate
- FKPM** – fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments
- RNA-seq** – метод массового параллельного секвенирования
- KEGG** – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- QTL** – локус количественного признака
- SDS** – лаурилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

С увеличением продолжительности жизни населения в развитых странах связанные со старением заболевания, в том числе нейродегенеративные, занимают все большую долю в структуре заболеваемости. Поэтому особую актуальность приобретает задача выявления молекулярно-генетических механизмов старения и развития связанных с ним заболеваний.

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это сложное, многофакторное нейродегенеративное заболевание тканей глазного дна, которое становится причиной нарушения и потери зрения у людей старше 60 лет. Патогенез заболевания до конца не ясен, эффективных способов лечения нет. В основе патогенеза ВМД лежат характерные для старения изменения хориокапилляров, ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и мембраны Бруха, которые, в конце концов, приводят к дегенерации нижележащих слоев сетчатки. Показано, что развитие ВМД по ряду параметров сходно с развитием болезни Альцгеймера (Kaarniranta et al. 2011, Sivak J.M. 2013). Возраст является необходимым, но недостаточным условием развития заболевания. Сложное взаимодействие между генетическими и средовыми факторами определяет восприимчивость к заболеванию. Несмотря на значительное количество работ, выявивших ассоциации ВМД с полиморфизмами в нескольких десятках генов, конкретные молекулярно-генетические механизмы развития ВМД, способствующие переходу нормальных физиологических возрастных изменений сетчатки в патологический процесс, не известны. Их знание – необходимое условие выявления новых терапевтических мишеней для создания патогенетически обоснованных способов профилактики и лечения ВМД. Снижение клеточных функций при старении сопряжено с изменением экспрессии многочисленных генов. Выявить их и определить метаболические пути, изменения активности которых лежат в основе возрастных изменений и развития ассоциированных со старением заболеваний, позволяют исследования транскриптома, изучать которые на людях проблематично.

Продуктивный подход к исследованию патогенеза заболеваний - создание биологических моделей. Уникальной моделью ВМД является созданная в ИЦиГ СО РАН линия преждевременно стареющих крыс OXYS. Уже в молодом возрасте у крыс OXYS выявляется ретинопатия, по клиническим проявлениям и морфологическим признакам соответствующая ВМД у людей (Жданкина и др. 2008, Сапрунова и др. 2010,

Markovets et al. 2011). Это признанная модель ВМД (Pennesi et al. 2012), которая плодотворно используется для оценки эффективности новых методов лечения и профилактики заболевания, изучения его патогенеза (Фурсова и др. 2005, Kolosova et al. 2012, Markovets et al. 2011a, Stefanova et al. 2010, 2011). Линия была создана селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. Сцепленно с катарактой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе - ускоренное старение мозга и ретинопатию. Механизмы развития признаков преждевременного старения крыс OXYS остаются неясными, но их комплексное проявление уже в молодом возрасте предполагает общие молекулярно-генетические основы.

Ранее методом QTL-анализа (локусы количественного признака, quantitative trait locus) (Korbolina et al. 2012) были выявлены 2 локуса 1-й хромосомы, предположительно ассоциированных с развитием у крыс OXYS катаракты, ретинопатии и поведенческих проявлений ускоренного старения мозга. На базе генома крыс WAG нами совместно с Е.Е.Корболиной были получены 2 конгенные линии, каждая из которых несёт по одному из выявленных локусов QTL крыс OXYS. В случае выявления у этих животных ретинопатии конгенные линии также могут служить уникальным инструментом для выявления генетических основ её развития.

Старение и возрастные заболевания связаны с изменениями в экспрессии многих генов. Полный и одновременный анализ экспрессии генов рассматривается сегодня как один из наиболее перспективных подходов к выявлению патогенетических механизмов, обуславливающих процессы старения и развития возрастных заболеваний. В данной работе нами впервые была использована технология массового параллельного секвенирования (RNA-seq) для исследования возрастных изменений транскриптома сетчатки крыс - преждевременно стареющих крыс OXYS и контрольных - Вистар.

Целью настоящей работы являлось выявление генов, с изменениями экспрессии которых связано развитие ретинопатии у крыс OXYS.

Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить заболеваемость крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 ретинопатией.

2. Провести функциональную аннотацию локусов QTL 1-й хромосомы, отобрать гены-кандидаты, разработать для них целевой олигонуклеотидный ДНК-микрочип и

оценить с его помощью экспрессию отобранных генов в сетчатке крыс OXYS, WAG/OXYS-1.2 и Вистар.

3. Методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq) исследовать изменения с возрастом транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар, определить межлинейные различия в экспрессии генов, провести выборочную проверку данных RNA-seq методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

4. Провести функциональную аннотацию дифференциально экспрессирующихся генов и выявить метаболические пути, с изменениями которых ассоциировано развитие ретинопатии у крыс OXYS.

Научная новизна работы. Впервые методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq) исследован профиль экспрессии генов в сетчатке крысы. На основании сравнения транскриптома сетчатки крыс Вистар и OXYS разного возраста определены гены, экспрессия которых изменяется с возрастом и при развитии ретинопатии у крыс OXYS. Показано, что с возрастом в сетчатке крыс обеих линий изменяется экспрессия более 100 генов, большинство из которых связаны с иммунной системой и внеклеточным матриксом. Из них только 24 гена были общими для крыс OXYS и Вистар. Установлено, что развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне изменения уровня мРНК более 600 генов, основная часть которых связана с иммунным ответом, воспалением, ответом на окислительный стресс, Ca^{2+} гомеостазом и апоптозом. Установлено, что у крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, полученных переносом ассоциированных с признаками преждевременного старения локусов QTL 1-й хромосомы крыс OXYS в геном крыс WAG, развивается ретинопатия, пенетрантность которой ниже, чем у крыс OXYS. Функциональная аннотация локусов QTL выявила их обогащение генами, связанными с нейродегенерацией, в том числе – с метаболическим путем болезни Альцгеймера. Из локусов QTL 1-й хромосомы отобраны гены-кандидаты, для которых разработан олигонуклеотидный ДНК-микрочип. Методом анализа ДНК-микрочипов в сетчатке крыс OXYS выявлены различия в экспрессии генов *Picalm* и *Arpa2*, продукты которых связаны с процессингом белка-предшественника амилоида APP. Впервые показано, что развитие у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, сопряжено с усиленным накоплением в сетчатке амилоида A β 42.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты исследования вносят вклад в фундаментальные знания о транскриптоме сетчатки крыс как в норме, так и при развитии ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, и могут быть востребованы для поиска новых терапевтических мишеней при создании препаратов, направленных на профилактику и лечение этого заболевания. В ходе работы разработан ДНК-микрочип для 112 генов крысы - маркеров нейродегенеративных процессов, значительная часть которых - гены из локусов QTL, ассоциированных с развитием признаков преждевременного старения крыс OXYS. Дизайн ДНК-микрочипа может быть использован в исследованиях изменений экспрессии генов при развитии нейродегенеративных процессов на модельном объекте *Rattus norvegicus*. Полученные результаты использованы при создании базы данных RatDNA DB (свид. №2012621051).

Положения, выносимые на защиту:

1. С возрастом у крыс OXYS, как и у крыс Вистар, в сетчатке изменяется экспрессия генов, ассоциированных с иммунной системой и внеклеточным матриксом.
2. Развитие ретинопатии у крыс OXYS происходит на фоне изменения уровня мРНК более 600 генов, основная часть которых связана с иммунным ответом, воспалением, окислительным стрессом, Ca^{2+} гомеостазом и апоптозом.
3. Развитие у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, ассоциировано с усиленным накоплением в сетчатке амилоида $\text{A}\beta 42$.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на научных конференциях: «FEBS Congress» (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; Москва, 2012), «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), «7th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure - BGRS» (Новосибирск, 2010), IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Основные публикации

1. **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. – V.14. – N. 6. – P. 753-762.

2. **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. – V.12. – N.11. – P. 1745-1761.
3. 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. – V.4. – N.1. – P.49-59.
4. **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.
5. **Ойдопова (Кожевникова) О.С.**, Польшгалова Н.Е., Корболина Е.Е., Колосова Н.Г. Поиск генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21. – № 3. – С. 499–500.

ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе рассматриваются 1) современные представления о патогенезе и генетических факторах развития ВМД; 2) исследования ВМД на моделях животных; 3) функциональные и морфологические особенности преждевременно стареющих крыс OXYS и доказательства адекватности использования ретинопатии крыс OXYS в качестве модели ВМД; 4) подходы к изучению механизмов комплексных заболеваний, к которым относятся все зависимые от возраста болезни человека.

1.1. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД)

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся поражением центральной зоны сетчатки (макулы). ВМД становится основной причиной нарушения и потери зрения людьми пожилого возраста в развитых странах, где заболеваемость ВМД растет на фоне увеличения продолжительности жизни и старения населения. Эпидемиологические исследования показали, что примерно 10% лиц старше 65 лет и 28% старше 75 лет имеют признаки ВМД (Ratnapriya, Chew 2013).

ВМД относится к группе комплексных возрастзависимых болезней, возникающих при совместном участии генетических и средовых факторов. Пожилой возраст и наследственная предрасположенность являются самыми мощными факторами риска данного заболевания (Chakravarthy et al. 2010, Klein et al. 2011, Bressler et al. 2008, Rein et al. 2009). Кроме того, на возникновение и прогрессирование ВМД влияют курение (Chakravarthy et al. 2007), нарушения липидного обмена (гиперхолестеринемия), неправильное питание (антиоксидантный статус), артериальная гипертензия (Chakravarthy et al. 2010). Вклад генетической компоненты в развитие ВМД оценивают от 45% до 71% (Scholl et al. 2007, Sanfilippo et al. 2010).

Впервые сенильная макулярная дегенерация была описана в 1885 г., однако клиницистам понадобились десятилетия для обнаружения связи между друзами в макуле и другими признаками ВМД, например, дисциформными рубцами, которые образуются на последней стадии влажной формы ВМД. Только к середине XX века Дональд Гэсс классифицировал все клинические признаки дегенерации макулы: друзы, серозная отслойка пигментного эпителия, хориоретинальная васкуляризация,

географическая атрофия и др. как проявления единого заболевания – ВМД (Gass J.D. 1972).

Первыми признаками ВМД являются видимые при офтальмоскопическом осмотре желтоватые отложения на глазном дне, так называемые друзы, и изменения пигментации макулы (Davis et al. 2005, Ferris et al. 2005). Друзы – это внеклеточные отложения, которые образуются между клетками ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и внешней коллагеновой зоной мембраны Бруха. Выделяют два типа друз: малые твердые ($<63\text{ }\mu\text{m}$ с четкими краями) и крупные мягкие ($>70\text{ }\mu\text{m}$ с нечеткими краями). Наличие твердых друз в отсутствие других изменений не приводит к развитию ВМД и встречается при нормальном старении сетчатки (Munch et al. 2007). Крупные мягкие друзы с нечеткими границами в сочетании с изменениями пигментации являются диагностическим маркером ВМД (Scholl et al. 2007, Thompson et al. 2007). У больных ВМД выявляется широкий спектр клинических признаков заболевания: разные размеры друз и степень изменения пигментации РПЭ от гипо- до гиперпигментации. Как правило, на ранней стадии ВМД зрение сохраняется (Thompson et al. 2007).

Прогрессивные стадии ВМД, сопровождающиеся потерей зрения, подразделяют на сухую и влажную формы заболевания. При сухой форме, или географической атрофии, наблюдаются обширные зоны атрофии клеток РПЭ и хориокапилляров, которая приводит к вторичной гибели подлежащих фоторецепторов и постепенной потере зрения (Nowak J. 2006). Географическая атрофия определяется на оптической когерентной томографии как участки сетчатки с существенным снижением толщины (Miller J.W. 2013). Около 90% случаев ВМД соответствует сухой форме (Gehrs et al. 2006). Более тяжелая влажная форма, или хориоретинальная неоваскуляризация (ХНВ), связана с проростом новых сосудов хориоидеи во внутренние слои сетчатки. Отек сетчатки, твердые экссудаты, серозная отслойка пигментного эпителия, субретинальные и кровоизлияния – признаки, которые указывают на наличие ХНВ (Davis et al. 2005). Прогрессирует влажная ВМД намного быстрее, чем сухая, приводя к резкой потере центрального зрения. Несмотря на то, что только 10% всех пациентов с ВМД имеют влажную форму, на её долю приходится 90% случаев слепоты от данного заболевания (Gehrs et al. 2006). Схематически структурные изменения в сетчатке с ВМД представлены на *рисунке 1*.

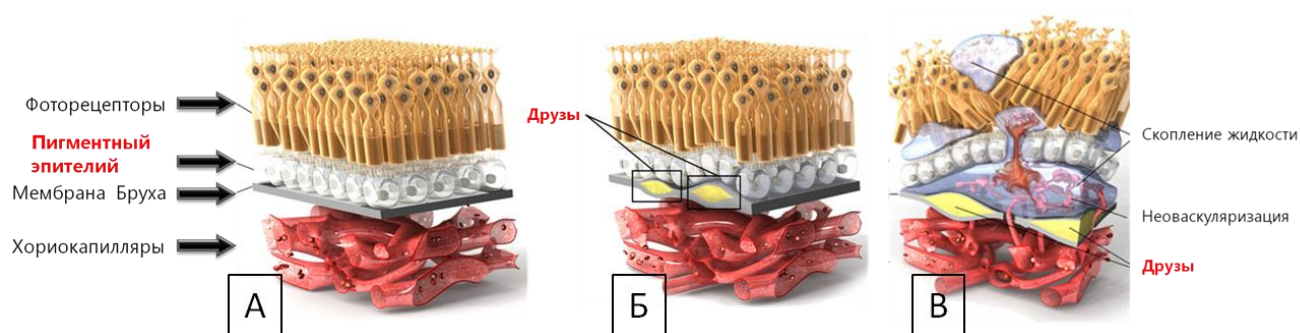


Рисунок 1. Схематическое изображение структур сетчатки, вовлеченных в патогенез ВМД. А. Норма. Б. Ранние стадии ВМД. В. Поздние стадии ВМД. (<http://www.scienceofamd.org>)

1.1.1. Возрастные изменения сетчатки

Пожилой возраст является основным фактором риска ВМД и необходимым условием заболевания. Поскольку заболевание развивается не у всех пожилых людей, вклад возрастных изменений сетчатки в развитие ВМД не до конца ясен. Возрастные изменения в комплексе с генетической предрасположенностью становятся основой развития заболевания (*рис.2*).

В процессе нормального старения сетчатка подвергается структурно-функциональным изменениям. В клетках РПЭ снижается количество меланиновых гранул, нарушается базальная складчатость, происходит редукция микроворсинок апикальной части (Bonilha et al. 2008, Ehrlich et al. 2008). Клетки РПЭ уплощаются и укорачиваются, уменьшается их плотность. С возрастом снижается число и площадь митохондрий РПЭ, изменяется их морфология. Вместе с тем в клетках РПЭ растет число пероксисом и липофусциновых гранул (Feher et al. 2006). Между РПЭ и мембраной Бруха формируются твердые друзы.

Существенные возрастные изменения происходят в мембране Бруха: ее утолщение (Ramrattan et al. 1994), потеря эластичности, появление очагов кальцификации, увеличение количества поперечных сшивок коллагена, снижение диффузной проницаемости (Sivaprasad et al. 2005, Booij et al. 2010). Изменяется состав и размер протеогликанов мембраны Бруха в направлении увеличения фракции гепарансульфатированных протеогликанов, происходит накопление конечных продуктов гликирования белков и липидов (AGEs) и субретинальных депозитов.

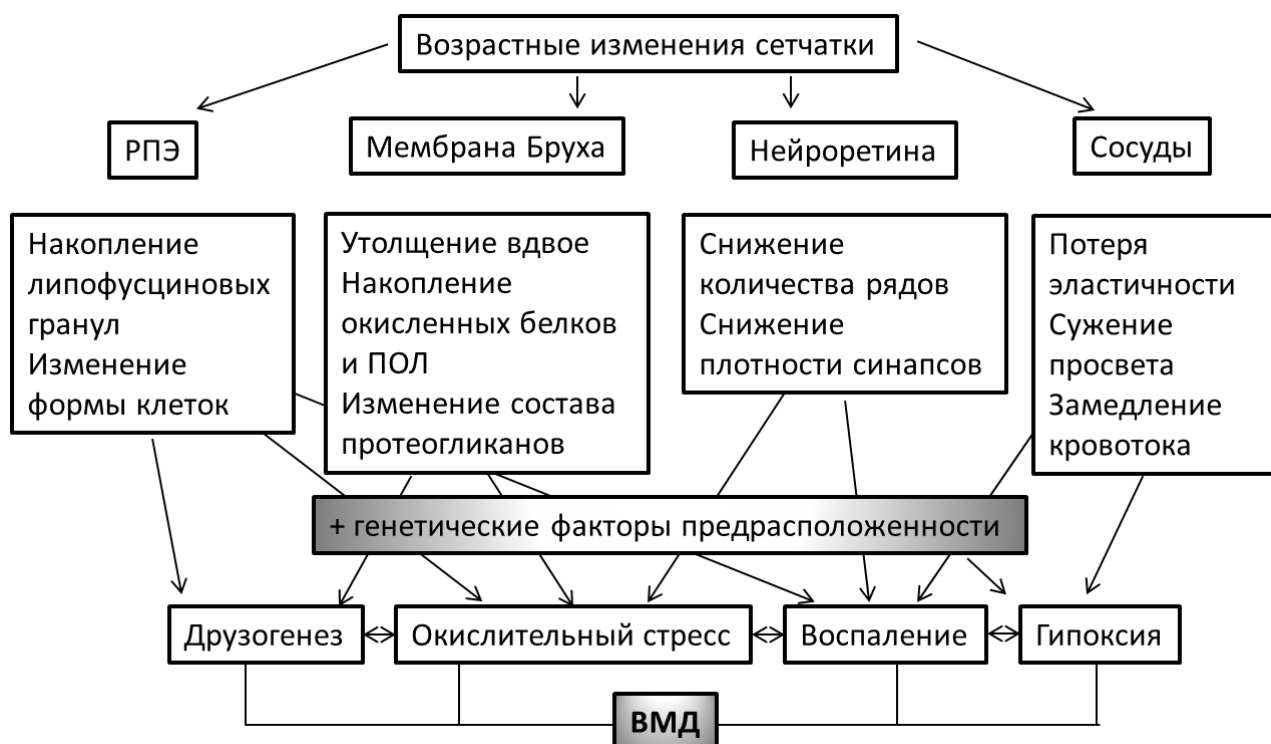


Рисунок 2. Возрастные изменения сетчатки и гипотетические механизмы патогенеза ВМД.

С возрастом происходит уменьшение числа функционирующих сосудов, особенно конечных разветвлений и анастомозов. Наблюдаются склеротизация стенок хориокапилляров и сужение их просвета (McLeod et al. 2009). По данным флуоресцентной ангиографии у лиц старше 65 лет замедляется кровоток как в артериальной, так и венозной системах сетчатки (Ito et al. 2001). Морфологические исследования свидетельствуют о развитии фиброза и гиалинового перерождения сосудистой стенки, утолщения базальной мембраны, коллагенизации фибрилл. При этом сосуды перестают быть эластичными и становятся ригидными. Снижение кровообращения и транскapиллярного обмена веществ способствует возникновению дистрофических изменений в сетчатке (Фурсова А.Ж. 2009, Cavallotti et al. 2004).

В отличие от РПЭ и хориоидеи, слои внутренней сетчатки, или нейроретины, менее подвержены возрастным морфологическим изменениям. Так, в работе Samuel и соавт. (2011) сравнение числа нейронов каждого типа в сетчатках 3-х и 28-месячных мышей не выявило значимых различий. Тем не менее электрофизиологическими методами было показано снижение с возрастом функциональности дендритов и аксонов нейронов, в большей степени нейронов ганглионарных. По данным сканирующей электронной микроскопии в сетчатке с возрастом уменьшается общее число

межклеточных соединений и синаптических контактов между нейронами (Cavallotti et al. 2004).

У людей и крыс было выявлено существенное снижение толщины сетчатки с возрастом, при этом ганглионарный слой нейронов был наиболее подвержен потере клеток (Cavallotti et al. 2001, 2004). В другой работе на мышах также отмечалось достоверное уменьшение количества ганглионарных нейронов (Kawai et al. 2001). Вместе с тем гистологические исследования противоречат данным, полученным в результате оптической когерентной томографии у людей. Эти данные свидетельствуют об увеличении толщины сетчатки с возрастом, зависящей также от пола и этнической принадлежности (Kashani et al. 2010). Очевидно, что скорость возрастного снижения количества фоторецепторов и других нейронов сетчатки генетически детерминирована, поскольку у разных линий мышей и крыс она существенно отличается (Danciger et al. 2007), что должно учитываться при выборе модели ускоренной дегенерации сетчатки.

Таким образом, возрастные изменения в сетчатке создают «благоприятные» условия для развития патологических процессов (de Jong et al. 2006).

1.1.2. Патогенез ВМД

В патогенезе ВМД тесно связано множество факторов, приводящих к развитию характерных для этого заболевания нарушений зрительной функции. Было предложено множество патогенетических механизмов для объяснения сложной этиологии ВМД, включающие окислительный стресс, митохондриальные дисфункции, патологические изменения сосудов, накопление токсических соединений, таких, как липофусцин и продукты AGE (advanced glycation end products), аутофагия и апоптоз клеток РПЭ, лизомальная дисфункция РПЭ и другие (Damico et al. 2012). Из всего разнообразия существующих теорий развития ВМД на сегодня ни одна из них не может быть принята в качестве основной (Miller J.W. 2013). Вполне вероятно, что эти механизмы действуют параллельно.

Предполагается, что в основе ВМД лежат характерные для старения изменения хориокапилляров, ретинального пигментного эпителия и мембраны Бруха, но механизмы, запускающие переход обычных возрастных изменений в патологический процесс, до конца не ясны (Ardeljan, Chan 2013). В настоящее время основную роль в развитии заболевания отводят структурно-функциональным изменениям монослоя клеток РПЭ, который лежит между фоторецепторами и мембраной Бруха и служит

селективным барьером между нейроретиной и хориоидальной кровеносной системой (Feigl B. 2009).

Поддержание функций РПЭ является критичным для зрения. Эти клетки выполняют такие важные для сетчатки функции, как транспорт веществ между сосудами хориоидеи и фоторецепторами, фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов, участвуют в зрительном цикле (изомеризации транс-формы ретиналя в 11-цис форму), обеспечивают ионный гомеостаз, защиту от окислительных повреждений и секреция различных ростовых факторов и цитокинов (Strauss O. 2005). Мембрана Бруха является внеклеточной матриксной структурой, состоящей из 5 слоев: базальной пластинки хориокапилляров, наружного коллагенового слоя, центрального эластичного слоя, внутреннего коллагенового слоя и базальной пластинки РПЭ. Слои мембраны Бруха в норме постоянно обновляются. В процессе ее перестройки участвуют матриксные металлопротеиназы (MMPs) и их ингибиторы (TIMPs). Дефекты метаболизма мембраны Бруха могут стать причиной развития ХНВ при влажной форме ВМД (Chong et al. 2005). В пользу этого свидетельствует высокий уровень TIMPs в мембране Бруха при ВМД (Kamei et al. 1999).

Важную роль в патогенезе ВМД играет окислительный стресс - нарушение баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК) - вероятность которого при старении растет на фоне ослабления системы антиоксидантной защиты и увеличения генерации АФК (Jarrett and Boulton 2012, Evans et al. 2008). Сетчатка – наиболее активная в потреблении кислорода ткань в организме человека с уровнем потребления на 50% больше, чем в мозге (Rattner et al. 2006). Такой интенсивный обмен повышает вероятность развития окислительного стресса, что при недостаточной эффективности работы систем антиоксидантной защиты может приводить к дегенеративным процессам. При ВМД было обнаружено высокое содержание внутриклеточного свободного железа, индуктора окислительного стресса (He et al. 2007, Loh et al. 2008). Уровни маркеров окислительного стресса - малонового альдегида, карбонильных групп белков и 8-охоГ - достоверно повышены, а показатель общей антиоксидантной активности в сыворотке крови больных ВМД по сравнению со здоровыми людьми понижен (Totan et al. 2009, Venza et al. 2012).

Молекулярный состав друз был подробно исследован (Hageman et al. 2001, Crabb et al. 2002, Johnson et al. 2002, Booij et al. 2010). Было найдено более 100 различных

белков (белки острой фазы, С-реактивный белок, компоненты комплемента, ингибиторы комплемента, аполипопротеины) и липидов, из них 65% белков присутствует в друзах, изолированных из здоровых сетчаток. Друзы больных ВМД отличаются повышенным накоплением кристаллинов, белков системы комплемента и амилоида. Значительную долю друз составляют окислительно модифицированные белки и продукты перекисного окисления липидов, что свидетельствует о роли окислительного стресса в их формировании (Crabb et al. 2002, Ding et al. 2009).

В нескольких исследованиях было предположено, что процесс образования друз схож с образованием сенильных бляшек при болезни Альцгеймера (Johnson et al. 2002, Maccioni et al. 2001). Обе болезни характеризуются накоплением внеклеточных отложений, таких как аполипопротеин E (ApoE) и амилоидный пептид (A β). ApoE участвует в катаболизме и транспорте липидов и является основным липопротеиновым компонентом друз (Wang et al. 2010). Сообщалось, что полиморфизмы гена ApoE ассоциированы с ВМД и болезнью Альцгеймера (McKay et al. 2011). Амилоидный пептид, составляющий большую часть сенильных бляшек в мозге, был обнаружен в составе друз (Johnson et al. 2002). В дальнейшем было показано, что друзы, содержащие A β , обнаруживаются только в сетчатке больных ВМД (Dentchev et al. 2003), а количество A β в ней коррелировало с тяжестью заболевания (Anderson et al. 2004). Более того, на модели ВМД – мышах ApoE4-HFC, у которых в сетчатке выявляются друзоподобные отложения, содержащие A β , был продемонстрирован профилактический эффект вакцинации анти-A β пептидом. У вакцинированных мышей с возрастом сохранялась структурная целостность РПЭ, а уровень A β и компонентов комплемента был ниже, чем у контрольных животных (Ding et al. 2011). В *in vitro* исследованиях было показано, что источником A β в сетчатке являются клетки РПЭ, а A β является проангиогенным фактором, влияющим на баланс ключевых регуляторов ангиогенеза в сетчатке – фактора роста сосудистого эндотелия VEGF и его антогониста фактора пигментного эпителия (pigment-epithelium derived factor) PEDF (Yoshida et al. 2005). Недавно обнаружено присутствие и накопление с возрастом A β в наружных сегментах фоторецепторов в нормальной сетчатке человека, что предполагает его участие в зрительной функции (Hoh Kam et al. 2010). Booij с соавт. (2010) сравнили данные о протеомном составе друз, атеросклеротических бляшек и сенильных бляшек, формирующихся при болезни Альцгеймера, и показали, что друзы по составу ближе к

сенильным бляшкам: помимо А β они содержат 24 общих белка (20%), таких, как CRYAB, APP, CLU, VTN, APOE, C3, FGG и др.

В работе Nordgaard (2006) был проведен анализ протеома постмортальных образцов РПЭ у больных с разной стадией ВМД методом 2D электрофореза с последующей MALDI-TOF спектрометрией. На ранней стадии ВМД в РПЭ был обнаружен сниженный уровень белков шаперонов (HSP60, HSP70, HSC-70), однако на поздних стадиях ВМД их уровень не отличался от уровня, характерного для РПЭ людей без ВМД. С прогрессированием заболевания снижался уровень белка кристаллина CRYAA. На развитых стадиях заболевания (2 и 3 по шкале AREDS) были обнаружены разнонаправленные изменения в экспрессии белков, связывающих ретинол и участвующих в зрительном цикле (снижение CRABP1 и повышение CRALBP), а также повышение уровня глутатион-S-трансферазы (GST- π).

Еще в начале 70-х гг. прошлого века Hogan M.J. предположил, что возрастные изменения в мембране Бруха и РПЭ способствуют накоплению побочных продуктов фагоцитоза наружных сегментов фоторецепторов, в частности липофусциновых гранул, что провоцирует развитие ВМД (Hogan M.J. 1972). В процессе активного фагоцитоза наружных сегментов фоторецепторов в РПЭ образуется липофусцин в результате его неполного переваривания в лизосомах (Kaarniranta et al. 2010, Schütt et al. 2000) и, возможно, в меланосомах (Biesemeier et al. 2011). Накопление липофусцина в клетках РПЭ приводит к повышению аутофлуоресценции глазного дна, что является основой клинического метода аутофлуоресцентной томографии глазного дна (Schmitz-Valckenberg et al. 2009, Sparrow et al. 2010). При ВМД, как правило, обнаруживается высокое содержание липофусциновых гранул и их фототоксичного флуорофора А2Е (бис-ретиналиден-этаноламин) (Gray et al. 2005, Sparrow et al. 2005). Было показано, что А2Е ингибирует лизосомальную функцию (Finnemann et al. 2002) и метаболизм холестерина в РПЭ (Lakkaraju et al. 2007). А2Е действует как фотосенсибилизатор и опосредует индуцируемый ультрафиолетом апоптоз (Sparrow et al. 2001). Кроме того, накопление А2Е может способствовать активации системы комплемента (Zhou et al. 2009) и влиять на активацию микроглии (Ma et al. 2012). Таким образом, А2Е оказывает токсический эффект на клетки РПЭ (Sparrow et al. 2005).

В последнее время доминирующей версией возникновения и прогрессирования ВМД является гипотеза о дисфункции иммунной системы (Anderson et al. 2010, Xu et al.

2009). В пользу роли иммунной системы в развитии ВМД свидетельствует ряд фактов: 1) в составе друз содержатся провоспалительные молекулы; 2) найдены ассоциации ВМД с полиморфизмами в генах системы комплемента; 3) исследования на модельных объектах ВМД показали активацию экспрессии генов врожденной системы иммунитета и маркеров воспаления в сетчатке.

Изменения в иммунной системе играют важную роль в развитии ВМД. Ранние исследования гистологических препаратов сетчатки с диагнозом ВМД показали наличие в образцах повышенной иммунореактивности к белкам главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II и иммуннокомпетентных клеток: активированной микроглии, мононуклеарных фагоцитов, мультиядерных гигантских клеток (Penfold et al. 1997). Обсуждалась также роль инфекционных патогенов, таких как *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori* и *Cytomegalovirus*, в развитии ВМД (Barouch et al. 2007). В друзах была обнаружена специфическая иммунореактивность к разным типам иммуноглобулинов (Johnson et al. 2000, Mullins et al. 2000), причем твердые друзы и окружающие их клетки РПЭ проявляют иммунореактивность к IgG, тогда как крупные друзы нет (Johnson et al. 2000). В составе друз и между клетками пигментного эпителия и мембраной Бруха были обнаружены многочисленные молекулы, участвующие в клеточном и гуморальном иммунном ответе, в том числе компоненты системы комплемента (Hageman et al. 2001). Задолго до открытия ассоциаций между полиморфизмами в генах комплемента и ВМД, Hageman с соавт. постулировали, что воспаление и/или иммунные процессы являются ключевыми в образовании друз и последующей прогрессии ВМД (Hageman et al. 2001, Anderson et al. 2002). Предложенная Hageman и соавт. иммунологическая теория развития ВМД предполагает, что первичные патологические изменения клеток РПЭ вследствие комбинированного действия генетических мутаций, светового повреждения, окислительного стресса и накопления липофусцина, индуцируют рекрутирование иммуннокомпетентных клеток из сосудистого русла и активацию резидентных макрофагов (Anderson et al. 2002). Нарушения в работе последних приводят к образованию друз.

Открытие инфламмасомы, особого белкового комплекса в макрофагах и нейтрофилах, который приводит к запуску воспалительной реакции при контакте клетки с микроорганизмами, добавило новый аспект в оценку роли воспаления при ВМД.

Система инфламмасы отслеживает клеточный стресс через специальные рецепторы (TLRs, NLRs, the C lepton Rs и RIG-I-like Rs), которые сигнализируют о «неполадках» в клетке, например о вирусной инфекции или механическом повреждении (Dunne A. 2011, Takeuchi et al. 2010). Недавно Tarallo с соавт. (2012) показали, что в дегенерации РПЭ может участвовать некодирующие РНК – AluRNA, ответственные за активацию NRLP3 инфламмасы. В другой работе добавление друз, изолированных из сетчатки больных ВМД, к культуре моноцитов активировало в них образование NRLP3 инфламмасы и экспрессию IL18 (Doyle et al. 2012). В этой же работе на мышах было показано, что образование инфламмасы NRLP3 и активация IL18 препятствуют развитию ХНВ (Doyle et al. 2012). Таким образом, накопление материала в друзах, включая липиды, липофусцин, А2Е и амилоид, может активировать NRLP3 инфламмасому, приводя к хроническому воспалению в области РПЭ и прогрессии сухой формы ВМД, но не ХНВ.

Система комплемента играет важную роль в защите организма от инфекций, клеточном гомеостазе, remodelировании и восстановлении поврежденной ткани (Anderson et al. 2010). В сетчатке белки комплемента были обнаружены в составе друз, РПЭ, мембране Бруха, нейроретине и капиллярах хориоидеи. Система комплемента состоит из более 20 взаимодействующих компонентов: C1, C2, C3, ..., C9, CFB, CFD и ряд регуляторных белков. Все они — растворимые белки, циркулирующие в крови и тканевой жидкости. Большинство из них неактивны до тех пор, пока не будут приведены в действие в результате иммунного ответа. Существует три пути активации комплемента: классический, альтернативный и лектиновый. Классический путь активируется только при наличии на поверхности клеток комплексов антиген-антитело и задействован в специфическом иммунном ответе (приобретенный иммунитет). Альтернативный и лектиновый пути могут быть активизированы без присутствия антител при непосредственном контакте с микроорганизмом и участвуют в неспецифическом иммунном ответе (врожденный иммунитет). Все три пути активации приводят к одинаковому результату: C3-конвертаза расщепляет C3 на два фрагмента C3a и C3b. C3b связывается с мембраной клетки рядом с C3-конвертазой, образуя ферментный комплекс с измененной специфичностью — C5-конвертаза. Затем C5-конвертаза расщепляет C5 на C5a и C5b. C5b путем последовательного объединения факторов комплемента C5, C6, C7, C8 и C9 образует мембрано-атакующий комплекс C5b-9, который образует на поверхности клетки-мишени поры, приводящие ее к лизису

(Ricklin et al. 2010). Помимо цитотоксической функции, связанной с формированием мембраноатакующего комплекса, система комплемента участвует в опсонизации клеток - привлечении фагоцитов к клеткам, содержащим на поверхности компоненты C3b и C5a (Donoso et al. 2006). Очевидно, что такая сложная система требует не менее изощренной системы контроля и регулирования. В защите клеток от бесконтрольной активации комплемента участвует множество белков, включая фактор комплемента H (CFH), витронектин, CD59 и др.

Белок CFH (complement factor H) – основной регулятор системы комплемента. Он препятствует образованию C5b-9, либо ускоряя расщепление C3-конвертазы, либо действуя в качестве кофактора комплемента CFI, который разрушает C3b. Со времени открытия строгой ассоциации между вариантом гена CFH и ВМД значительно возрос интерес к исследованию роли системы комплемента в сетчатке (Haines et al. 2005, Edwards et al. 2005, Klein et al. 2005, Hageman et al. 2005). Показано, что факторы комплемента могут продуцироваться клетками нейроретины, РПЭ и хориоидеи и накапливаться с возрастом (Anderson et al. 2010, Chen et al. 2008). Установлено, что активация комплемента связана с возрастным накоплением в сетчатке липофусцина и аполипопротеинов (Johnson et al. 2011, Zhou et al. 2009). Кроме того, методами иммуногистохимии показано, что мембрано-атакующий комплекс C5b-9 локализуется в участках патологически измененных клеток РПЭ, а его количество коррелирует со степенью их повреждения (Anderson et al. 2002). Показано, что компоненты друз C3a и C5a обладают проангиогенными свойствами и могут провоцировать развитие индуцируемой лазером ХНВ (Kurihara et al. 2010, Nozaki et al. 2006). У мышей с возрастом увеличивается содержание 9 белков из сигнального каскада комплемента, а локализация компонента C3 в сетчатке различается у молодых и старых животных (Chen et al. 2008). Интересно, что уровень ингибитора комплемента CFH повышается при нормальном старении (Mandal et al. 2006). Однако иммунореактивность к CFH ниже в сетчатке больных ВМД, чем у здоровых контролей (Bhutto et al. 2011), в то время как уровень другого ингибитора комплемента C1INH повышен в сыворотке и сетчатке больных ВМД (Gibson et al. 2012). В настоящее время общепризнано, что система комплемента играет важную роль в патогенезе ВМД, однако, исходя из имеющихся данных, не ясно, гиперактивация или, напротив, недостаточная активация комплемента

вносит вклад в развитие ВМД и какие из компонентов системы являются ключевыми. Упрощенная схема путей активации системы комплемента представлена на **рисунке 3**.

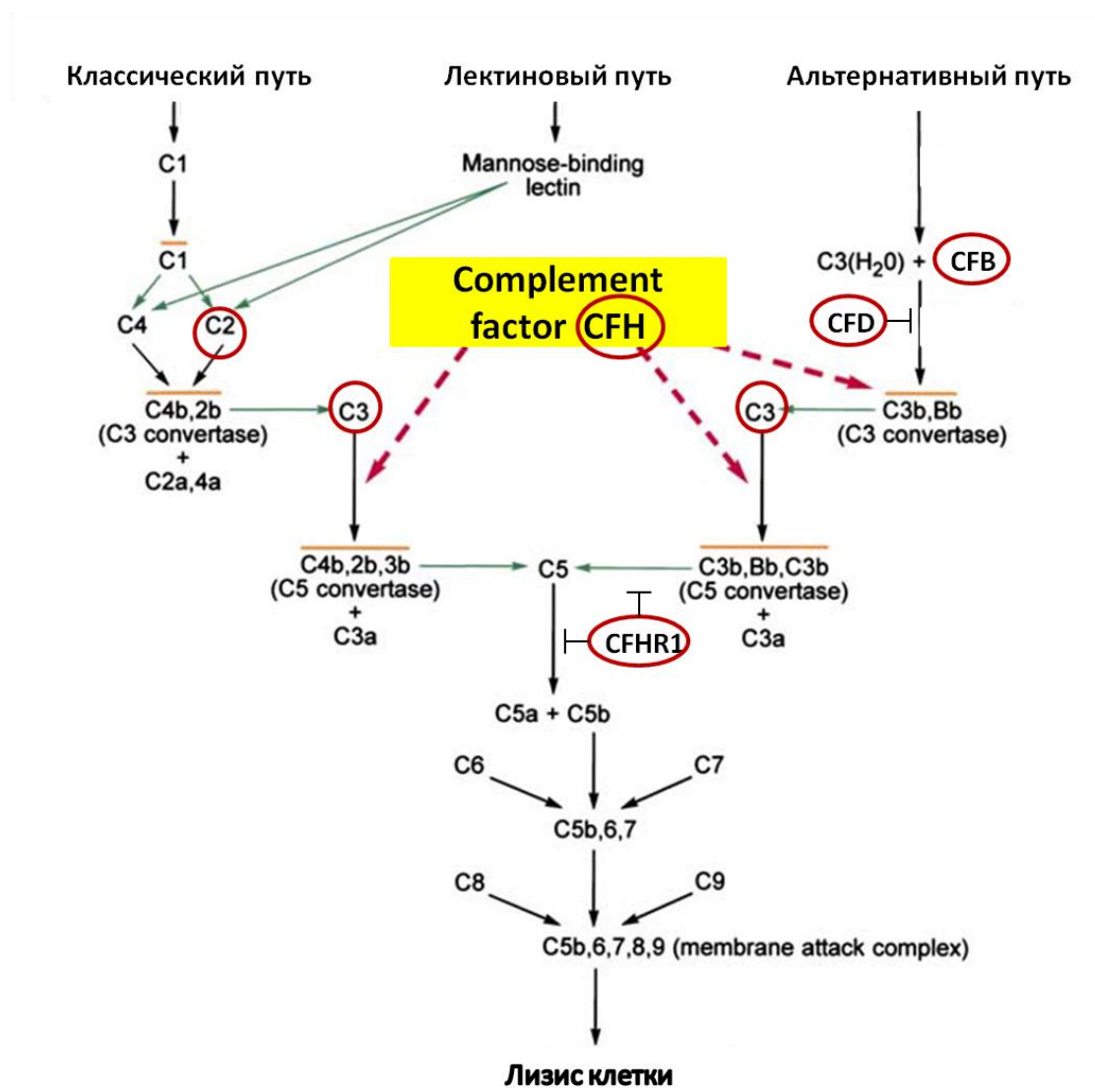


Рисунок 3. Упрощенная схема путей активации системы комплемента. Компоненты комплемента, ассоциированные с ВМД, обведены красной линией (по Donoso et al. 2006 с дополнениями).

Противоречивость данных об иммунологическом статусе сетчатки больных ВМД можно объяснить с позиций гипотезы о вкладе паравоспаления в патогенез заболевания (Xu et al. 2009). Паравоспаление, или низкоинтенсивное воспаление, определяется как промежуточное состояние между базовым уровнем и острой воспалительной реакцией. Концепция паравоспаления была разработана Меджитовым (2008) для объяснения иммунологических реакций, наблюдаемых при диабете 2 типа, атеросклерозе и нейродегенеративных заболеваниях (Medzhitov R. 2008). Паравоспаление - это адаптивный ответ ткани на постоянный стресс, направленный на поддержание гомеостаза (Xu et al. 2009, Parmeggiani et al. 2012). В стареющей сетчатке, не

предрасположенной генетически к развитию ВМД, различные стрессовые воздействия (свет, накопление продуктов жизнедеятельности) провоцируют развитие окислительного стресса и патологические процессы в клетках, что, соответственно, активирует паравоспалительные реакции, такие как активация микроглии, привлечение M2 макрофагов и контролируемая активация комплемента. Можно предположить, что как гипервоспаление, так и неполноценная реакция скажутся губительно на структурной и функциональной целостности клеток, что, возможно, и происходит в сетчатке, предрасположенной к ВМД. Нарушение адаптивного ответа (в данном случае - паравоспаления) может затрагивать любые звенья в разветвленной и многоступенчатой цепи событий, необходимых для поддержания гомеостаза сетчатки, что может привести либо к гипофункции, либо к гиперфункции иммунной системы, обуславливая разнообразие фенотипов заболевания и огромное число ассоциированных с ВМД генов.

Результатом патологических изменений в РПЭ и хориоиде становится гибель клеток нейронов сетчатки. Гибель фоторецепторов является причиной необратимой потери зрения при сухой форме ВМД и может происходить путем апоптоза или некроза. Интересно, что механизмы гибели нейронов сетчатки при ВМД, за исключением единичных работ, практически не исследованы. Существует несколько путей апоптоза, однако все их объединяет стадия активации каспаз. Клетки в процессе апоптоза становятся округлыми, сморщиваются, ядерная ДНК конденсируется и фрагментируется, содержимое клеток никогда не выходит наружу, фагоциты или соседние клетки поглощают апоптотические тельца без развития воспалительной реакции. Некроз, напротив, характеризуется набуханием и разрывом клетки с выходом содержимого наружу. Стало известно, что некроз регулируется ферментами семейства RIP киназ, т.е. так же, как и апоптоз, может быть запрограммированным процессом (Murakami et al. 2012). Показано, что контролируемый некроз (некроптоз) является распространенным способом гибели фоторецепторов в сетчатке в случае ингибирования каспаз (Trichonas et al. 2010). В 2010 г. Libby и Gould предположили, что гибель клеток в сетчатке при ВМД инициируется эндоплазматическим стрессом в результате нарушения укладки белков (Libby, Gould 2010), однако экспериментальных подтверждений этому пока нет.

ВМД остается одним из наиболее сложных для лечения заболеваний сетчатки. Неполное понимание молекулярных событий, лежащих в основе патогенеза

заболевания, тормозит разработку эффективных препаратов для ее профилактики и лечения. Поддается терапии ХНВ при ВМД. Анти-VEGF препараты, такие, как люцентис, ранибизумаб и бевацизумаб, подавляют неоваскуляризацию и стабилизируют патологический процесс. При этом требуются ежемесячные инъекции до конца жизни (van Wijngaarden et al. 2005, Nowak, Jurowski et al. 2006). На сегодня нет эффективных способов лечения сухой формы ВМД. Не найдены до сих пор терапевтические агенты, способные предупреждать развитие необратимых стадий заболевания, хотя показано, что образ жизни и диета могут влиять на течение ВМД. Учитывая выявленные факторы риска, профилактика развития ВМД заключается в правильном питании и отказе от курения. В клинических испытаниях AREDS (Age-related eye disease study research group) выявлен профилактический эффект добавления в рацион витаминов С и Е, растительных пигментов (лютеина и зеаксантина) и минералов (селен и цинк) (AREDS 2001, AREDS 2002). Поскольку поздние стадии ВМД неизлечимы, определение круга лиц, подверженных высокому риску заболеваемости, имеет огромное значение для здравоохранения.

1.1.3. Генетические факторы ВМД

Несмотря на относительно хорошую изученность фенотипических проявлений ВМД и клинико-морфологических изменений сетчатки при старении, исследователи далеки от полного понимания основных механизмов процесса старения в сетчатке на молекулярном уровне. ВМД относится к комплексным полигенным заболеваниям, которые, как было сказано выше, очень сложно изучать с точки зрения генетики. В отличие от моногенных болезней, вклад каждого отдельного гена в развитие ВМД может быть относительно небольшим. Поздний возраст манифестации, разнообразие фенотипических проявлений, влияние факторов среды усложняют выявление локусов детерминации ВМД. Ранние исследования по анализу сцепления идентифицировали множественные генетические локусы на хромосомах 1q25-32, 9p13, 9p24, 10q26, 15q21 и 17q25 (Haddad et al. 2006, Swaroop et al. 2009), которые, кроме того, отличались между исследованными популяциями, т.е. их знание не приближало к пониманию механизмов патогенеза ВМД.

С развитием полногеномного анализа ассоциаций (ПГАА) ситуация изменилась. На сегодняшний день картировано 33 локуса, ассоциированных с ВМД и по разным оценкам от 33 до 50 генов, полиморфизмы в которых определяют чувствительность к

развитию ВМД (Ratnapriya, Chew 2013). Функционально их можно разделить на перекрывающиеся группы генов, связанные с 1) иммунной системой: *C2*, *C3*, *CFB*, *CFH*, *CFD*, *CFHR1*, *CX3CR1*, *HLA-C*, *IL8*, *PLEKHA1*, *ROPA*, *SERPING1*, *TLR3*, *TLR4* и др.; 2) внеклеточным матриксом и клеточной адгезией: *ACE*, *ARMS2*, *COL8A1*, *COL110A1*, *CST3*, *CXCRI*, *F13B*, *FBLN5*, *HMCN1*, *HTRA1*, *MMP9*, *ROBO1*, *TIMP3* и др.; 3) метаболизмом липидов: *LIPC*, *APOE*, *ABCA1*, *ABCA4*, *CETP*, *ELOVL4*, *LRP6*, *LPL*, *VLDLR* и др.; 4) ангиогенезом: *ACE*, *COL10A1*, *COL8A1*, *CST3*, *FBLN5*, *GDF6*, *HTRA1*, *LRP6*, *VEGFA*, *SERPINF1*; 5) клеточным стрессом: *ABCA4*, *APOE*, *ARMS2*, *CST3*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *SOD2*, *TF*, *TLR3*, *TLR4* (Miller J.W. 2013). Среди выявленных локусов два - 1q32 и 10q26 - являются основными и объясняют около 50% всех случаев ВМД (Ratnapriya, Chew 2013).

Первым выявленным геном, ассоциированным с ВМД, стал фактор комплемента Н - CFH в локусе 1q32 (Edwards et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005). Как было сказано выше, CFH является ключевым регулятором активации системы комплемента. Самый известный рисковый вариант гена CFH – Y402H, ассоциация с ним ВМД была воспроизведена в 40 (!) исследованиях на независимых выборках лиц европеоидной расы. Риск ВМД увеличивается в 4,6 раз при наличии одного рискового аллеля гена CFH Y402H и в 7,4 раз у гомозигот (Klein et al. 2005). Показано, что замена Y402H влияет на сродство CFH к С-реактивному белку (Ormsby et al. 2008). Интересно, что ассоциация с Y402H не была подтверждена в популяциях азиатского происхождения, что свидетельствует о роли этнической принадлежности в генетическом контроле ВМД (Fuse et al. 2006, Mori et al. 2007). В дальнейшем было выявлено более 20 других полиморфизмов в кодирующей и некодирующей частях гена *CFH* (Li et al. 2006, Maller et al. 2006). Более того, делеции в двух соседних с *CFH* генах *CFHR1* и *CFHR3* оказались ассоциированы со сниженным риском ВМД (Hughes et al. 2006).

Помимо локусов генов системы комплемента, другим основным локусом, определяющим восприимчивость к ВМД, является локус 10q26 (Dewan et al. 2006, Jakobsdottir et al. 2005, Rivera et al. 2005). В локусе 10q26 находится 2 гена-кандидата: *HTRA1* и *ARMS2*. В одних исследованиях было показано, что полиморфизм в гене сериновой протеазы *HTRA1* ассоциирован с риском ВМД (Dewan et al. 2006, Yang et al. 2006, Jiang et al. 2009), в других утверждается, что варианты гена *ARMS2*, а не *HTRA1*, определяют сцепление локуса 10q26 с болезнью (Kanda et al. 2007, Fritsche et al. 2008).

Возможно, что полиморфные варианты SNP в гене *ARMS2* влияют на активность промотора *HTRA1*, который находится в килобазе от *ARMS2*, таким образом, что оба гена ассоциированы с ВМД. В 2,7 раза повышен риск развития ВМД у лиц, гетерозиготных по алеллю гена *ARMS2* A69S и в 8,2 раза - у гомозигот (Rivera et al. 2005). Аддитивный эффект вариантов белков CFH Y402H и *ARMS2* A69S приводит к 50-кратному увеличению риска ВМД (Schaumburg et al. 2007). Последовательность гена *ARMS2* является специфичной для приматов, кодирующей белок с неизвестной функцией (Kanda et al. 2007). Недавно было показано, что белок *ARMS2* может участвовать в ремоделировании внеклеточного матрикса, поскольку он связывает многие внеклеточные белки, такие как фибулин-6 и фибронектин-1 (Kortvely et al. 2010). Показано, что количество связанного с наружной мембраной митохондрий белка *ARMS2* зависит от уровня окислительного стресса (Boulton et al. 2012).

Список ассоциированных с ВМД генов продолжает расти. Совместный мета-анализ ПГАА 18 центров из разных стран, объединивших свыше 17 000 случаев ВМД и 60 000 одновозрастных контролей европеоидного и азиатского происхождения выявил 19 локусов ВМД, из них 7 локусов были выявлены впервые: *COL8A1/FILIP1L*, *IER3/DDR1*, *SLC16A8*, *TGFBRI*, *RAD51B*, *ADAMTS9* и *B3GALT1* (Fritsche et al. 2013).

Функциональная роль выявленных полиморфизмов для большинства генов в развитии ВМД остается неисследованной. Предстоит выяснить также взаимосвязь между генами, ассоциированными с ВМД, а также между этими генами и средовыми факторами риска.

1.2. Исследования транскриптома сетчатки

Развитие высокопроизводительных методов молекулярной биологии, таких как технология ДНК-микрочипов, значительно ускорило процесс открытия генов, участвующих в контроле развития и патогенеза сложных комплексных заболеваний, в том числе ВМД. Современные методы изучения патогенеза комплексных заболеваний, как правило, включают исследования транскриптома ткани. Особый интерес представляет анализ возрастных изменений в экспрессии генов в сетчатке, поскольку известно, что с возрастом сетчатка претерпевает ряд структурно-морфологических изменений на качественном и количественном уровнях.

Первым исследованием изменений транскриптома здоровой сетчатки человека с возрастом при помощи микрочипов была работа Yoshida и соавт. (2002). С помощью

кДНК микрочипов, содержащих 2400 проб, авторы показали, что гены, вовлеченные в клеточный рост и процессинг белка, преимущественно экспрессируются в молодом возрасте, тогда как в старой сетчатке увеличена экспрессия генов ответа на стресс.

Chowers и соавт. (2003) показали, что пол и возраст вносят существенный вклад в вариацию экспрессии генов в сетчатке человека. Тканеспецифичные гены, например, экспрессирующиеся только в фоторецепторах, имели тенденцию к более высокой вариабельности, чем все остальные гены. Авторы предположили, что фенотипическое разнообразие среди нормальных взрослых сетчаток объясняется главным образом за счет тканеспецифичных генов, и пришли к заключению, что вариабельность их экспрессии может быть причиной различий в предрасположенности к заболеваниям.

Позже во многих работах было показано, что экспрессия множества генов в сетчатке человека и грызунов значительно изменяется с возрастом и неодинаково - в различных отделах сетчатки. Иерархический кластерный анализ, выполненный Cai и соавт. (2012), показал, что профили экспрессии генов в сетчатке людей разного возраста (молодых и пожилых), а также в центральной (макуле) и периферической областях сетчатки значительно различаются между собой. С возрастом экспрессия 85 генов в макуле пожилых людей по сравнению с молодыми снижалась. Среди них были гены с разнообразными функциями клеточного метаболизма, регуляции и развития. Экспрессия 55 генов увеличивалась с возрастом. Среди них были в основном гены, ответственные за дифференциацию клеток, их выживание и пролиферацию.

Ben-Shlomo с соавт. (2008) исследовали профиль экспрессии генов в сетчатке крыс породы Albino Lewis в возрасте 5, 11 и 20 недель жизни. У этих животных не выявляются какие-либо патологии развития глаз, но методом ДНК-микрочипов авторы выявили 603 гена, экспрессия которых с возрастом изменяется. Эти гены были сгруппированы в кластеры в зависимости от паттерна экспрессии. Биоинформатический анализ этих кластеров выявил набор генов, кодирующих белки с функциями, относящимися к синаптическому везикулярному транспорту, аксоногенезу и ионным каналам. Большинство из них (471) принадлежали кластеру, который содержит гены с максимальной экспрессией в 20 недель жизни. Среди них были обнаружены гены, ассоциированные с синаптическим транспортом, ростом аксонов, ионным транспортом, например, ген нейропептида *Npff* и его рецептора *Gpr74*. Следующий по количеству генов кластер содержал 79 генов с высоким уровнем экспрессии в 5 недель по

сравнению с 11 неделями. Интересным оказалось, что кластер обогащен генами рибосом и процессами синтеза белка, в том числе генами «домашнего хозяйства», а также содержит гены, кодирующие белки кристаллины. Кристаллины традиционно считались генами структурных белков хрусталика, так как они в большом количестве обнаруживаются в его волокнах. Однако было показано, что кристаллины экспрессируются и в других тканях, в том числе в сетчатке, обладают шаперонной активностью, участвуют в процессах апоптоза и аксоногенеза (Xi et al. 2003).

Chen с соавт. (2008) сравнили транскрипционные профили в РПЭ/хориоиде молодых и старых мышей. С возрастом изменялась экспрессия 315 генов, из них 282 гена повышали экспрессию. Белковые продукты большинства этих генов были связаны с иммунным ответом и воспалением: привлечение лейкоцитов, активация комплемента, сигнальные пути IL-10 и NK (natural killer). Например, было показано увеличение экспрессии с возрастом на уровне мРНК и белка гена *Ccl2*, известного хемоаттрактанта лейкоцитов.

Jelcick и соавт. (2011) исследовали с помощью микрочипов межлинейные различия в сетчатке мышей линий C57BL6/J, AKR/J, CAST/EiJ, и NOD.NON-H2(-nb1) на этапах эмбрионального (E18.5) и постнатального развития (P30). Линии различаются по степени пенетрантности к развитию патологий в сетчатке. Было найдено более 3000 генов, дифференциально экспрессирующихся у мышей разных линий и на разных стадиях развития. Прежде всего это были гены, формирующие генные сети развития нейроретины и зрительных сигнальных путей. Значительные межлинейные различия в профилях генной экспрессии во время развития и дифференцировки ткани свидетельствуют о существенном влиянии генетического фона на ранние доклинические стадии заболевания, что, в конце концов, приводит к его клиническим проявлениям в более раннем или позднем возрасте.

Наиболее полной и масштабной работой по исследованию изменений транскриптома при ВМД является работа Newman и соавт. (2012). Авторы сравнили профили экспрессии в 31-ом постмортальном образце сетчатки людей без диагноза ВМД, в 26-и - с диагнозом ВМД и в 11-и - с начальной стадией заболевания. Транскрипционное профилирование было выполнено отдельно для нейроретины и для РПЭ/хориоидеи с помощью олигонуклеотидных микрочипов. Стоит отметить, что в этой работе при сравнении образцов сетчатки людей с ВМД была обнаружена

существенная гетерогенность по количеству транскриптов. При консервативном анализе дифференциальной экспрессии с поправкой на множественные сравнения $FDR \leq 10\%$ было выделено только 11 генов, экспрессия которых изменялась в каждом из образцов. Многочисленные факторы, такие как, генетические вариации, степень прогрессии ВМД, неоднородность по типам клеток в образце, внешние факторы среды, могут влиять на уровни транскриптов в сетчатке человека. Поэтому авторы снизили порог дифференциальной экспрессии, исключив из анализа поправку на множественные сравнения, и сфокусировали усилия на определении групп генов, которые проявляют координированную экспрессию и значимое функциональное обогащение по биологическим процессам. Результаты работы Newman и соавт. (2012) свидетельствуют в пользу провоспалительного окружения в сетчатке с ВМД. Как в РПЭ/хориоиде, так и в нейроретине большинство белковых продуктов генов с измененной экспрессией оказались участниками иммунных процессов: иммуноглобулины, цитокины, антигены, ассоциированные с Т - клеточной активацией, белки системы комплемента. Экспрессия генов, связанных с воспалительным ответом, была повышена во всех образцах сетчатки больных ВМД. Например, в их числе оказались гены хемокинов: *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CCL2* и *CCL8*, которые направляют макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты, натуральные клетки-киллеры к поврежденной ткани.

Исследования транскриптома сетчатки методом RNA-seq начали проводить с 2011 года (Brooks et al. 2011, Gamsiz et al. 2012, Kandpal et al. 2012, Mustafi et al. 2012).

Brooks с соавт. (2011) проанализировали профили экспрессии генов в сетчатке 21-дневных мышей дикого типа и мышей-нокауты по гену *Nrl* (neural retina leucine zipper) с помощью секвенирования Illumina GAIIх.

Mustafi с соавт. (2012) использовали метод RNA-seq для выявления различий между 3 инбредными линиями мышей в возрасте 1 месяца, отличающихся по степени возрастных дегенеративных изменений сетчатки. Они показали, что у молодых мышей A/J, которые подвержены возрастной дегенерации фоторецепторов (Danciger et al. 2007), повышена экспрессия 133 генов-медиаторов воспаления по сравнению с контрольными мышами линий BALB/c и C57BL/6J, в том числе эффекторы сигнального пути интерферона, такие, как *Stat1*, *Irf7*, *Gbp1*, *Oas1a*, *Ifit* и др. Интересно, что в этой работе было показано, что среди генов с наиболее высокой экспрессией в сетчатке наряду с генами фоторецепторов *Gnat1*, *Rho* и *Sag*, присутствуют гены кристаллинов.

Таким образом, при помощи анализа транскриптома сетчатки можно выявлять группы дифференциально экспрессирующихся генов, соответствующие определенным возрастам у животных и человека в норме и клиническим стадиям заболеваний при патологии. Молекулярные события, происходящие на ранних стадиях заболевания, могут лежать в основе первичных механизмов заболевания, а изменения, характерные для поздних стадий, скорее всего отражают вторичные или сопутствующие процессы. В этой связи очевидна важность изучения ранних стадий комплексных заболеваний. Именно среди этих групп привлекательно искать гены-мишени для терапевтических воздействий. Однако исследования ранних стадий ВМД на людях существенно ограничены, поскольку они протекают бессимптомно. В связи со сложностью изучения ВМД у людей, особенно его ранних этапов, исследования этиологии и патогенеза ВМД требуют адекватных моделей животных.

1.3. Модели ВМД

На сегодняшний день в мире создано более 20 линий мышей и крыс для исследования патогенеза ВМД, большая часть из которых - геномодифицированные модели (трансгены и нокауты), полученные на основании знания роли модифицируемых гена (или генов) в патогенезе ВМД (Rakoczy et al. 2006). Моделирование ВМД на животных подразумевает ряд ограничений. Во-первых, макула анатомически присутствует только у приматов. Во-вторых, определенные биологические процессы могут значительно варьировать у различных видов и линий и существенным образом отличаться от процессов, характерных для человека (Jelcick et al. 2011). Считается, что у людей друзы образуются в результате накопления фаголизосом в базальной части клеток РПЭ, содержимое которых затем секретируется в мембрану Бруха через базальный путь секреции. Однако у грызунов накопление лизосом наблюдается чаще в апикальной части цитоплазмы РПЭ, что приводит к постепенному растяжению апикальных микроворсинок, и их содержимое экстрагируется в субретинальное пространство. Поэтому у стареющих грызунов, в отличие от человека, классические друзы редко встречаются в мембране Бруха (Ramkumar et al. 2010), а все существующие на сегодняшний день модели животных воспроизводят лишь часть признаков ВМД у людей (Penessi et al. 2013).

1.3.1. Геномодифицированные модели ВМД

В связи с обнаружением ассоциаций между SNP генов системы комплемента и ВМД для изучения роли этих генов в патогенезе ВМД были созданы нокаутные и трансгенные линии мышей: *Cfh*^{-/-}, *Cfh* Y402H, *C3arl*^{-/-} и *C5arl*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}/*Cx3cr1*^{-/-} и др.

Как было сказано выше, CFH является ключевым регулятором альтернативного пути системы комплемента, ингибирующим связывание C3b с фактором В и образование C3 конвертазы (Pickering, Cook 2008). Выключение CFH приводит к бесконтрольной активации системы комплемента, усилению воспалительных реакций в организме. В сетчатке мышей *Cfh*^{-/-} наблюдается накопление C3, дезорганизация наружных сегментов фоторецепторов и значительное повреждение нейронов. Однако у них выявлены нехарактерное для ВМД истончение мембраны Бруха и снижение количества субретинальных отложений по сравнению с мышами дикого типа (Coffey et al. 2007). Авторы линии полагают, что результатом бесконтрольной активации C3 могла стать повышенная фагоцитирующая активность макрофагов.

В сетчатке трансгенных мышей, экспрессирующих Y402H вариант CFH под контролем ApoE промотора (Ufret-Vincenty et al. 2010), к годовалому возрасту обнаруживаются друзоподобные отложения, повышенное количество клеток активированной микроглии и макрофагов в субретинальном пространстве, утолщение мембраны Бруха и отложения в ней C3d. Однако, в отличие от нокаутов по CFH, у них не наблюдается дегенерации фоторецепторов.

C3a и C5a являются активированными фрагментами факторов комплемента C3 и C5, входящих в состав друз и мембраноатакующего комплекса. У нокаутов по генам рецепторов к C3 и C5, *C3arl*^{-/-} и *C5arl*^{-/-} в сетчатке снижен уровень экспрессии *Vegf* и нарушена функция привлечения (опсонизации) лейкоцитов (Nozaki et al. 2006).

Хемотаксические цитокины, или хемокины, представляют собой разнообразную группу низкомолекулярных белков, которые ответственны за миграцию лейкоцитов. Хемокины могут быть провоспалительными и гомеостатическими и разделяются на 4 семейства (CXC, CX3C, CC, C). Рецепторы к хемокинам опосредуют сигнал привлечения, или мобилизации, воспалительных клеток к месту повреждения. При ВМД активация макрофагов и микроглии приводит к их миграции и накоплению в субретинальном пространстве, чего в здоровой сетчатке не происходит (van der Schaft et

al. 1993, Combadiere et al. 2007, Xu et al. 2009). Было предположено, что дисрегуляция сигнальных путей, участвующих в привлечении и активации макрофагов, играет роль в развитии ВМД (Ambati et al. 2003). Действительно, у нокаутных мышей по хемокинам и рецепторам к ним (*Ccl2*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}/*Cx3cr1*^{-/-}) обнаруживаются патологические изменения глазного дна, схожие с клиническими признаками ВМД.

Ccl2, известный также как MCP-1, регулирует связывание моноцитов с кровеносными сосудами, опосредуя их выход в ткань (Lu et al. 1998). В сетчатке старых нокаутных мышей по *Ccl2*^{-/-} и его рецептора *Ccr2*^{-/-} были обнаружены утолщение мембраны Бруха, усиление автофлуоресценции, накопление липофусциновых гранул и друзоподобных отложений, дисфункция фоторецепторов и признаки ХНВ (Ambati et al. 2003). Chen с соавт. (2011) выявили у этих животных патологические изменения клеток РПЭ и сниженную фагоцитирующую активность моноцитов. В работе Luhmann с соавт. (2009) было показано, что друзоподобные отложения являются скоплениями резидентных макрофагов и микроглии в субретинальном пространстве. Повидимому, дефицит *Ccl2*, и *Ccr2* ограничивает способность резидентных макрофагов к миграции из ткани в кровоток (Chen et al. 2011).

Полиморфизм T280M в гене *Cx3cr1* связан с повышенным риском ВМД (Chan et al. 2005, Combadiere et al. 2007, Yang et al. 2010). Экспрессия гена *Cx3cr1*, рецептора к хемокину *Cx3cl1*, обнаруживается в сетчатке только в клетках микроглии (Cardona et al. 2006, Combadiere et al. 2007). Исследования двух независимо полученных линий мышей, нокаутных по гену *Cx3cr1*, показали, что у них в сетчатке к возрасту 12 месяцев накапливаются друзоподобные отложения липидной природы, возможно, происходящие из субретинальной микроглии. К 18 месяцам толщина сетчатки *Cx3cr1*^{-/-} нокаутов уменьшается на 40%, а при облучении лазером частота и площадь развития ХНВ у этих животных выше, чем у мышей дикого типа (Combadiere et al. 2007).

В целом исследования на моделях животных с изменениями и/или отключениями отдельных генов иммунного ответа, подтвердили, что иммунная система играет важную роль в поддержании функции сетчатки.

1.3.2. «Естественные» модели ВМД

Существует несколько линий мышей и крыс, у которых развиваются признаки ВМД (Chang et al. 2002). К ретинопатиям, наследуемым моногенно, относятся ретинопатии у мышей линий *arrd2/arrd2* с мутацией в гене *Mdm* (Chang et al. 2008),

Mfrp^{rd6} (Kameya et al. 2002), Nr2e3^{rd7} (Webber et al. 2008), Gnat2^{cpfl3} (Allen et al. 2010) и др. Они наследуются по классическим законам Менделя. Все эти модели в той или иной мере воспроизводят некоторые признаки ВМД. Например, уже в 4 месяца у мышей arrd2/arrd2 выявляются дегенерация наружных сегментов фоторецепторов, повышенное содержание фагосом и гипертрофия митохондрий в клетках РПЭ. С возрастом поражения нарастают, и у 22 месячных мышей происходит истончение всех слоев сетчатки (Chang et al. 2008). Однако, как и в случае с геномодифицированными животными, модели спонтанных моногенно наследуемых ретинопатий отражают вклад по сути одного измененного гена.

ВМД является одним из проявлений старения, и ее развитие обычно сопряжено с комплексной манифестацией других зависимых от возраста заболеваний. Поэтому можно полагать, что линии с наследуемым комплексом заболеваний, ассоциированных со старением, могут быть более адекватной моделью ВМД, чем геномодифицированные модели. В мире существует всего две модели ВМД, воспроизводящие подобную ситуацию: преждевременно стареющие мыши SAM (senescence-accelerated mice) и крысы OXYS с наследуемым комплексом признаков преждевременного старения.

Преждевременно стареющие мыши SAM представляют собой коллекцию инбредных мышинных линий, созданных в Японии для исследования процессов старения и зависимых от возраста заболеваний (Takeda et al. 1997). Коллекция представлена 9 короткоживущими сублиниями SAMP (senescence-accelerated mice prone), различающимися по характеру возрастных изменений, и 3 контрольными долгоживущими сублиниями SAMR (senescence-accelerated mice resistant). Несмотря на инбредность сублиний для поддержания их уникального фенотипа требуется постоянный контроль и отбор по анализируемым признакам (Hosokawa et al. 1997, Carter et al. 2005). Очевидно, это связано с тем, что в контроле признаков их ускоренного старения участвует множество генов и/или аллелей, которые взаимодействуют между собой и средовыми и эпигенетическими факторами. Стоит отметить также, что, несмотря на то, что мыши SAM исследуются по всему миру, до сих пор не известны генетические факторы, ответственные за развитие у них комплекса преждевременного старения. У мышей сублинии SAMP8 с возрастом развивается дегенерация практически всех слоев сетчатки: хориоретинального комплекса, фоторецепторов и ганглионарных нейронов (Hosokawa et al. 1999, Majji et al. 2000). Важно отметить, что к возрасту 8

месяцев происходят патологические изменения в клетках РПЭ: накопление липофусциновых гранул и нарушения базальной складчатости. С возрастом увеличивается толщина базальной мембраны хориокапилляров, мембрана Бруха утолщается в 4 раза, в ней появляются скопления друзоподобных отложений. К возрасту 12 месяцев у 40% мышей SAMP8 обнаруживается ХНВ (Majji et al. 2000).

Преждевременно стареющие крысы OXYS являются первой отечественной моделью для комплексного исследования связанных со старением заболеваний. На них мы остановимся более подробно в подглавах 1.4. и 1.4.1.

1.4. Функциональные и морфологические особенности крыс линии OXYS

Линия крыс OXYS была создана в Институте цитологии и генетики СО РАН более 40 лет назад селекцией и инбридингом крыс Вистар по признаку ранней катаракты, развитие которой в первых пяти поколениях вызывали диетой, обогащенной галактозой (Соловьёва и др. 1975). В дальнейшем проводили отбор по этому признаку уже без нагрузки галактозой, которая, по-видимому, сыграла мутагенную роль. У крыс наряду с катарактой спонтанно развивались множественные патологии органов: катаракта, кардиомиопатия, сколиоз, эмфиземы, злокачественные опухоли (Salganik et al. 1994). Первоначально авторы заявили о создании сублинии W/SSM (Вистар Салганик-Соловьёва-Мороскова) - модели наследственной галактоземии. После выявления повышенной способности гомогенатов печени и миокарда генерировать активные формы кислорода (АФК) в ответ на добавление перекиси водорода крыс зарегистрировали в международной базе RGD (Rat genome database) как линию OXYS с ключевой характеристикой «врожденная гиперпродукция кислородных радикалов» (Salganik et al. 1994). В дальнейшем было показано, что не все заявленные свойства проявляются у крыс OXYS, в том числе и биохимические признаки галактоземии. Для установления инбредного статуса и стабилизации фенотипических признаков крыс OXYS было проведено усиление отбора по признаку ранней спонтанной катаракты и инбридинга в 58-63 поколениях, что привело к устойчивой стопроцентной заболеваемости катарактой уже в молодом возрасте (Колосова и др. 2003).

Помимо катаракты усиление отбора крыс OXYS привело к развитию комплекса признаков, который может рассматриваться как синдром преждевременного старения, устойчиво проявляющийся в последующих поколениях (на сегодня это уже 103 поколение). Для крыс OXYS характерны следующие проявления преждевременного

старения: дистрофия сетчатки, аналогичная ВМД у людей (Жданкина и др. 2008, Marcovets et al. 2011), ранняя инволюция тимуса (Маркова и др. 2003, Obukhova et al. 2009), кардиомиопатия (Непомнящих и др. 1994), остеопороз (Фаламеева и др. 2006, Muraleva et al. 2012), артериальная гипертензия (Bobko et al. 2005), ускоренное старение мозга (Sergeeva et al. 2006, Stefanova et al. 2010). Максимальная продолжительность жизни крыс OXYS снижена на 28% по сравнению с крысами Вистар: $24,6 \pm 6$ и $36,8 \pm 5$ месяцев, соответственно, $p < 0,01$ (Колосова и др. 2001). Проявлениями ускоренного старения мозга крыс OXYS становятся формирование пассивного типа поведения, повышенной тревожности (Лоскутова и др. 2000, Markova et al. 2005, Stefanova et al. 2010, 2013), нарушения способности к обучению и памяти на фоне нейродегенеративных изменений мозга – появления очагов демиелинизации, увеличение объема желудочков мозга, выявленных методами МРТ (Колосова и др. 2011, Stefanova et al. 2013).

Предполагается, что преждевременное старение крыс OXYS связано с генетически обусловленным дефектом метаболизма, выражающимся в повышенной чувствительности к окислительному стрессу (Salganik et al. 1994, Шабалина и др. 1995, Колосова и др. 2003). В основе подобных изменений могут лежать обнаруженные в разных тканях крыс OXYS нарушения структуры и функций митохондрий: изменения соотношения цитохромов внутренней мембраны митохондрий, снижение активности F_1F_0 -АТФ-синтетазы, дыхательного контроля и скорости фосфорилирования, снижение объёмной и поверхностной плотности митохондрий, появление митохондрий с лизисом матрикса и деструкцией крист (Шабалина и др. 1995, Колосова и др. 2001, Панин и др. 2004, Бакарев, Непомнящих 2004). Митохондрии являются основным источником АФК в клетках, однако Меньщикова с коллегами методом хемилюминесцентного анализа показали, что продукция H_2O_2 и $O_2^{\cdot -}$ митохондриями печени в различных метаболических состояниях у крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар, причём в возрасте 12 месяцев в большей степени, чем в 4 месяца (Меньщикова и др. 2000). Это не противоречит обнаруженной ранее повышенной продукции ОН-радикалов в суспензии митохондрий при добавлении H_2O_2 (Salganik et al. 1994), потому что процессы генерации $O_2^{\cdot -}$, или H_2O_2 и образования ОН-радикалов при разложении H_2O_2 не связаны между собой. Если наработка $O_2^{\cdot -}$ зависит от работы электрон-транспортной цепи митохондрий, то разложение H_2O_2 определяется наличием ионов металлов переменной валентности и

гемовых цитохромов. В этой же работе было показано, что источником АФК у крыс OXYS могут быть гранулоциты крови (Меньщикова и др. 2000).

Важно, что первые признаки преждевременного старения у крыс OXYS начинают проявляться в возрасте 2-3 месяцев, в период, когда у крыс завершается половое созревание и начинается инволюция тимуса. Поэтому преждевременное иммуностарение может рассматриваться как основная причина развития характерных для крыс OXYS признаков. Тимус – это центральный орган иммунной системы, ответственный за клеточный иммунитет. Инволюция тимуса является главным возрастным изменением иммунной системы: по состоянию и функциональной активности этого органа можно определить биологический возраст животных и человека (Aspinall et al. 2008). Как показали гравиметрические и морфометрические исследования, массовый индекс тимуса, общий объем тимуса, объем коркового, мозгового вещества и соединительнотканой стромы у крыс OXYS в возрасте 3 месяцев значительно ниже, чем у крыс Вистар. Микроскопическое исследование срезов тимуса крыс OXYS выявило уменьшение плотности расположения лимфоидных клеток в корковом и мозговом веществе, а также сниженное, по сравнению с крысами Вистар, количество бластов в субкапсулярной зоне коркового вещества (Маркова и др. 2003). В дальнейшем было показано, что гипоплазия тимуса крыс OXYS является врожденной и приводит к более низким пиковым показателям массы, размеров и клеточности, а также дисбалансу субпопуляций Т-лимфоцитов (Obukhova et al. 2009, Обухова и др. 2013). В результате таких изменений происходит снижение активности Т-клеточного звена иммунной системы, что, в частности, проявляется как подавление реакции гиперчувствительности замедленного типа, которая у крыс OXYS в 2,4 раза ниже, чем у крыс Вистар (Маркова и др. 2003). Дисрегуляция гемопоэза может являться причиной нарушения функций иммунной системы в старости. Интересно, что у крыс OXYS было обнаружено увеличение количества гранулоцитарно-макрофагальных предшественников в костном мозге по сравнению с крысами Вистар начиная с возраста 3 месяцев, ранних эритроидных предшественников - начиная с 12 месяцев (Орловская и др. 2007).

Становление мозга крыс OXYS происходит на фоне задержки формирования микроциркуляторного русла в ранний постнатальный период, на что указывает снижение в 1,5 раза по сравнению с крысами Вистар митотической активности

эндотелия сосудов пиальной оболочки больших полушарий мозга (Korbolina et al. 2007). Такая ситуация может приводить к гипоксии. Действительно, при исследовании состояния энергетического метаболизма методом ³¹P-ЯМР-спектроскопии в мозге крыс OXYS в постнатальный период были выявлены типичные для адаптации к гипоксии изменения: накопление фосфокреатина и его повышенный расход на синтез АТФ (Sergeeva et al. 2006). Дефицита высокоэнергетических фосфатов вплоть до возраста 3 месяцев выявлено не было. В то же время в мозге годовалых крыс OXYS методами МРТ были зарегистрированы характерные для хронической ишемии изменения церебрального кровотока (Агафонова и др. 2007, Agafonova et al. 2012). Признаки тканевой гипоксии и ишемии были также выявлены в сосудах сосудистой оболочки глаз животных, в миокарде, функциональные отклонения которого регистрируются уже в 3 месяца и к 12 месяцам нарастают на фоне склеротических изменений коронарных сосудов (Agafonova et al. 2012).

Проявлениями остеопороза у крыс OXYS становятся нарушение минерализации костной ткани (Колосова и др. 2002), снижение её минеральной плотности (Фаламеева и др. 2006). Замедление роста и минерализации костной ткани происходит на фоне недостаточного накопления в ней кальция и стронция, снижения уровня Са в сыворотке крови и его усиленной экскреции с мочой (Muraleva et al. 2010).

Раннее развитие катаракты – ключевой признак линии крыс OXYS, по которому проводилась направленная селекция. На сегодня в возрасте 3 месяцев патологические изменения хрусталиков регистрируются у 100% животных. По своему характеру катаракта у крыс OXYS соответствует сенильной катаракте человека и протекает на фоне дистрофических изменений сетчатки. Показано, что развитие катаракты у крыс OXYS, как и у людей, связано со снижением транскрипционной активности генов α -кристаллинов – основных структурных белков хрусталика со свойствами шаперонов, которые обеспечивают его прозрачность (Rumyantseva et al. 2008). Однако на ранних доклинических стадиях развития катаракты (возраст 20 дней) уровень мРНК генов α -кристаллинов в хрусталиках крыс OXYS был повышен, так же как и содержание основного антиоксиданта хрусталика – восстановленного глутатиона (GSH), уровень которого резко снижался по мере прогрессирования катаракты (Rumyantseva et al. 2008).

Согласно свободнорадикальной теории старения Хармана (Harman 1956), ключевую роль в старении играет накопление с возрастом окислительных повреждений

макромолекул в результате окислительного стресса – нарушения баланса в системах генерации и детоксикации АФК. Вклад окислительного стресса в патогенез зависимых от старения заболеваний подтвержден во многих исследованиях (Totan et al. 2009, Rhone, Basu 2008). Однако в последние годы стало очевидным, что усиленная генерация АФК не является ни первопричиной, ни фактором, инициирующим старение. Более того, кратковременные субтоксические повышения уровня АФК индуцируют формирование защитных механизмов, которые в дальнейшем ослабляют негативные эффекты последующего окислительного стресса, повышают адаптивные резервы организма (Starkov A.A. 2008, Ristow, Zarse 2010). Тонкая грань в переходе АФК от роли «хороших» молекул к роли «плохих» в последние годы находится в центре внимания исследователей, но изучена далеко не полностью. Важно, что вызываемые окислительным стрессом изменения транскриптома в характерном для старения направлении по времени опережают фенотипические проявления возрастных изменений в частности мозга, например, нарушения памяти и способности к обучению (Blalock et. al. 2003, Burger et. al. 2008).

При изучении связи преждевременного старения крыс OXYS с окислительным стрессом в разные годы были проведены сравнения активности свободнорадикальных процессов в тканях крыс OXYS и Вистар. Авторы использовали животных разного возраста и неодинаковые подходы. В качестве маркёров окислительного стресса использовали уровни окислительного повреждения липидов, белков и ДНК.

В ранних исследованиях было показан высокий уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени и миокарде (Salganik et al. 1994) и обнаружено повышенное образование сульфатированных и карбонильных групп белков в сыворотке крови 8-месячных крыс OXYS (Yelinova et al. 1996). Содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови крыс OXYS было выше, чем у крыс Вистар, и их уровень прямо зависел от выраженности патологических изменений в хрусталиках ($r=0,41$, $p=0,036$) и в сетчатке ($r=0,45$, $p=0,021$) животных (Фурсова и др. 2005). В то же время различий в содержании продуктов ПОЛ в хрусталиках крыс Вистар и OXYS выявлено не было (Фурсова и др. 2005, Rumyantseva et al. 2008). В сетчатке же определялась тенденция к повышению содержания продуктов ПОЛ - диеновых конъюгатов и оснований Шиффа (Фурсова А.Ж. 2009). Была обнаружена также повышенная люминолзависимая хемилюминесценция гомогенатов сетчатки 6-месячных крыс OXYS, которую авторы рассматривают как

показатель усиленной генерации АФК (Жданкина и др. 2013). Уровень окислительных повреждений ДНК (8-охоG) в печени и легких оказался повышенным по сравнению с крысами Вистар уже в возрасте 2 месяцев (Kemeleva et al. 2006). Вместе с тем содержание этено-ДНК-аддуктов (edA, edC), продуктов взаимодействия окисленных липидов с ДНК, в мозге и печени крыс OXYS становился достоверно повышенным лишь к 15 месяцам (Nair et al. 2005).

Показано, что в 2 и 18 месяцев у крыс OXYS повышено, по сравнению с крысами Вистар, содержание продуктов ПОЛ в среднем мозге, гиппокампе, прилежащих ядрах и стриатуме, т.е. в критических для обучения и памяти структурах мозга (Колосова, Щеглова и др. 2003). Однако содержание окисленных белков в мозге 3 месячных крыс OXYS не отличалось от такового у крыс Вистар и становилось повышенным к 14 месяцам, т.е. позднее, чем регистрируются первые нарушения когнитивных функций (Колосова, Щеглова и др. 2003). Эти данные, с одной стороны, подтверждают участие окислительного стресса в процессах преждевременного старения крыс OXYS, с другой - свидетельствуют в пользу того, что окислительный стресс является следствием, а не причиной развития комплекса признаков преждевременного старения.

Манифестация 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 пассивного типа поведения крыс OXYS были проведены гибридологические скрещивания с последующим QTL-анализом (Ойдопова и др. 2008, Korbolina et al. 2012). Анализ гибридов от скрещиваний крыс OXYS с крысами контрольной инбредной линии WAG показал, что ретинопатия и катаракта развивается лишь у части гибридов F1 (в основном у самок). В поколении гибридов F2 не было выявлено расщепления признаков по Менделевскому закону, что исключает их моногенное аутосомно-доминантное и рецессивное наследование (Korbolina et al. 2012). Результаты QTL-анализа показали, что локусы, ассоциированные с развитием катаракты, ретинопатии и пассивного типа поведения у крыс OXYS, соответствуют интервалам между микросателлитными маркерами D1Rat30 и D1Rat219 (100,6–188,0 Mb) и D1Rat219 и D1Rat81 (188,0–250,4 Mb) 1-й хромосомы. Следовательно, эти участки могут рассматриваться как главные

районы для поиска генов-кандидатов комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS. Для доказательства существования в найденных локусах гена (или генов), влияющего(их) на развитие фенотипических признаков крыс OXYS, два выявленных локуса, маркированных микросателлитами крыс OXYS, были перенесены возвратными скрещиваниями в геном крыс WAG (Korbolina et al. 2012).

1.4.1. Крысы OXYS как модель ВМД

Комплексные исследования, выполненные сотрудниками ИЦиГ СО РАН, СИБГМУ, МГУ и Института глазных болезней им. Гельмгольца (Жданкина и др. 2008, Нероев и др., 2008, Сапрунова 2008, Марковец А.М. 2011) показали, что по клиническим и морфологическим проявлениям ретинопатия крыс OXYS аналогична ВМД у людей. Линия крыс OXYS, таким образом, является адекватной моделью ВМД и может использоваться для исследования механизмов развития заболевания и оценки эффективности терапевтических воздействий.

Ретинопатия развивается у крыс OXYS к возрасту 3 месяцев на фоне катарактальных изменений хрусталика и затем прогрессирует, достигая выраженных стадий к возрасту 12-14 месяцев (Markovets et al. 2011). Клинические проявления ретинопатии у крыс OXYS отсутствуют в возрасте 20 дней, к возрасту 1,5 месяцев развиваются у 20-25% крыс OXYS, к 3 месяцам заболеваемость достигает 100%. Соответственно, выделяют два периода развития ретинопатии: от 1,5 до 3 месяцев - возраст манифестации первых признаков, 9-12 месяцев – период формирования ярко выраженных патологических изменений. Для первого периода характерно перераспределение пигмента, наличие ишемических очагов, единичных кровоизлияний, атрофия хориокапиллярного слоя и пигментного эпителия, что соответствует 1-й стадии развития ВМД. Второй период соответствует 2-й и 3-й стадии с выраженными экссудативными изменениями, большими мягкими и твердыми друзами с тенденцией к сливанию, отёком центральной зоны, достигающей 2-3 диаметров диска зрительного нерва, с экссудативной отслойкой РПЭ и/или нейроэпителия. В 10% случаев регистрируются признаки неоваскуляризации с экссудативно-геморрагической отслойкой РПЭ и/или нейроэпителия сетчатки и рубцеванием (Фурсова А.Ж. 2009). Признаки артериолосклероза - сужение калибра артерий - выявляются у 100% животных (Колосова и др. 2003, Фурсова А.Ж. 2009). Таким образом, патологические изменения

глазного дна крыс OXYS зависят от возраста животных: чем старше животное, тем более выражены изменения.

По данным гистологических исследований у крыс OXYS подвержены патологическим изменениям все структурные компоненты сетчатки: хориоидальные и интратретинальные сосуды, мембрана Бруха, РПЭ, фоторецепторы, ассоциативные и ганглионарные нейроны. Наиболее выраженные изменения наблюдаются со стороны сосудов хориоидеи и пигментного эпителия сетчатки, составляющих наряду с мембраной Бруха наружный гематоретинальный барьер. У крыс OXYS достоверно снижена удельная площадь открытых сосудов и, соответственно, увеличена удельная площадь тромбированных сосудов со стазом и сдвигем форменных элементов по сравнению с крысами Вистар (Жданкина и др. 2009, Стефанова и др. 2013). Эндотелиоциты хориоидеи крыс OXYS характеризуются снижением электронной плотности цитоплазмы, уменьшением содержания органелл, появлением деформированных ядер; при этом межэндотелиальные соединения местами теряют свою целостность, что приводит к диапедезу и миграции клеточных элементов в околосоудистое пространство (Жданкина и др. 2009). Выявленные у крыс OXYS морфологические изменения сосудистого русла хориоидеи свидетельствуют об ухудшении кровообращения в сетчатке и развитии гипоксии, которая может являться одной из причин повреждения клеток сетчатки.

Структура клеток РПЭ крыс OXYS существенно отличается от таковой у контрольных крыс Вистар. В цитоплазме большинства клеток РПЭ обнаруживаются изменение формы ядра, многочисленные вакуоли, деструкция апикальных микроворсинок, исчезновение базальной складчатости и уменьшение количества фагосом. Последнее свидетельствует о нарушении фагоцитарной активности клеток РПЭ. При этом у крыс OXYS удельная площадь клеток РПЭ меньше, чем у крыс Вистар на 20-30% (Жданкина и др. 2008, Стефанова и др. 2013). Следует отметить, что первые признаки структурно-функциональных нарушений клеток РПЭ выявляются уже в возрасте 20 дней при отсутствии клинических проявлений ретинопатии.

Снижение функциональной активности пигментного эпителия приводит к деструктивным изменениям подлежащего фотосенсорного слоя. В возрасте 3 месяцев у крыс OXYS ярко выражены изменения фоторецепторов: истончен слой наружных сегментов, наблюдаются деструктивные изменения мембран митохондрий внутренних

сегментов, увеличено количество ядер с пикнозом. К возрасту 24 месяцев патологические изменения в сетчатке крыс OXYS нарастают и приводят к тотальной гибели фоторецепторов (Жданкина и др. 2008, Сапрунова и др. 2010, Neroev et al. 2008), что подтверждается результатами электроретинографии – вдвое сниженной амплитудой b-волны.

Ассоциативные и ганглионарные нейроны сетчатки крыс OXYS характеризуются отеком перикарионов и дегенеративными нарушениями, характерными для кариопикноза и хроматолиза. Процент гиперхромных и пикнотических ассоциативных и ганглионарных нейронов в 3-4 раза превышает аналогичные показатели крыс Вистар. Также достоверно увеличен процент пикноморфных радиальных глиоцитов (Жданкина и др. 2008). Об обширной дегенерации нейроретины свидетельствует уменьшение толщины наружного и внутреннего сетчатого слоев сетчаток, которые состоят из отростков нейронов и синаптических контактов между ними. На полутонких срезах были выявлены изменения синаптических контактов по светлomu типу с набуханием отростков, дезагрегацией синаптических везикул и отеком митохондрий (Жданкина и др. 2013).

В работе А.М. Марковца (2009) показано, что развитие дистрофии сетчатки крыс OXYS происходит на фоне сниженной как на уровне мРНК, так и на уровне белка экспрессии генов ключевых регуляторов ангиогенеза в сетчатке - *Vegfa* и *Pedf*. С возрастом экспрессия генов *Vegfa* и *Pedf* в сетчатке крыс обеих линий существенно снижалась, начиная с возраста 20 дней (в ~10 и ~5 раз для генов *Vegfa* и *Pedf* соответственно). У крыс OXYS экспрессия генов *Vegfa* и *Pedf* значительно снижалась уже к возрасту 3 месяцев, в то время как у крыс Вистар такое снижение уровня экспрессии происходило лишь к возрасту 12 месяцев. Снижение экспрессии в сетчатке у крыс OXYS по времени совпадало с периодом нарушения состояния сосудов и ухудшением состояния клеток РПЭ, а также с периодом активной манифестации клинических проявлений ретинопатии. Если уровень мРНК указанных генов у крыс OXYS существенно не менялся с возраста 3 до 24 месяцев, то у крыс Вистар экспрессия генов *Vegfa* и *Pedf* с возраста 12 месяцев начинала повышаться и в 24 месяца достигла половины уровня, свойственного 20-тидневным крысам этой линии. Авторы предположили, что у крыс Вистар развивается адекватный сбалансированный ответ на связанную с характерными для старения изменениями сосудов сетчатки гипоксию и

достигается физиологический баланс, препятствующий развитию патологических изменений. А у крыс OXYS подобной компенсаторной реакции не наблюдалось, и уровень экспрессии генов *Vegfa* и *Pedf* оставался низким, на уровне 3-х месячных животных.

Методами электронной микроскопии были выявлены изменения ультраструктуры клеток РПЭ крыс OXYS (Сапрунова и др. 2010, 2012). Было обнаружено, что у крыс OXYS локализация и распределение липофусциновых гранул в пигментном эпителии отличаются от таковых у контрольных крыс Вистар. Если у крыс Вистар липофусциновые гранулы выявляются в цитоплазме апикальной части клеток пигментного эпителия в составе непрерывного электронно-плотного слоя цитоплазматических включений, то у крыс OXYS липофусциновые гранулы накапливаются в основании выростов клеток пигментного эпителия, направленных к клеткам палочек, а также заполняют пространство между клетками палочек. В норме в палочках в процессе фотопревращения родопсина транс-ретиноид в комплексе с фосфатидилэтаноламином переносится через фоторецепторную мембрану в цитоплазму наружного сегмента и далее - в клетку пигментного эпителия. Своевременно не выведенный из фоторецепторной мембраны диска ретиноид накапливается и через ряд химических реакций превращается в бис-ретиноид-этаноламин (A2E), компонент липофусциновых гранул. В настоящее время доказано, что липофусциновые гранулы фототоксичны, т.к. входящие в них компоненты, прежде всего - A2E, обладают способностью при действии света инициировать свободнорадикальные реакции, сопровождающиеся генерацией АФК (Островский М.А. 2005). Важно, что в РПЭ у крыс OXYS наблюдается снижение количества фагосом – фагоцитированных пигментным эпителием обломков наружных сегментов фоторецепторов. Эти изменения в ультраструктуре пигментного эпителия могут отражать нарушения функционирования наружных сегментов фоторецепторов и зрительного цикла (Сапрунова и др. 2010).

Манифестация ретинопатии у крыс OXYS совпадает по времени с другими проявлениями преждевременного старения, в частности, катарактой, нейродегенерацией мозга и ранней инволюцией тимуса. Связующим звеном между этими состояниями может быть повышенная чувствительность крыс OXYS к окислительному стрессу. Накоплению окислительных повреждений в клетках РПЭ отводят существенную роль в развитии ВМД (Plafker et al. 2012). Насыщенность мембран наружных сегментов

фоторецепторов легкоокисляющимися липидами (до 50% полиненасыщенных жирных кислот) создает предпосылки для развития в них окислительного стресса. Методом хемилюминесцентного анализа было выявлено усиление спонтанной хемилюминесценции в гомогенатах сетчаток крыс OXYS (Жданкина и др. 2013). Однако клинические проявления ретинопатии, как и ранней катаракты, у крыс OXYS развиваются раньше, чем регистрируется повышенный уровень окислительных повреждений белков и липидов (Фурсова и др. 2005).

Таким образом, при развитии ретинопатии у крыс OXYS происходят изменения всех структур сетчатки на фоне выраженного тромбообразования в интратретиальных и хориоидальных сосудах. В целом результаты исследований позволяют заключить, что ретинопатия крыс OXYS соответствует критериям генетической модели ВМД. Линия крыс OXYS стала признанной моделью ВМД на мировом уровне (Pennesi et al. 2012) и представляет большой интерес для исследования механизмов развития ВМД у человека. Ее использование открывает уникальные возможности для оценки эффективности лечения и профилактики новыми препаратами.

1.5. Молекулярно-генетические методы выявления генов, участвующих в генетическом контроле и патогенезе комплексных заболеваний

Комплексные заболевания представляют собой большую группу распространенных болезней, развитие которых определяется сложным взаимодействием наследственных факторов (мутаций или сочетаний аллелей) и факторов среды, причем те и другие многочисленны. К комплексным заболеваниям относится большинство зависимых от возраста заболеваний: ишемическая болезнь сердца, гипертония, атеросклероз, остеопороз, диабет, болезнь Альцгеймера, возрастная макулярная дегенерация, глаукома и другие. Зависимые от возраста заболевания развиваются у лиц с рисковым генотипом в пожилом возрасте при провоцирующем действии факторов среды (Баранов и др. 2010). Доказательства роли наследственных факторов в развитии этих заболеваний в основном получены двумя традиционными генетическими методами: семейным (генеалогическим) и близнецовым. В генетическом контроле комплексных болезней участвует большое число генов, т.е. наследование носит полигенный характер. Участие большого числа генов обуславливает разнообразие клинических вариантов комплексных заболеваний, варьирующих от семьи к семье (Пузырев В.П. 2003).

Для большинства комплексных болезней изменение структуры белка не является ни необходимым, ни достаточным условием развития патологии (Weiss et al. 2000, Manolio et al. 2009). В их контроле принимает участие большое число генов, значительная часть которых является регуляторными. Вследствие этого основной причиной болезни становится не нарушение структуры белка, а изменение его концентрации в определенном месте и в определенное время. Манифестация болезни существенно зависит от возраста и внешних условий, что приводит к неполной пенетрантности (Kato et al. 2005). По мнению Т.И. Аксенович, для комплексных болезней уместно правило: много генов – много вариантов их экспрессии – много фенотипических проявлений (Аксенович Т.И. 2006). Это утверждение находит подтверждение в литературе (Manolio et al. 2009, Cookson et al. 2010).

Для объяснения наследования комплексных заболеваний была предложена модель «распространенная болезнь – распространенный генетический вариант» CDCV (Common Disease – Common Variant hypothesis) (Reich and Lander 2001, Botstein et al. 2003), в которой предположено, что комплексные болезни вызываются одним или несколькими аллелями (майор-факторами) в каждом локусе количественного признака. Известными примерами, подходящими под эту модель, являются аллель $\epsilon 4$ гена *APOE*, участвующий в контроле болезни Альцгеймера, аллель гена фактора V (замена C на A в позиции 1691) в контроле тромбоза глубоких вен и аллель гена *CCR5 Δ 32* в контроле резистентности к ВИЧ (Peng et al. 2007). Частота аллеля $\epsilon 4$ гена *APOE* в европейских популяциях достигает 20%, а риск заболевания для его носителей повышается приблизительно в 3 раза по сравнению со средним для популяции. Для гомозигот по аллелю $\epsilon 4$ риск повышается в 15 раз. Аллель $\epsilon 4$ объясняет около 20% случаев болезни Альцгеймера (Liu et al. 2013). Кроме CDCV модели в архитектуре комплексных болезней встречается другая модель – «распространенная болезнь – множественные редкие генетические варианты» CDRV (Common Disease – Multiple Rare Variants) (Bodmer et al. 2008, Robinson R. 2010). Ее примером может служить детерминация рака молочной железы и яичников, обусловленная множественными мутациями генов *BRCA1* и *BRCA2*. Наличие высокопенетрантных мутаций в этих генах повышает риск развития рака молочной железы и яичников в 20 раз. Однако суммарная частота мутантных аллелей этих генов в европейских популяциях не превышает 3% (Meindl et al. 2011, Gracia-Aznarez et al. 2013).

В настоящее время общепринятой является точка зрения, что для большинства комплексных болезней контроль осуществляется по смешанному типу, т. е. в нем принимают участие как редкие, так и относительно распространенные аллели (Gibson G. 2012). Такая ситуация возможна даже в рамках одного гена. Например, у 60 % людей, страдающих болезнью Крона, в гене CARD15 обнаруживается один из трех распространенных аллелей, а еще у 20% болезнь объясняется присутствием одного из 27 редких аллелей этого же гена (Lesage et al. 2002).

1.5.1. Картирование генов комплексных заболеваний

Сложные межгенные взаимодействия, влияние средовых факторов, генетическая гетерогенность, выраженный полиморфизм клинических проявлений существенно затрудняют картирование генов комплексных заболеваний. Основными подходами к картированию генов комплексных болезней являются: изучение генов-кандидатов, анализ сцепления локусов QTL (локус количественного признака, quantitative trait locus) и полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА, genome-wide association study – GWAS).

Ключевым моментом при изучении генов-кандидатов является их выбор, который осуществляется на основе знаний о биологии признака. Как правило, такие знания получают при изучении модельных объектов. При изучении генов-кандидатов следует иметь в виду, что не всякий ген, потенциально вовлеченный в контроль признака, имеет аллельные варианты, изменяющие его функцию. Теоретические исследования показывают, что только малая доля таких генов (около 5–10 %) полиморфна и вносит вклад в генетический контроль признака (Pritchard, Cox 2002). Таким образом, если список генов-кандидатов составлен на основе знаний о модельных объектах, то шанс найти функциональный вариант относительно мал, и при изучении генетического контроля признаков человека необходимо исследовать множество таких генов. В идеальном случае ген-кандидат следует выбирать на основании не только биологических знаний, но также и предварительно проведенного геномного сканирования (Аульченко, Аксенович 2006).

Локусы QTL представляют собой участки хромосом, оказывающие существенное влияние на проявление количественного признака. Анализ сцепления локусов QTL является одной из стратегий, применяемых для исследований комплексных признаков, проводимых с участием растений и инбредных линий животных. Он основан на генетических принципах мейотической рекомбинации и свободной сегрегации аллелей.

Для идентификации локусов, ассоциированных с количественным признаком, проводят скрещивания контрастных по признаку инбредных линий, получая F_1 и затем F_2 . Анализ QTL является статистическим методом, он устанавливает связь между количественным значением признака и аллельным составом локуса для всех индивидуумов в сегрегированной популяции с помощью молекулярных маркеров (Redina et al. 2006). Если локусы QTL для комплексного признака существуют, аллельные варианты неизвестного, отвечающего за признак гена, будут сегрегировать совместно с аллелями ближайшего маркера. В качестве молекулярных маркеров часто используют микросателлитные повторы. Точность картирования QTL определяется тремя показателями: плотностью маркеров, размером популяции и точностью оценки количественного проявления признака (Вреугденхил и др. 2007). Как правило, выявляемые локусы QTL охватывают протяженные участки разных хромосом с сотнями генов, каждый из которых по отдельности слабо влияет на количественный признак. Для высокоразрешающего картирования локусов QTL сегодня используют следующие подходы: анализ экспрессии генов-кандидатов, построение конгенных линий и получение мутантов, которые имеют мутацию гена, расположенного в пределах QTL, и проявляют ожидаемый фенотип.

Один из наиболее перспективных современных методов, применяемых для идентификации локусов сложных признаков, является метод полногеномного анализа ассоциаций (ПГАА). При ПГАА сотни тысяч однонуклеотидных замен (SNP) типированы в группах фенотипированных людей. Изучение ассоциации между распределением генотипов и фенотипа позволяет установить связь между аллельной вариацией в некотором геномном районе и исследуемым признаком. ПГАА требуют высокой мощности анализа, которая обеспечивается как обширными выборками индивидов (несколько сотен или тысяч), так и огромным набором (сотни тысяч) полиморфизмов (Степанов В.А. 2010). При использовании больших выборок этот метод позволяет идентифицировать распространенные аллели с малым эффектом. Каталог опубликованных ПГАА поддерживается Национальным институтом геномных исследований США и включает ПГАА, отобранные по очень строгим критериям: должно быть проанализировано не менее 100 000 SNP, а уровень значимости ассоциации между SNP и признаком должен быть менее 0,00001 (Hindorff et al. 2009). К 2013 году в каталоге содержалось 15 опубликованных исследований ПГАА по ВМД,

соответствующих данным критериям, в которых сообщается о 33 локусах, достоверно ассоциированных с ВМД. В настоящий момент ПГАА является общепризнанным методом картирования сложных признаков. Число локусов, идентифицированных с помощью метода ПГАА, к 2013 году превысило 2 тысячи. Следует отметить, что, хотя идентификация локусов сложных признаков с помощью метода ПГАА и является важным этапом генетического анализа, этот метод зачастую не дает окончательного ответа на вопросы, функция какого именно гена затронута и какой именно генный продукт вовлечен в контроль признака. Для ответа необходимо проведение функциональных, молекулярно-генетических и физиологических исследований (Аульченко, Аксенович 2006). Более того, разрешающая способность метода ПГАА ограничена распространенными аллелями. В то же время в контроле комплексных заболеваний, судя по всему, велика роль множественных редких аллелей. Прогнозируется, что такие аллели можно будет детектировать с помощью современных технологий секвенирования индивидуальных геномов NGS (next generation sequencing), цена которых стремительно снижается (Hindorff et al. 2009).

В целом, в отличие от изучения генов-кандидатов, скрининг всего генома методом QTL и ПГАА позволяет исключить влияние субъективных представлений исследователя о связи генов с изучаемой патологией.

1.5.2. Методы определения транскрипционных профилей

Один из эффективных способов выявления генов-кандидатов, участвующих в патогенезе заболевания, – это исследование транскриптома. Изменения экспрессии различных групп генов могут быть ассоциированы с различными клиническими стадиями заболевания. Поэтому работы по изучению изменений транскриптома в ходе развития заболевания становятся незаменимым инструментом исследования механизмов комплексных заболеваний. Современные технологии анализа транскриптома, включающие ДНК-микрочипы и секвенирование транскриптома, позволяют сравнивать уровни экспрессии одновременно десятков тысяч генов. Одновременный мониторинг их экспрессии позволяет отслеживать целые паттерны изменений и определять связанные с ними метаболические пути (Nagalakshmi et al. 2008, Van Berkum et al. 2001).

1.5.2.1. ДНК-микрочипы

Технология ДНК-микрочипов получила широкое распространение в начале 2000-х годов и оказала огромное влияние на фундаментальные и прикладные исследования молекулярно-генетических основ в биологии и медицине. ДНК-микрочипы нашли свое место в онкологии (Zhang et al. 2012, Quackenbush J. 2006), токсикологии (Shioda et al. 2004), фармакологии и биологии развития (Robson P. 2004). Термин «microarray» в базе PubMed выдает более 40 тысяч ссылок. В архиве данных по транскриптому GEO (Gene Expression Omnibus), курируемом NCBI (National Center for Biotechnology Information), содержится информация о более чем 520 тысячах экспериментов и около 21 тысяче завершенных проектов с использованием микрочипов (Malone, Oliver 2011).

Метод ДНК-микрочипов основан на принципе комплементарной гибридизации. На подложку-носитель, которая может быть нитроцеллюлозной мембраной или стеклом, в строго определенном порядке наносятся нуклеотидные последовательности–зонды, комплементарные участкам ДНК-мишени. Выделенную из образца ткани мРНК в реакции обратной транскрипции переводят в кДНК, при этом во время синтеза в молекулу кДНК встраиваются флуоресцентные метки. Среди флуоресцентных красителей наибольшее распространение получили молекулы Cy3-дУТФ и Cy5-дУТФ, отличающиеся высокой эффективностью встраивания, хорошей фотостабильностью и высоким квантовым выходом, а также значительной разнесенностью спектров возбуждения и флуоресценции (Свешникова и др. 2007). Меченые ДНК-мишени гибридизуются с последовательностями-зондами. Затем в специальном сканирующем устройстве измеряется интенсивность флуоресценции в диапазонах 550-600 нм для Cy3 и 655-695 нм для Cy5. В результате сканирования флуоресценции на прогибридизованном микрочипе исследователь получает массив данных об интенсивности в каждом из пикселей (элементарных единиц площади) аналогового изображения микрочипа. Специализированное программное обеспечение позволяет разделить пиксели, соответствующие точкам нанесения олигонуклеотидных зондов, и фоновые пиксели (Yang et al. 2001). Относительные уровни экспрессии разных генов могут быть восстановлены по интенсивности свечения спотов.

По типу последовательностей зондов микрочипы делятся на олигонуклеотидные микрочипы и кДНК-микрочипы. Оба вида микрочипов имеют сильные и слабые стороны. Использование олигонуклеотидных микрочипов позволяет обойтись без

бактериальных клонов и продуктов ПЦР, различать высокоомологичные гены из одного семейства, учитывать эффекты неспецифического связывания. К недостаткам олигонуклеотидных микрочипов относят высокую стоимость производства и существенную зависимость от качества синтеза олигонуклеотидов (Murphy et al. 2002). В отличие от олигонуклеотидных микрочипов изготовление микрочипов на базе кДНК не является дорогой процедурой, более того, кДНК микрочипы на основе мембран могут быть многоразовыми (Свешникова и др. 2007). Длинные фрагменты кДНК обеспечивают высокую специфичность связывания с ДНК-мишенями. Главный недостаток кДНК микрочипов – невысокая точность и худшая (по сравнению с олигонуклеотидными микрочипами) воспроизводимость результатов (Murphy et al. 2002).

Для любого измерительного метода важно знать его погрешность и условия применимости. Уже в первые годы стало ясным, что при микрочиповом анализе требуется учитывать ряд биологических и технических факторов, влияющих на воспроизводимость результатов. Обусловленная техническими причинами вариабельность возникает на этапах подготовки и проведения экспериментов и сканирования микрочипа. При изготовлении микрочипов невозможно добиться абсолютной идентичности, микрочипы могут отличаться друг от друга по характеристикам гибридизации или чувствительности к флюоресцентным меткам. Источниками вариации ДНК-микрочипов являются количество клеток в образце, эффективность выделения РНК, эффективность мечения и синтеза кДНК, размер спота и плотность, эффективность гибридизации и отмывок, время экспозиции и чувствительность детекции (Zien et al. 2001, Irizarry et al. 2005, Kreil, Russell 2005). Биологическую вариабельность необходимо иметь в виду при анализе дифференциальной экспрессии; например, высокая биологическая вариация характерна для генов с суточными ритмами экспрессии.

Нейтрализация эффектов технических вариаций и ошибок измерения производится на этапе обработки данных ДНК-микрочипов, которая включает обработку потерянных значений фоновой поправки, учета неспецифических взаимодействий и нормализации внутри и между чипами (Bolstad B.M. 2004, Chen et al. 2009). Потеря значения для спота на микрочипе может возникнуть в результате появления на нем царапин, пылинок или в результате технической неисправности при

производстве чипа (Troyanskaya et al. 2001). Значимость таких потерь для последующего анализа весьма велика. Так, показано, что при искусственном введении в профили экспрессии 1% потерянных значений при последующем кластерном анализе многие гены меняют свои положения в кластерах относительно друг друга (deBevern et al. 2004). То есть нарушается структура групп генов, имеющих сходные профили экспрессии. В другом исследовании (Scheel et al. 2005) авторы указывают на значимость потерянных значений для выделения генов с различной экспрессией методом дисперсионного анализа. Помимо повторения неудачных гибридизаций, наиболее распространены следующие подходы для работы с потерянными значениями: исключение их из анализа, замещение нулём при \log_2 -трансформации, замещение средним значением репликатов. Кроме того, распространённым является исключение из рассмотрения спотов, чья интенсивность не превосходит определенного уровня, например 1,4 интенсивности фона (Sebastiani et al. 2003).

Необходимость фоновой поправки обуславливается такими источниками технической вариации, как погрешность измерений оптического прибора, светимость подложки сканера, наличие пузырьков воздуха в образце, пыли и так далее (Bolstad B.M. 2004, Choe et al. 2005). В ранних версиях микрочипов фирмы Affimetrix для анализа фонового шума изначально предполагалось использовать модифицированные ММ-зонды, отличающиеся от «правильных» РМ-зондов серединным нуклеотидом. По замыслу разработчиков микрочипа ММ-зонды не должны были вступать в реакцию со специфическими генами, поэтому с их помощью можно было бы оценить фоновую интенсивность. Этот подход сразу же продемонстрировал свою несостоятельность: оказалось, что в среднем для микрочипа интенсивность около 30% ММ-зондов превышает интенсивность соответствующих им РМ-зондов. Причиной большого значения интенсивности ММ-зонда является неспецифическая гибридизация (Chen et al. 2009).

Разработка и улучшение методов оценки неспецифических взаимодействий между зондами и молекулами генов является одной из ключевых задач при анализе данных микрочипов. Этот эффект неизбежно возникает в ходе реакции сложной смеси фрагментов кДНК с зондами на микрочипе (Furusawa et al. 2009). Возникает ситуация, достаточно частая, когда у зонда в гибридизационной смеси может быть несколько мишеней, последовательность которых частично комплементарна последовательности

зонда. В таком случае зонд теоретически может вступить в реакцию с ними, хотя и с гораздо меньшей вероятностью, чем со специфическим геном. К тому же на протекание реакции и силу связывания молекул оказывает влияние их длина и нуклеотидный состав (Nguyen K. 2009). Было показано, что молекулы, содержащие больше гуанина и цитозина, обладают большей силой гибридизации (Langdon et al. 2009). Для высоко экспрессирующихся генов возможен также эффект насыщения: при больших концентрациях генов зависимость свечения зондов от концентрации перестает быть линейной (Burden et al. 2003). Экспрессию таких генов нужно учитывать отдельно от остального пула генов. На новых микрочипах Affymetrix для оценки неспецифической гибридизации используют так называемые пробы шума. Эти пробы сконструированы таким образом, чтобы для них не было специфических генов, поэтому их интенсивность может быть мерой неспецифических взаимодействий. В нашей работе в разработанных целевых ДНК-микрочипах в качестве контроля неспецифического связывания была использована смесь коротких последовательностей (20-25 н.о.) ДНК семейства *Opisthorchiidae*, имеющих низкую гомологию с ДНК млекопитающих.

Таким образом, в отличие от нового метода анализа транскриптома с помощью массового параллельного секвенирования, за годы использования ДНК-микрочипов были накоплены знания об областях применимости и ошибках достоверности их анализа. Понимание возможных систематических ошибок при использовании микрочипов привело к разработке надежных аналитических решений для их учета (Malone, Oliver 2011).

1.5.2.2. Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq)

Массовое параллельное секвенирование нового поколения (next-generation sequencing, NGS) - это одна из самых последних разработок в области молекулярной биологии. Технологические платформы нового поколения для широкомасштабного секвенирования геномов были созданы в 2005 году фирмами 454 Life Sciences (Margulies et al. 2005) и Illumina (Bennet et al. 2005). В 2008 году Nagalakshmi с соавт. предложили использовать NGS технологии для анализа транскриптома и разработали метод, названный RNA-seq (Nagalakshmi et al. 2008). С тех пор метод получил широкое распространение: в базе Pubmed к 2013 году индексируется более 1500 тысяч работ, использовавших этот подход для оценки транскрипционной активности генов. В настоящее время секвенирование транскриптома осуществляется с использованием

платформ Illumina, 454 Life Sciences и SOLiD. Платформы используют разные стратегии приготовления ДНК-матриц, секвенирования и визуализации данных: секвенирование путем синтеза (Illumina), секвенирование путем лигирования (SOLiD) и пиросеквенирование (454 Life Sciences). Технические и методологические различия между секвенаторами приведены в обзорах Mardis E.R. (2008) и Ansorge W.J. (2009). Общая схема работы включает создание библиотеки последовательностей ДНК определенного размера, к которым присоединяются с обоих концов адаптерные последовательности. С использованием этих адаптеров фрагменты ДНК амплифицируются на шариках или проточных ячейках. Затем полученные кластеры, или колонии ампликонов, секвенируются параллельно с образованием массива коротких прочтенных последовательностей длиной 30-100 н.о., или ридов. Число полученных ридов может достигать десятков миллионов и характеризует глубину прочтения.

Технология RNA-seq имеет ряд преимуществ над экспрессионными микрочипами, которые являлись доминирующим методом анализа транскриптома последние 15 лет. В экспрессионных микрочипах набор анализируемых генов заранее предопределен и соответствует имеющимся знаниям о геноме организма, в то время как RNA-seq позволяет характеризовать транскрипцию гена без предварительного знания его первичной последовательности. Метод RNA-seq позволяет различить транскрипты с отличием в одном нуклеотиде, поэтому может быть использован для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в генах (SNP) и получения данных об альтернативном сплайсинге и редактировании РНК (Wang et al. 2010, Oshlack et al. 2010). С помощью RNA-seq было выявлено множество новых, ранее не описанных транскриптов в тканях мозга, печени и скелетных мышцах у мышей (Mortazavi et al. 2008). Недавно в сетчатке человека глубоким секвенированием транскриптома было обнаружено огромное разнообразие сплайсированных вариантов генов: более 79 915 новых вариантов сплайсинга, 29 887 новых экзонов и 116 потенциально новых генов (Farkas et al. 2013).

Секвенирование обладает очень низким уровнем шума. Динамический диапазон и чувствительность метода RNA-seq выше, чем у ДНК микрочипов, что позволяет измерять широкий спектр уровней экспрессии генов (Mortazavi et al. 2008, Nagalakshmi et al. 2008, Sultan et al. 2008, Wilhelm et al. 2009, Degner et al. 2009, Oshlack et al. 2010). Результаты секвенирования обладают высокой воспроизводимостью, что было показано

как на технических, так и на биологических репликатах (Marioni et al. 2008, Bullard et al. 2010). Более того, в обзорной статье Wang с соавт. (2009) заявили, что анализ данных RNA-seq не требует нормализации между разными экспериментами, обуславливая это отсутствием эффекта нелинейного искривления, свойственного микрочипам из-за химического и оптического насыщения реакции гибридизации.

Однако этот метод обладает и рядом недостатков. На сегодняшний день использование RNA-seq для определения концентрации РНК в образце является дорогостоящей процедурой, осложняющейся высокими техническими требованиями, как к качеству образца, так и к проведению эксперимента. В связи с этим перед исследователем встает проблема использования имеющихся средств на увеличение либо глубины прочтения, либо количества биологических репликатов (n). Большая глубина прочтения позволяет проводить поиск SNP и учитывать сплайсированные варианты транскриптов. От количества n зависит надежность анализа дифференциальной экспрессии (Rapaport et al. 2013). Интересно, что увеличение глубины прочтения на результаты анализа дифференциальной экспрессии существенным образом не влияет (Bashir et al. 2010).

Основная задача технологии RNA-seq заключается в правильной обработке полученного массива данных, который включает два этапа: картирование ридов на референсный геном и собственно анализ ДЭ. Не все риды однозначно картируются на референсный геном, связано это в первую очередь с неполным несоответствием исследуемого генома с референсным, наличием в нем инсерций, делеций и дополнительных копий гена. Играть роль также систематические ошибки секвенирования, присущие определенным платформам (Hansen et al. 2010, Li et al. 2010, Pickrell et al. 2010). Так, известно, что у платформы Illumina существует некоторая селективность в отношении секвенирования более длинных генов (Oshlack, Wakefield 2009). В работе Bullard и соавт. (2010) было показано, что в результате этой селективности более длинные гены чаще декларируются как ДЭ, в то же время нормировка на длину гена подобный эффект может смягчать. Биоинформатиками и статистиками разработано множество программ для проведения обработки и оценки точности данных RNA-seq. Каждая из программ имеет свои алгоритмы для решения проблемы неоднозначности картирования, допущения и условия применимости, ставя перед исследователем очередной вопрос выбора метода анализа.

Необходимо отметить, что данные RNA-seq, так же как и данные экспрессионных микрочипов, по-прежнему отражают относительный, а не абсолютный уровень различных транскриптов в клетке (Pachter et al. 2011). Во многих работах показана неполная сходимость результатов, полученных микрочипами и методом RNA-seq (Asmann et al. 2009, Fu et al. 2009, Malone et al. 2011, Guo et al. 2013). Несмотря на то, что RNA-seq сейчас пользуется большей популярностью, многие исследователи не спешат отбрасывать накопленные за 15 лет данные микрочипового анализа. В силу высокой стоимости, отсутствия стандартизованных подходов к анализу ('t Hoen et al. 2013, Willenbrock et al. 2009), технология RNA-seq на данный момент не может заменить микрочиповый анализ. Учитывая ограничения каждой технологии, в настоящее время признано, что оба метода, основанные на разных принципах, гибридизации и секвенирования, должны рассматриваться как комплементарные, а не конкурирующие способы исследования экспрессии генов (Kogenaru et al. 2012, Liu et al. 2007, Hornshøj et al. 2009, Merrick et al. 2013, Nookaew et al. 2012).

Заключение

Анализ существующей литературы показывает, что выяснение молекулярно-генетических механизмов патогенеза зависимых от возраста заболеваний, в том числе ВМД, является важной проблемой современной медико-биологической науки. За последнее десятилетие приложены огромные усилия к изучению этиологии и патогенеза ВМД. Было показано, что в основе возникновения ВМД лежат сложные взаимодействия генетических и средовых факторов. Накоплено значительное количество данных о вовлеченности различных генов в формирование предрасположенности к ВМД. Однако, несмотря на выявленные полиморфизмы, ассоциированные с ВМД, их функциональная роль в патогенезе ВМД не ясна. В совокупности выявленные полиморфизмы только частично объясняют некоторые его звенья. Поэтому необходимы дальнейшие исследования этиологии и патогенеза ВМД.

Обзор методов выявления генов, участвующих в генетическом контроле и патогенезе комплексных заболеваний, показывает, что одним из перспективных подходов является анализ транскриптома, или профиля экспрессии генов, — совокупности экспрессирующихся в ткани мРНК. При помощи анализа транскриптома можно выявлять группы дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов, соответствующие определенным клиническим стадиям заболевания. Считается, что

выявление ДЭ генов и метаболических путей способствует лучшему пониманию механизмов развития заболевания, а также созданию новых методов его диагностики, профилактики и лечения. На моделях животных были проведены исследования транскриптома сетчатки в норме и при различных патологиях методом ДНК-микрочипов. Известно несколько работ, в которых исследовали транскриптом постмортальных образцов сетчатки у людей, и только одна работа посвящена исследованию транскриптома сетчатки больных ВМД (Newman et al. 2012). Стоит отметить, что на момент постановки задач данной диссертации не были известны работы по анализу возрастных изменений транскриптома сетчатки методом RNA-seq.

Молекулярные события, происходящие на ранних стадиях заболевания, могут лежать в основе первичных механизмов заболевания, а изменения, характерные для поздних стадий, скорее всего, отражают вторичные или сопутствующие процессы. В этой связи очевидна важность изучения ранних стадий комплексных заболеваний, в том числе ВМД. Однако исследования ранних стадий ВМД на людях существенно ограничены, поскольку они протекают бессимптомно. Сложность изучения ВМД на людях, особенно ее ранних стадий, обуславливает создание адекватных моделей животных.

Ретинопатия крыс OXYS по клиническим и морфологическим признакам соответствует ВМД человека (Pennesi et al. 2012). Достоинство крыс OXYS как модели ВМД состоит в том, что у них ретинопатия проходит на фоне манифестации других зависимых от возраста заболеваний (нейродегенеративных изменений мозга, остеопороза, катаракты), приближаясь к реальной ситуации, наблюдаемой у человека. Механизмы развития признаков преждевременного старения крыс OXYS остаются неясными, но их комплексное проявление уже в молодом возрасте предполагает общие молекулярно-генетические основы. Ранее оценка вклада изменений экспрессии в развитие ретинопатии у крыс OXYS была дана лишь для нескольких генов (Markovets et al. 2011), что, очевидно, недостаточно для выяснения механизмов патогенеза заболевания. До начала настоящей работы методом QTL-анализа были выявлены два локуса на 1-й хромосоме, ассоциированные с развитием у крыс OXYS некоторых фенотипических признаков, в том числе ретинопатии. Следовательно, эти локусы могут рассматриваться как основные районы для поиска генов-кандидатов ретинопатии крыс OXYS. Для доказательства существования в найденных локусах гена (генов), влияющих

на развитие фенотипических признаков крыс OXYS, два выявленных локуса, маркированных микросателлитами крыс OXYS, были перенесены в геном крыс WAG (Korbolina et al. 2012). В случае выявления у этих животных ретинопатии конгенные линии также могут служить уникальным инструментом для выявления генетических основ её развития.

Таким образом, цель и задачи настоящего исследования - выявление генов с измененной экспрессией и метаболических путей, связанных с развитием ретинопатии у крыс OXYS, оценка заболеваемости ретинопатией крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 - представляются вполне актуальными.

ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы, использованные в работе

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: акриламид, N,N-метиленбисакриламид, аммония персульфат, бромистый этидий, борная кислота, трис, ЭДТА, $MgCl_2$, NaCl, NaOH, цитрат Na (SSC), альбумин БСА, сахароза, фосфатно-солевой буфер PBS, ДНК спермы лосося (Медиген, Россия); хлороформ, этанол, изопропанол, бромфеноловый синий (реактивы отечественного производства марки х.ч.); Hot-start Taq-ДНК-полимераза, dATP, dGTP, dTTP, dCTP, маркер молекулярного веса ДНК pUC19/MspI (13 фрагментов от 26 п.н. до 501 п.н.) (СибЭнзим, Россия); Tween20, SYBR Green I (Molecular Probes, США); TRI-Reagent, RNAlater (Ambion, США); набор реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (Синтол, Россия); ингибиторы протеаз P8340 (Sigma-Aldrich, США); реактивы для определения содержания белка (Bio-Rad Laboratories Kit, США); human/rat A β (1-42) ELISA kit (Wako Pure Chemical Industries, Япония); эпоксидсилановые стекла (Corning, США); Cy3, Cy5 дУТФ, нитроцеллюлозная мембрана Hybond-CExtra (Amersham, Великобритания); Super Script Direct cDNA Labeling System (Invitrogen, США); полилизинные стекла (Thermo Scientific); Killik (Bio-Optica, Италия); Tween20, Triton X100, β -меркаптоэтанол (Sigma, США); Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam, США); первичные антитела к A β 42 (ab10148, Abcam, США); вторичные антитела DyLight® 650 (ab96886, Abcam, США). Праймеры для ПЦР-РВ и олигонуклеотидные зонды были синтезированы в ООО «Биоссинтез» (Новосибирск) на автоматическом синтезаторе ACM-2000.

2.2. Животные

Работа выполнена на крысах-самцах линий OXYS, Вистар и конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 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°C 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. Офтальмологические осмотры

Состояние глазного дна животных оценивалось с помощью прямого офтальмоскопа «Beta» (Германия) после расширения зрачков 1% раствором тропикамида. Для оценки наличия и степени выраженности патологических изменений сетчатки использовалась классификация AREDS (Age-Related Eye Disease Study, <http://eyephoto.opth.wisc.edu>). Оценка проводилась в баллах, соответствующих стадиям ВМД: 0 баллов - изменения отсутствуют; 1 балл – 1-я неэкссудативная стадия заболевания, при которой появляются точечные кровоизлияния, отеки, друзы в заднем полюсе глаза, дефекты в пигментном эпителии, перераспределение пигмента в РПЭ; 2 балла – 2-я экссудативная стадия, с экссудативной отслойкой РПЭ и нейроретины, атрофия хориокапиллярного слоя и пигментного эпителия; 3 балла – 3-я стадия - экссудативно-геморрагическая отслойка РПЭ и нейроретины, неоваскуляризация и рубцевание.

2.4. Забор и хранение образцов

Крыс декапитировали, извлекали глаза животного и помещали их на ледяную чашку Петри. Глаз разрезали по линии лимба. После удаления передней части глаза и хрусталика, с внутренней поверхности задней части склеры скальпелем собирали хориоретинальный комплекс. Ткань помещали в RNase-free пробирки и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до момента использования.

2.5. Световая микроскопия

Эксперимент выполнен на крысах WAG/OXYS-1.2 в возрасте 3 месяцев (n=5). После осмотра глаз крыс декапитировали, глаза извлекали, заднюю стенку глаз в течение 1 суток фиксировали в растворе 12% нейтрального формалина, затем в течение нескольких часов отмывали в проточной воде, обезжизивали, уплотняли и заливали в парафин по стандартной методике. С помощью ротационного микротомы готовили срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр и фотографирование препаратов проводили на микроскопе AxioScop 2 Plus (Zeiss, Germany).

2.6. Анализ ДНК-микрочипов

Эксперимент выполнен на крысах OXYS, Вистар и WAG/OXYS-1.2. в возрасте 3 месяцев (n = 6-8). Работа выполнена в ЦКП функциональной геномики ИЦиГ СО РАН.

2.6.1. Выбор олигонуклеотидных зондов

55-60-звенные олигонуклеотидные зонды для 112 генов-кандидатов, комплементарные участку 3'-конца мРНК были выбраны с помощью программы Vector NTI. Нуклеотидные последовательности приведены в **приложении 1**. В подпрограмме OligoAnalyser олигонуклеотид анализировали на термодинамические свойства, которые должны соответствовать критериям: минимальное количество вторичных структур, отсутствие повторов и палиндромов, узкий диапазон температуры плавления: 65-70°C. В программе BLAST все выбранные последовательности были проверены на специфичность (уникальность соответствия выбранному гену). Помимо 112 зондов к генам-кандидатам в ДНК-микрочип были включены контрольные зонды: последовательность гена β -актина (Actb), «пустой» зонд, смесь коротких последовательностей 20-25 н семейства Opisthorchiidae для контроля неспецифического связывания, Cy5- меченый олигонуклеотид для контроля печати.

2.6.2. Изготовление ДНК-микрочипов

Концентрацию олигонуклеотидов проверяли спектрофотометрически. Олигонуклеотиды растворяли до концентрации 50 мкМ в буфере для нанесения (натрий-фосфатный буфер 150 мМ, pH 8.5). Перед печатью прибор тестировали на качество печати, размер и вылет капли в соответствии с инструкциями производителя (Piezotray, Perkin Elmer). Для обеспечения высокоточного дозирования все растворы и системные жидкости в приборе были дегазированы и приготовлены на MilliQ воде. Чтобы исключить перекрестную контаминацию во время печати ДНК микрочипов в программу печати микрочипа включили шаг промывки иглы робота в 2% растворе SDS. Печать проводили в помещении, свободном от пыли при температуре 20-22°C и относительной влажности от 55 до 70% по схеме на эпоксидсилановые стекла (Corning), позволяющие ковалентно связываться немодифицированным олигонуклеотидам со стеклянной подложкой.

2.6.3. Гибридизация

Суммарную РНК выделяли из замороженных образцов сетчатки в соответствии с протоколом Tri-Reagent (Ambion). По 25 мкг РНК метили либо Cy3-дУТФ, либо Cy5-дУТФ (Amersham) по протоколу Super Script Direct cDNA Labeling System (Invitrogen) с использованием олигодТ праймера. Меченые кДНК очищали по протоколу Super Script III Direct Purification Module и объединяли в одну пробирку с добавлением 20 мкг ДНК

спермы лосося. Смесь ДНК высушивали на приборе Eppendorf Concentrator plus и растворяли в 11 мкл гибридизационного буфера (50% формамид; 6xSSC; 0.5% SDS; 5xDenhard's).

Стекла предгибридизовали в 6 × SSC, 0.5% SDS и 1% БСА при 42°C в течение 1 ч, промывали 3 раза в 0.1x SSC по 5 мин, затем 1 раз в деионизованной воде и высушивали на центрифуге в 50 мл пробирках (Falcon) при 1600 g 2 мин. Смесь ДНК в гибридизационном буфере денатурировали 2 мин при 95°C, остужали при комнатной температуре, наносили на поверхность стекла с микрочипом и покрывали покровным стеклом. Гибридизацию проводили 16 часов при 42°C в гибридизационной камере HYBEX Microsample Incubator (Scigene). После гибридизации микрочипы 3 раза промывали в 2× SSC и 0.1% SDS (10, 5 и 5 мин) при постоянном перемешивании. Затем споласкивали в 1× SSC (30 с), 0.1× SSC (30 с) и высушивали на центрифуге (1600 g, 2 мин).

2.6.4. Обработка данных

ДНК-микрочипы сканировали на приборе Scan Array Lite (Perkin Elmer) с разрешением 10 μm. Сканированные изображения анализировали в программе Scan Array Express. Создавали файл с расширением .gal со схемой расположения названий генов и контрольных точек. При обработке использовали следующие критерии: 1) Adaptive Circle - способ подсчета пикселей в споте. Диаметр спота рассчитывали для каждого отдельного спота на чипе. Параметры оцениваемой области 50-200% от номинального диаметра спота. 2) Signal To Noise >3, отношение интенсивности сигнала к стандартному отклонению локальной фоновой интенсивности всех сигналов на микрочипе. 3) LOWESS - метод автоматической нормализации внутри микрочипа.

Для нормализации данных между разными чипами применялся подход с использованием генов «инвариантного» ряда. Были выбраны гены «инвариантного ряда» на ДНК-микрочипе с наиболее близкими значениями интенсивности свечения для разных стекол и имеющие интенсивность свечения, близкую к средней общей интенсивности. По значениям интенсивностей сигналов их спотов после фоновой поправки и поправки на неспецифическое связывание вычислялось среднее геометрическое. Степень гибридизации рассчитывалась как отношение значения интенсивности сигнала искомого гена с учетом фоновой поправки к среднему геометрическому сигналов зондов генов «инвариантного» ряда. Для статистической

обработки данных использовались алгоритмы программы Statistica 6.0: непараметрический U-тест Манна-Уитни. Различия принимались достоверными при $p < 0,05$.

2.7. Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-seq)

RNA-seq проводили на крысах OXYS и Вистар в возрасте 3 и 18 месяцев ($n = 3$).

2.7.1. Секвенирование на платформе Illumina

Выделенные сетчатки от каждого животного помещались в 1 мл RNeasy lysis buffer (Qiagen) и замораживались при -20°C . Образцы были переданы в ОАО «Геноаналитика» для выделения тотальной РНК и выполнения секвенирования на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в соответствии с протоколами секвенирования Illumina (mRNA-Seq Sample Prep Kit, Cat. 1004816). Поли-А фракция РНК (мРНК) была очищена от остальной РНК при помощи магнитных шариков (Sera-Mag Magnetic Oligo (dT) beads) и фрагментирована. В реакции обратной транскрипции с использованием Random праймеров была синтезирована кДНК. Смесь кДНК затем была обработана Т4 ДНК полимеразой и ДНК полимеразой Кленова для получения тупых концов. Основание аденина было добавлено к 3' тупому концу фосфорилированного ДНК фрагмента, после чего к нему лигировали адаптор 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 10 млн. прочтений (ридов) длиной 50 нуклеотидов.

2.7.2. Картирование и анализ дифференциальной экспрессии

Оценку качества секвенирования проводили с использованием программы FastQC. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* RGSC 3.4 (Ensemble release 69) с помощью программы TopHat (v2.0.4) в режиме “b2-sensitive” (Trapnell et al. 2009). Количество картированных на участки генов ридов было посчитано с помощью программ HTseq-count и Cufflinks. В соответствии с числом картированных ридов гены были разбиты на группы по перцентилям с высокой (выше 90), средней (50-90) и низкой (10-50) экспрессией. Коэффициент вариации рассчитывали как стандартное отклонение, деленное на среднее число ридов для каждого гена. Различия в экспрессии оценивали с

помощью программного пакета DESeq, использующего статистическую модель отрицательного биномиального распределения (Anders et al. 2010), и Cuffdiff, использующего для оценки параметра дисперсии для каждого гена распределение Пуассона (Trapnell et al. 2010). В DESeq значимость дифференциальной экспрессии тестировали методом GLM (Generalized Linear Model) при сравнении эффектов действия двух факторов (возраст и генотип). Уровень значимости изменения экспрессии рассчитывали с учетом поправки для множественных сравнений Бенжамини-Хохберга (БХ p-value, DESeq) и FDR (q-value, Cuffdiff). При создании объединенного списка ДЭ генов учитывали гены без поправки на множественные сравнения с $p < 0,01$. Функциональную аннотацию групп дифференциально экспрессирующихся генов проводили с помощью биоинформатических систем DAVID (Huang et al. 2009) при порогах значимости обогащения (EASE) $p < 0,05$ и PANTHER (Mi et al. 2005).

2.8. Выделение РНК

Замороженные образцы сетчатки 40-50 мг гомогенизировали в стерильном стеклянном гомогенизаторе в 1 мл TRI-Reagent (Ambion). Гомогенаты переносили в RNase-free пробирки. Инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и проводили центрифугирование на центрифуге Eppendorf-5804D в течение 10 мин на 12 000 об/мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Верхнюю фазу (0,5-0,6 мл) отбирали в новую RNase-free пробирку. Добавляли равный объем изопропанола, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и проводили центрифугирование в течение 10 мин на 12 000 об/мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Аккуратно удаляли супернатант. Осадок РНК промывали в 1 мл 75% этанола, сушили 3 мин и растворяли в 30 мкл RNase-free воды. Для измерения концентрации РНК аликвоту разбавляли в ТЕ буфере. Концентрацию разбавленной РНК определяли на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer при 260 нм против ТЕ буфера, полученное значение умножали на коэффициент разбавления. Качество РНК контролировали отношением $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$. Целостность РНК определяли электрофорезом в 1% агарозном геле в буфере TAE (40мМ трис-ацетат, 2мМ ЭДТА). Образцы РНК хранили при -70°C .

2.9. Обратная транскрипция

Синтез одноцепочечной кДНК проводился с помощью набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (Синтол). 2 мкг РНК смешивали с 0,5 мкг Random праймера, доводили объем до 14 мкл водой. Инкубировали смесь 5 минут при 70°C. Охлаждали во льду. Добавляли остальные компоненты из расчета конечного объема 20 мкл: 2 мкл 10х буфера (250 mM трис-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 2 мкл смеси нуклеотидов (dNTP, 5mM каждого), 1 мкл ингибитора РНКаз и 1 мкл (50 ед.) обратной транскриптазы M-MLV-RT. После перемешивания смесь инкубировали 10 минут при 25°C, затем 30 минут при 42°C, согласно рекомендациям производителя. Инактивация фермента проводилась при 92°C в течение 5 мин. Полученную кДНК разбавляли до 100 мкл. Из всех полученных образцов кДНК отбирали равные объемы и смешивали. Полученный «усредненный» раствор использовали для построения калибровочных кривых, по которым определяли относительный уровень кДНК для целевых генов и гена домашнего хозяйства в экспериментальных образцах.

2.10. Полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad). В качестве эндогенного контроля использовали «ген домашнего хозяйства» *Rpl30*. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала стандартный буфер для ПЦР (67 mM трис-HCl с pH 8.9, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween20, 10mM β-меркаптоэтанол), 20 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, SYBR GreenI в разведении 1:20 000, праймеры (по 250 nM для Rpl30) и 0,2 ед. Hot-start Taq-полимеразы (СибЭнзим). Для определения оптимальной температуры отжига праймеров проводили ПЦР-РВ в градиенте температур. Реакцию проводили в следующих условиях: 3 мин - 95°C; 40 циклов: 20 сек - 95°C, 20 сек – (55) 60°C, 20 сек - 72°C. Для анализа продуктов реакции амплификации получали кривые плавления конечных продуктов ПЦР от 65°C до 95°C с инкрементом 0,5°C. Относительный уровень мРНК генов рассчитывали методом калибровочного графика (Nolan et al. 2006).

2.10.1. Праймеры для ПЦР-РВ

Праймеры для ПЦР-РВ были подобраны с помощью ресурса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) с целью амплификации продукта

размером 100-200 п.н. Праймеры к *Rpl30* подобраны Федосеевой Л.А., праймеры к *Txn1* взяты из (Lappalainen et al. 2009). Для отслеживания контаминации образцов кДНК геномной ДНК прямой и обратный праймеры подбирали комплементарными смежным экзонам так, чтобы границы сплайсинга интрона находились в конечном продукте ПЦР (*табл. 1*).

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ.

| Ген | Праймеры | Длина продукта | Идентификатор |
|---------------|---|----------------|----------------|
| <i>Acadm</i> | f: agtgtcgagcacaacacaca r: ggcgaccgggattatttct | 137 | NM_016986.2 |
| <i>Crabp1</i> | f: aagacatccactacggtgcg r: agctctcgggtccagtaagt | 182 | NM_001105716.1 |
| <i>Crb1</i> | f: gcacctgccataaagacct r: ccattgtggcaagggctaga | 112 | NM_001107182.1 |
| <i>Cryab</i> | f: tgaacctggacgtgaagcac r: gactccatccgatgacaggg | 197 | NM_012935.3 |
| <i>Cryba2</i> | f: gacttcaggacagcagtt r: cccctcaaacagggtcacac | 156 | NM_173140.1 |
| <i>Crygb</i> | f: tgctctatgagcgaccaac r: cctcattctgtaagtccccga | 146 | NM_001109875.1 |
| <i>Crygd</i> | f: ggctgccagtacttctctcg r: tggaatcggctctggagagag | 194 | NM_033095.1 |
| <i>Crygs</i> | f: tctcagtagtgcgaggagtc r: ggtacgagcgggaagtctacg | 135 | NM_001109553.1 |
| <i>Dio1</i> | f: gtggtggacacaatgcagaac r: ggattgtagttccaagggccca | 122 | NM_021653.3 |
| <i>Lgsn</i> | f: acactcgggacaatgctcag r: acggggcatgaaaactccat | 197 | NM_181383.2 |
| <i>Lig4</i> | f: ttcggctggactgggatttac r: gagcacaagtctgcaaaggg | 123 | NM_001106095.1 |
| <i>Lim2</i> | f: gatcctgtctgccctgtgtg r: gccgaggaaactaacgggtga | 181 | NM_053771.1 |
| <i>Nos2</i> | f: tgggctggaagccccgctat r: ggcaggcagcgcataccact | 176 | NM_012611.3 |
| <i>Rpl30</i> | f: catcttggcgtctgatcttg r: tcagagtctgtttgtacccc | 158 | NM_022699.3 |
| <i>Txn1</i> | f: ttccttgaagtagacgtggatgac r: agagaactccccaaccttttgac | 111 | NM_053800.3 |
| <i>Pcdh21</i> | f: cagctttgacccagcacta r: tcggagatgctgatgatggc | 123 | NM_053572.1 |

2.11. Выделение белка

Замороженные образцы тканей гомогенизировали в лизирующем буфере RIPA (50 mM трис-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1% дезоксихолата натрия; 0,1%

SDS; 1 mM ЭДТА) с добавлением смеси ингибиторов протеаз (P8340, Sigma-Aldrich). После выдерживания в течение 20 минут на льду образцы центрифугировали при 12 000 об/мин при температуре 4°C в течение 30 минут, после чего супернатант был перенесён в новые пробирки. Общее содержание белка измеряли методом Бредфорда (Bio-Rad Laboratories Kit). Образцы хранили при -20°C.

2.12. Содержание амилоидного пептида A β 42 в сетчатке крыс

Эксперимент выполнен на крысах OXYS и Вистар в возрасте 3, 13 и 23 месяцев по 10 животных обеих линий в каждой возрастной группе. Содержание амилоидного пептида A β оценивали иммуноферментным анализом (ИФА), используя набор human/rat A β (1-42) ELISA kit Wako (Wako Pure Chemical Industries), согласно протоколу производителя.

2.13. Содержание белка Cryab в сетчатке крыс

Эксперимент выполнен на крысах OXYS и Вистар в возрасте 3 месяцев (n=4). Содержание белка Cryab в сетчатке крыс оценивали с помощью вестерн блот анализа. Образцы белка смешивали с 5X буфером для загрузки (10% SDS; 15% β -меркаптоэтанол; 50% глицерин; 0.3M трис-HCl pH 6.8; бром-феноловый синий), нагревали 5 минут при 95°C и наносили на дорожки полиакриламидного геля (12% разделяющий, 5% концентрирующий) в трис-глициновом буфере (25 mM Трис; 190 mM глицин; 0,1% SDS). После переноса на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-CExtra, Amersham) блокировали 5% обезжиренным молоком в PBST (0,01M фосфатно-солевой буфер с 0,1% Tween20). Далее мембраны инкубировали в течение 1 часа с первичными поликлональными антителами против Cryab (1:1000, Abcam, США) и бета-актина (β -Actin) (1:2000, Abcam, США) в 5% обезжиренном молоке в растворе PBST при комнатной температуре. После 3 отмывок в PBS проводили инкубацию с вторичными антителами (1:2000, Abcam, США) в 5% обезжиренном молоке в PBST в течение 30 минут при комнатной температуре. После 2 отмывок на мембраны наносился ECL-реагент. Хемифлуоресцентное излучение детектировали с использованием рентгеновской плёнки. Интенсивность излучения бендов измерялась с помощью программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.14. Иммунофлуоресцентная микроскопия

Эксперимент выполнен на крысах OXYS и Вистар в возрасте 3 и 18 месяцев (n=3). Работа выполнена в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

2.14.1. Приготовление препаратов

Глаза с надсечкой фиксировали 2 часа в 4% параформальдегиде в PBS (0,01 М фосфатно-солевой буфер) и проводили по растворам сахарозы в PBS восходящей концентрации 10%, 20%, 30%. Фиксированную заднюю часть глаза заключали в криогель Killik (Bio-Optica) и замораживали при -70°C. На криотоме при -20°C готовили срезы сетчатки толщиной 14 мкм. Срезы помещали на полилизинные стекла. Препараты отмывали в PBS, пермебиализовали 15 мин в 0,2% Triton X100 в PBS. Блокировали 1 час в 1% БСА, 0,2% Tween на PBS, инкубировали ночь с поликлональными антителами кролика против амилоидного пептида A β 42 (1:50, Abcam) при +4°C. Затем отмывали 2 раза в PBS и инкубировали 1 час с вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентной меткой DyLight 650 (1:100, Abcam). Препараты отмывали 2 раза в PBS и монтировали в растворе Fluoroshield с красителем DAPI (Abcam).

2.14.2. Анализ и обработка изображений

Препараты анализировали на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Zeiss, Germany). При проведении лазерной сканирующей микроскопии использовали режим multitrack (последовательное сканирование при раздельном возбуждении флуорохромов лазерами с разной длиной волны). Флуоресценция DAPI регистрировалась в диапазоне эмиссии 410-516 нм при возбуждении лазером 405 нм, специфический сигнал A β 42 регистрировался в диапазоне от 637-707 нм при возбуждении 633 нм.

2.15. Статистический анализ

Статистические расчёты производились с использованием пакета программ StatSoft Statistica 6.0 для Windows. Полученные данные были проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с post-hoc сравнением групповых средних в тесте Ньюмена-Кейлса. Как независимые факторы рассматривали генотип (Вистар или OXYS) и возраст (3 и 18 месяцев). Результаты анализа ДНК-микрочипов оценивали, используя непараметрический U-тест Манна-Уитни. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ заболеваемости конгенных линий WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 ретинопатией

Ранее методом QTL-анализа (Korbolina et al. 2012) были выявлены 2 локуса 1-й хромосомы, ассоциированных с развитием у крыс OXYS катаракты, ретинопатии и поведенческих проявлений ускоренного старения мозга. Следовательно, эти участки могут рассматриваться как главные районы для поиска генов-кандидатов комплекса признаков преждевременного старения крыс OXYS. Первый локус соответствует интервалу между микросателлитными маркерами D1Rat30 и D1Rat219 (100,6–188,0 Mb), второй - между D1Rat219 и D1Rat81 (188,0–250,4 Mb) 1-й хромосомы. Эти локусы были перенесены возвратными скрещиваниями (8 бэккросс поколений) в геном крыс инбредной линии WAG и, таким образом, были получены 2 конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, каждая из которых несёт по одному из выявленных локусов QTL крыс OXYS. Проявление признака у животных конгенной линии служит доказательством влияния локусов QTL на развитие признака у родительской линии (Schauwecker P.E. 2011, Nadeau et al. 2000). На первом этапе работы была поставлена задача охарактеризовать конгенные линии по заболеваемости ретинопатией.

Согласно результатам офтальмоскопических осмотров, у крыс конгенных линий проявляются признаки ретинопатии, однако клиническая картина отличается от таковой у крыс OXYS – донора локусов QTL (*рис. 4*). В возрасте 1,5 месяцев у 11% крысят линии WAG/OXYS-1.1 регистрируются признаки 1-й стадии ретинопатии. К 3 месяцам заболеваемость ретинопатией у крыс WAG/OXYS-1.1 достигает 55%. Эти значения вдвое ниже, чем у крыс OXYS. У животных конгенной линии WAG/OXYS-1.2 в возрасте 1,5 месяцев ретинопатия 1-й стадии была выявлена в 41% глаз, к 3 месяцам ею были поражены 97% глаз. С возрастом ретинопатия у животных обеих конгенных линий не прогрессировала: случаи 2-й стадии ретинопатии выявлялись редко. Для сравнения: 100% крыс OXYS в возрасте 3 месяцев имеют патологические изменения глазного дна, при этом у 25% животных этого возраста регистрируется 2-я стадия заболевания (Markovets et al. 2011). С возрастом процент животных со 2-й стадией растёт: к 12 месяцам у 57% животных обнаруживается 2-я стадия, а у 12% - 3-я стадия ретинопатии (Марковец А.М. 2011). У крыс WAG признаки ретинопатии не обнаруживаются (Korbolina et al. 2012).

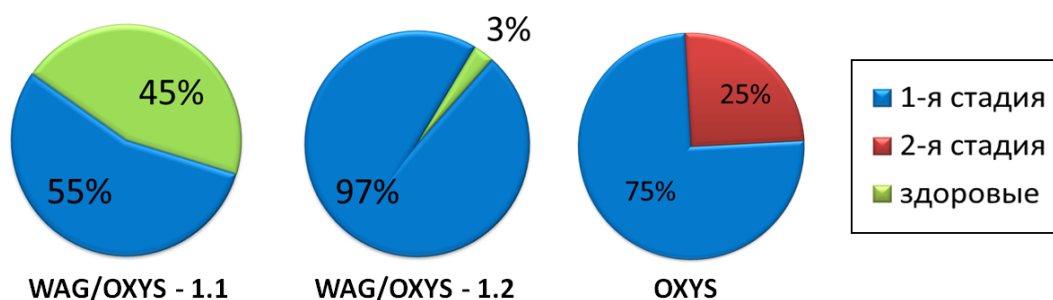


Рисунок 4. Распределение глаз крыс конгенных линий по стадиям ретинопатии в возрасте 3 месяцев. Данные представлены как процент глаз с соответствующей стадией заболевания. Стадии ретинопатии соответствуют стадиям ВМД по международной классификации AREDS (Age-Related Eye Disease Study grade protocol).

Таким образом, клинически ретинопатия развивается у крыс обеих конгенных линий, но только у конгенной линии WAG/OXYS-1.2 выраженность патологических изменений сетчатки в возрасте 3 месяцев сопоставима с линией-донором QTL, крысами OXYS. Поэтому крысы WAG/OXYS-1.2 были выбраны для дальнейшего анализа.

Гистологическое исследование показало, что, у крыс WAG/OXYS-1.2 развитие ретинопатии происходит с преимущественным повреждением ганглионарного, внутреннего ядерного слоев и интравитреальных сосудов, в отличие от крыс OXYS, у которых поражаются в первую очередь клетки РПЭ и сосуды хориоидеи (*рис. 5*). В интравитреальных сосудах были выявлены признаки нарушения микроциркуляции - явления сладжа и тромбоза. Появление во внутреннем ядерном слое сетчатки большого количества гиперхромных и пикноморфных ассоциативных нейронов указывает на развитие нейродегенеративных изменений. Во внутреннем ядерном слое также были выявлены отеки склеральных отростков радиальных глиоцитов. Дистрофические изменения сетчатки происходят у крыс конгенной линии на фоне массовой миграции во внутренний сетчатый и ганглионарный слои пришлых клеток – лимфоцитов и мононуклеарных фагоцитов, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса – адекватной реакции на структурно-функциональные изменения. Это отличает крыс WAG/OXYS-1.2 от крыс OXYS, для которых массовая миграция пришлых клеток во внутренние слои сетчатки не характерна.

В совокупности по результатам офтальмологических осмотров и гистологического исследования, можно заключить, что у конгенных животных проявляется ряд признаков ретинопатии крыс OXYS, свидетельствующих в пользу участия локусов 1-й хромосомы QTL1 (D1Rat30 - D1Rat219) и QTL2 (D1Rat219 - D1Rat81) в патогенезе заболевания.

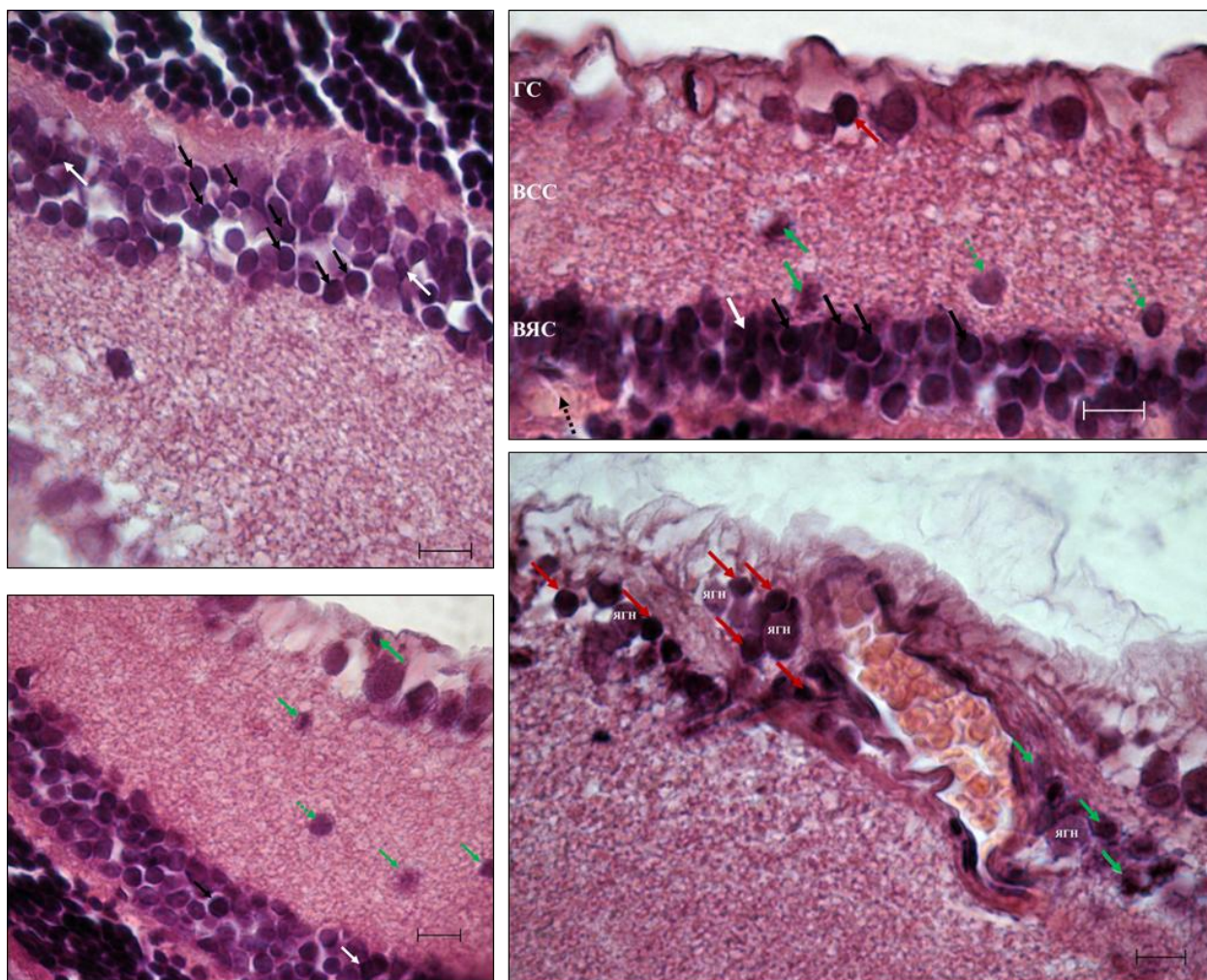


Рисунок 5. Сетчатка крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2. Гиперхромные и пикноморфные ассоциативные нейроны (черные стрелки). Гиперхромные и пикноморфные радиальные глиоциты (белые стрелки). Миграция мононуклеарных фагоцитов во внутренний сетчатый и ганглионарный слой (зеленые стрелки). Миграция перикарионов ассоциативных нейронов (зеленые пунктирные стрелки). Тромбированный сосуд в наружном сетчатом слое (черная пунктирная стрелка). Стаз и сладж форменных элементов в интратетинальном сосуде. Лимфоцитарная инфильтрация в ганглионарном слое (красные стрелки). ГС – ганглионарный слой; ВСС – внутренний сетчатый слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ЯГН – ядро ганглионарного нейрона. Масштаб – 10 мкм.

3.2. Функциональная аннотация локусов QTL, ассоциированных с развитием признаков преждевременного старения у крыс OXYS

На сегодняшний день не существует универсального молекулярно-генетического экспресс-метода для выбора гена или генов, ответственных за развитие сложных, комплексных заболеваний. Интервалы ДНК, связанные с локусами QTL, как правило, охватывают сотни генов-кандидатов, которые могут определять предрасположенность к заболеванию или быть ассоциированы с его патогенезом (Huang et al. 2008). В районе

1-й хромосомы между микросателлитами D1Rat30 и D1Rat81, охватывающем оба локуса QTL, ассоциированных с признаками преждевременного старения крыс OXYS, обнаруживается около 2000 генов (по данным RGD database, 2013), каждый из которых можно рассматривать как потенциальный ген-кандидат. Более того, возможен вариант, когда комбинированное действие нескольких генов из локуса QTL приводит к исследуемому фенотипу (Huang et al. 2008).

Поэтому мы провели анализ генных онтологий (Gene Ontology) для оценки представленности генов из локусов QTL 1-й хромосомы по биологическим процессам (biological processes) и метаболическим путям (pathways) с помощью биоинформационных систем DAVID (Huang et al. 2009) и PANTHER (Mi et al. 2005), соответственно. Были использованы только категории с уровнем значимости $p < 0,05$. Анализ показал, что локусы QTL 1-й хромосомы обогащены генами, продукты которых участвуют в процессах (термины Gene Ontology): «сигнальная трансдукция», «процессы нервной системы», «зрение», «липидный обмен», «апоптоз», «дыхательная электронно-транспортная цепь» и «ионный транспорт» (*рис. 6*). Значимые метаболические пути приведены на *рисунке 7*. Из метаболических путей наиболее значимым было обогащение для фосфоинозитол-3-киназного (PI3 kinase) пути, играющего ключевую роль в процессах пролиферации, дифференцировки и гибели клеток, а также процессов клеточного старения. Следует отметить, что значимым было присутствие категорий метаболических путей, вовлеченных в патогенез болезни Альцгеймера. Как показал анализ литературы, изменения экспрессии многих генов QTL района ассоциированы с развитием нейродегенеративных процессов.

В целом, результаты функционального анализа локусов QTL 1-й хромосомы, ассоциированных с развитием ретинопатии, катаракты и признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS, показали их обогащение генами, связанными с нейродегенерацией.

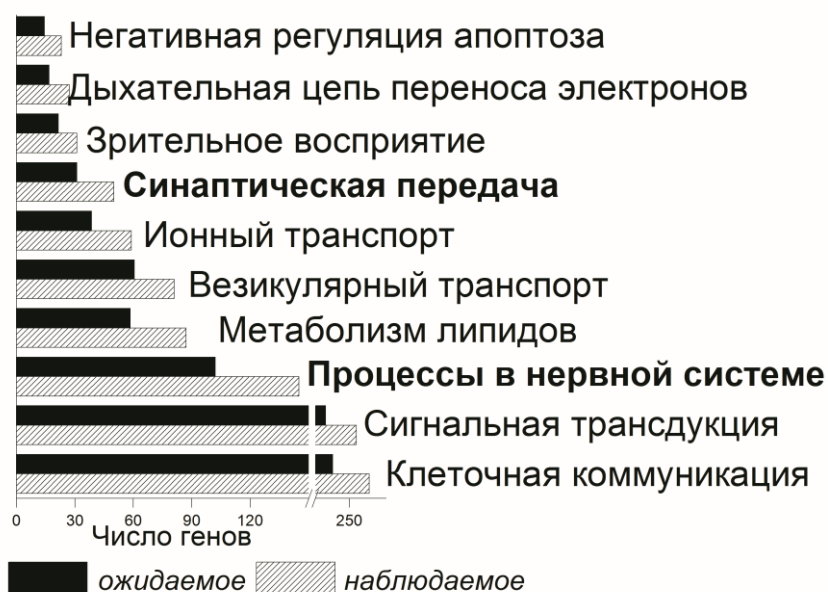


Рисунок 6. Обогащенность генов из локусов QTL 1-й хромосомы категориями генных онтологий биологических процессов ($p < 0,05$).

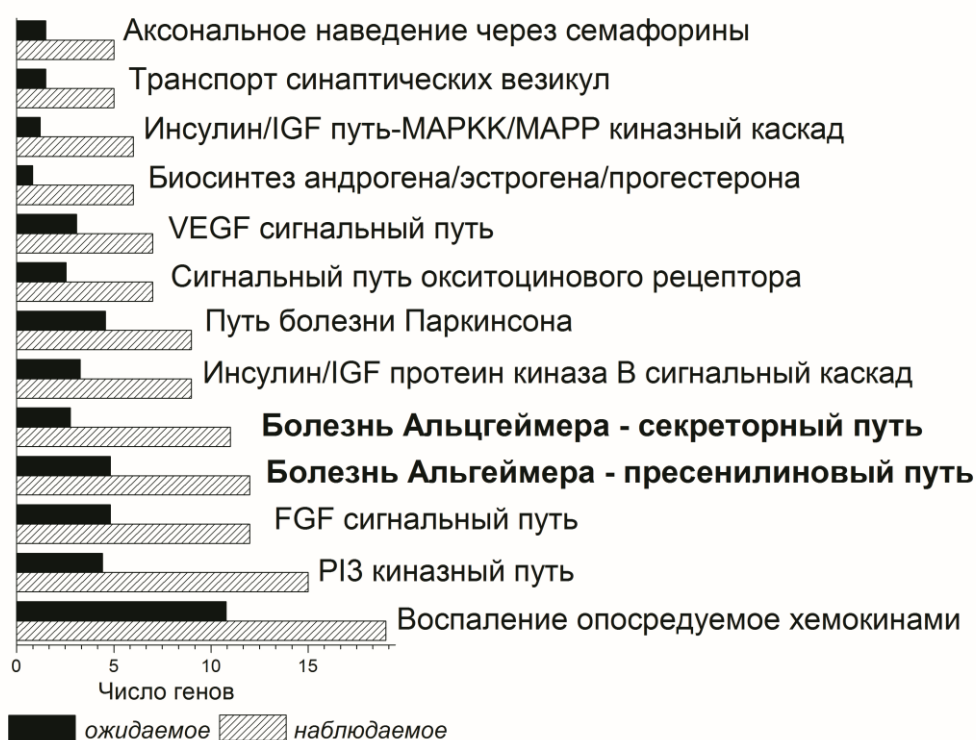


Рисунок 7. Обогащенность генов из локусов QTL 1-й хромосомы категориями генных онтологий метаболические пути (pathways) ($p < 0,05$).

3.3. Отбор генов-кандидатов с использованием биоинформатических методик

На следующем этапе исследования были отобраны гены-кандидаты из локусов QTL для разработки целевого ДНК-микрочипа. При выборе генов-кандидатов мы

руководствовались данными литературы об ассоциациях генов локусов QTL 1-й хромосомы с патогенезом возрастных нейродегенеративных заболеваний, а также использовали биоинформатический подход приоритизации генов с помощью программы Endeavour (www.esat.kuleuven.be/endeavour) (Aerts et al. 2006). Приоритизация генов – это их ранжирование в порядке вероятности участия в формировании заболевания для поиска кандидатов как моногенных, так и полигенных заболеваний, при помощи анализа сходства с генами, для которых уже установлена связь с заболеванием. Необходим опорный список генов, для которых твердо установлены ассоциации с заболеванием. В качестве опорного списка для ретинопатии мы использовали данные баз RETNET (<https://sph.uth.edu/retnet/>) и MESH (Medicine Medical Subject Headings, <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>). Программа сравнивает исследуемые гены с этим опорным списком, комбинируя данные из разных источников, таких, как Gene Ontology, EST expression, InterPro, KEGG и др., получая баллы с помощью биномиальной статистики. Для каждого источника информации выставаются баллы, которые суммируются, и строится рейтинговая таблица. Гены-кандидаты из верхней части таблицы были отобраны для дальнейшего анализа, при этом порог был выбран произвольно.

Используя этот алгоритм, из локусов QTL 1-й хромосомы мы отобрали 91 ген, дополнительно включив 21 ген, чье участие в нейродегенеративных процессах хорошо известно. Как показала функциональная аннотация генов-кандидатов в биоинформатической системе DAVID, гены, отобранные на ДНК-микрочип, кластеризуются в следующие основные группы: 1) Enrichment Score 4.37: передача нервного импульса, межклеточный сигналинг, обучение и память, синаптический комплекс; 2) Enrichment Score 3.82: ответ на стресс, ответ на гипоксию, ответ на уровень кислорода, регуляция клеточной смерти, апоптоз; 3) Enrichment Score 3.09: ремоделирование ткани, морфогенез кровеносных сосудов, ангиогенез.

По данным базы экспрессионных профилей GEO Profiles (Gene Expression Omnibus), к моменту начала экспериментов для 8 генов (*Best1*, *Hif1an*, *Hpse2*, *Myo7a*, *Nipa1*, *Pax2*, *Pde6c*, *Tll2*) не было данных по экспрессии в сетчатке у крыс, а для гена *Hpse2* не было данных по экспрессии в сетчатке также у мышей и у человека.

Таким образом, на основе анализа литературы и подхода приоритизации генов, на целевой ДНК-микрочип были отобраны гены-кандидаты, являющиеся маркерами патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

3.4. Определение статуса экспрессии генов-кандидатов методом анализа ДНК-микрочипов

Использование олигонуклеотидных микрочипов позволяет различать высокоомологичные гены из одного семейства, учитывать эффекты неспецифического связывания. Показано, что олигонуклеотидные микрочипы обладают хорошей воспроизводимостью результатов в разных условиях гибридизации (Hughes et al. 2001, Murphy et al. 2002, Wang et al. 2006). Чувствительность 60-мерных олигонуклеотидных зондов в 2-8 раз выше по сравнению с 25-мерными зондами (Relógio et al. 2002). Для 112 генов-кандидатов мы разработали ДНК-микрочип. Каждому гену на микрочипе соответствует 60-звенный олигонуклеотидный зонд на 3' конец мРНК в 4 повторах.

Анализ результатов показал, что большинство зондов на целевом ДНК-микрочипе гибридизуется с мишенями кДНК сетчатки на уровне, детектируемом светочувствительностью сканера (значение интенсивности спота более 1000 ед.) (**рис. 8**). Зонд для гена *Vegfb* достигал насыщения значительно быстрее всех остальных зондов (значение интенсивности спота более 65000 ед.). Поэтому сканирование проводили в нескольких режимах. При значении фотоумножителя PMT Gain 55 сканировали микрочипы для генов с высоким уровнем флуоресценции, когда значение интенсивности сигнала зондов не достигает порога насыщения. Для генов с низким уровнем флуоресценции сканирование проводили в режиме PMT Gain 75. При этом учитывали фоновую светимость микрочипа и наличие артефактов. Корреляция между интенсивностями сигналов четырех спотов, представляющих один и тот же зонд на одной подложке, превышала 95%. Низкая флуоресценция обнаружена для зондов к генам *Ak3*, *Arnt2*, *Cntf*, *Fgfbp3*, *Fzd4*, *Gabra5* и *Pax2*. С учетом неспецифической гибридизации можно полагать, что эти гены либо не детектируются разработанными ДНК-микрочипами, либо экспрессируются на низком уровне в сетчатке крыс.

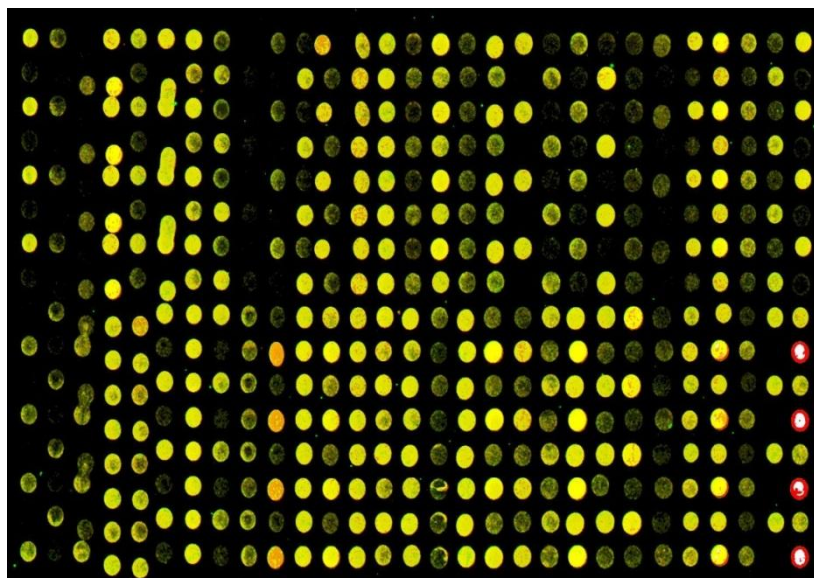


Рисунок 8. Сканированное изображение ДНК-микрочипа после двухканальной гибридизации.

Для проверки адекватности разработанных ДНК-микрочипов, была проведена гибридизация с меченой кДНК библиотекой гиппокампа. Проверка показала, что большинство отобранных генов-кандидатов экспрессируются в гиппокампе. Полученные паттерны гибридизации были тканеспецифичными. Например, сигнал для мишени гена *Rom1*, экспрессирующегося исключительно в фоторецепторах, не обнаруживался при гибридизации с кДНК гиппокампа (*рис. 9*). Этот тест свидетельствует, что разработанные микрочипы могут использоваться для определения статуса экспрессии отобранных генов в сетчатке и в мозге.

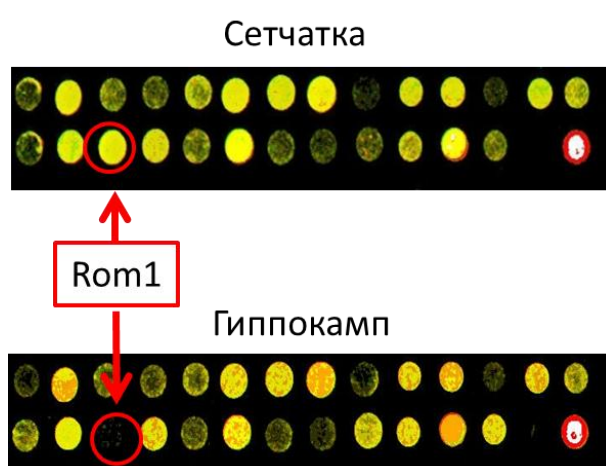


Рисунок 9. Тканеспецифичная гибридизация на ДНК-микрочипе. Показан фрагмент ДНК-микрочипа. Ген *Rom1* не экспрессируется в гиппокампе.

Анализ гибридизации с ДНК-микрочипами выявил небольшие (от 20 до 50%), но значимые ($p < 0,02$) различия между крысами OXYS и Вистар в степени гибридизации мишеней 14 генов, 10 из которых - из локусов QTL (*рис.10*).

В их числе - гены *Picalm* и *Arpa2*, продукты которых участвуют в процессинге белка-предшественника амилоида APP и ассоциированы с болезнью Альцгеймера. Белок *Picalm* принадлежит семейству фосфоинозитол-связывающих клатриновых белков, играющих ключевую роль в эндоцитозе. И сверхэкспрессия, и недостаток экспрессии гена *Picalm* нарушают правильное течение эндоцитоза, играющего важную роль в нервной системе (Baig et al. 2010). Исследования ПГАА выявили значимые ассоциации SNP вариантов гена *Picalm* с болезнью Альцгеймера (rs3851179, $P = 1.9 \times 10^{-8}$) (Harold et al. 2009, Liu et al. 2013). Так как процессинг APP сопровождается эндоцитозом, предполагается, что *Picalm* опосредованно через эндоцитоз может регулировать уровень Аβ. *Arpa2* - нейрональный адаптерный белок, который взаимодействует с APP. Связываясь с APP, он его стабилизирует, тем самым ингибируя продукцию протеолитических фрагментов (Saito et al. 2008). Митохондриальные гены *Vdac1* и *Ndufv1* с измененной степенью гибридизации у крыс OXYS также тесно связаны с болезнью Альцгеймера (Liang et al. 2008, Nur et al. 2012). В совокупности эти результаты и данные функциональной аннотации QTL локусов позволяют предположить, что метаболический путь болезни Альцгеймера участвует в патогенезе ретинопатии крыс OXYS, аналогичной ВМД человека.

Анализ гибридизации с ДНК-микрочипами не выявил достоверных различий в степени гибридизации кДНК мишеней к зондам генов-кандидатов из локусов QTL в сетчатке конгенных крыс WAG/OXYS-1.2 ни от крыс OXYS, ни от Вистар. Их отсутствие может свидетельствовать о том, что уровень мРНК отобранных генов-кандидатов на развитие ретинопатии у конгенных крыс WAG/OXYS-1.2 не влияет.

Отметим, что хотя анализ ДНК-микрочипов не показал кратных межлинейных различий в уровне мРНК генов-кандидатов, однако нам удалось выявить с их помощью небольшие (20-60%) изменения степени гибридизации с зондами на ДНК-микрочипе генов, которые ассоциированы с болезнью Альгеймера.

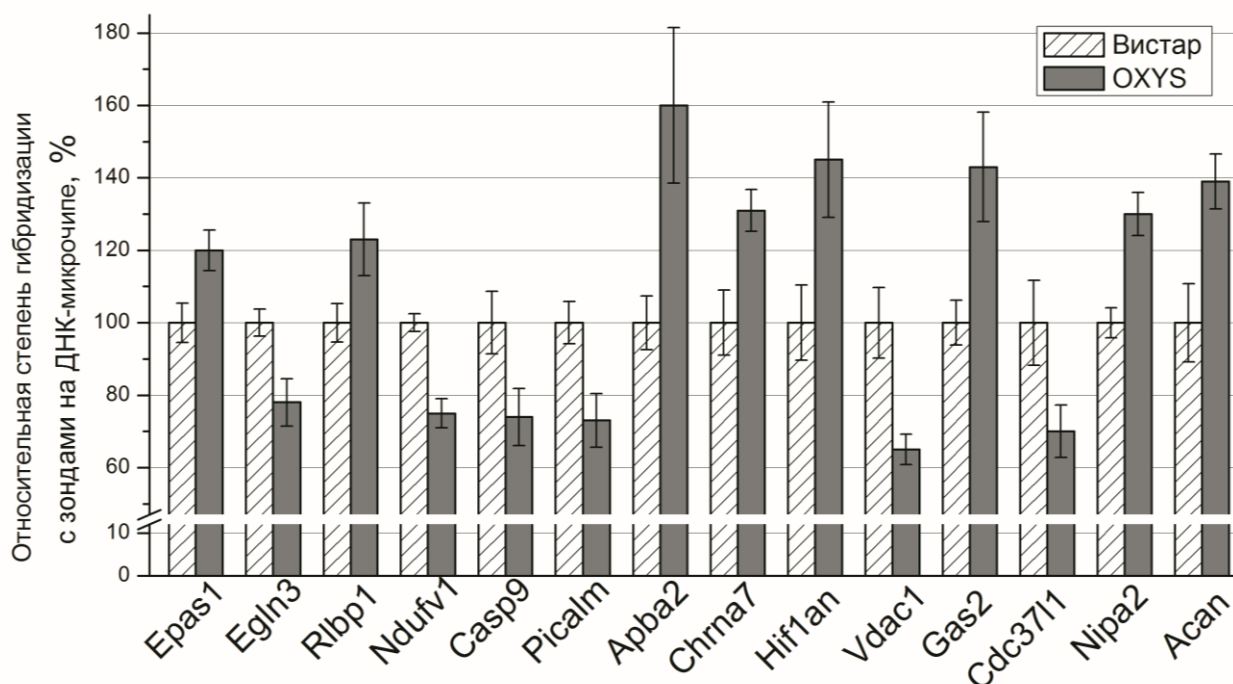


Рисунок 10. Гены-кандидаты крыс OXYS с измененной степенью гибридизации мишеней с зондами на разработанном ДНК-микрочипе по сравнению с крысами Вистар. За 100% взято значение крыс Вистар ($M \pm SE$, $p < 0,05$).

3.5. Анализ данных секвенирования транскриптома (RNA-seq)

Нами был проведен широкомасштабный анализ возрастных изменений транскрипционного профиля сетчатки крыс OXYS и Вистар методом массового параллельного секвенирования. Мы предположили, что сравнительный анализ транскриптомов сетчатки крыс, контрастных по признаку развития ретинопатии, позволит дифференцировать специфичные для ретинопатии молекулярные события и обычные возрастные изменения.

Из-за высокой стоимости экспериментов по секвенированию они, как правило, проводятся на малых выборках. Основной проблемой метода RNA-seq является ограничение применимости статистической модели (оценки распределения дисперсии), выбор которой влияет на достоверность результатов. В этой связи оптимальным представляется использование как минимум двух методов анализа дифференциальной экспрессии для учета эффектов искажения статистических моделей. Для оценки количества картированных прочтений (ридов) и анализа дифференциальной экспрессии было использовано два программных пакета, принципиально отличающихся способами вычисления количества транскриптов: Cufflinks/Cuffdiff и HTSeq/DESeq. Cufflinks на

основе прочтений собирает модель транскриптома с учетом всех возможных изоформ, реализуя доказательство теоремы Дилуорса. Количественной мерой экспрессии транскрипта для Cufflinks является значение FKPM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) - количество ридов, попавших на транскрипт, нормированное на его длину и общее количество фрагментов; для DESeq количественной мерой экспрессии гена является сумма всех однозначно выравненных прочтений, которые пересекаются с геном. Кроме того, методы используют разные статистические модели для оценки параметра дисперсии: DESeq - отрицательное биномиальное распределение, Cufflinks – распределение Пуассона.

При заданной глубине секвенирования установлено, что в сетчатке крыс экспрессируется около 15 300 генов. Максимальное количество ридов было 157 848 (DESeq) и 12 046 FKPM (Cufflinks). На *рисунке 11* представлено распределение количества прочтений по перцентилям. Присутствие высокопредставленных и редких транскриптов свидетельствует о том, что приготовление библиотек и методы картирования не привели к смещению результатов (Kandpal et al. 2012). Средние значения уровня экспрессии по всем детектированным генам были 322 рида и 43 FKPM.

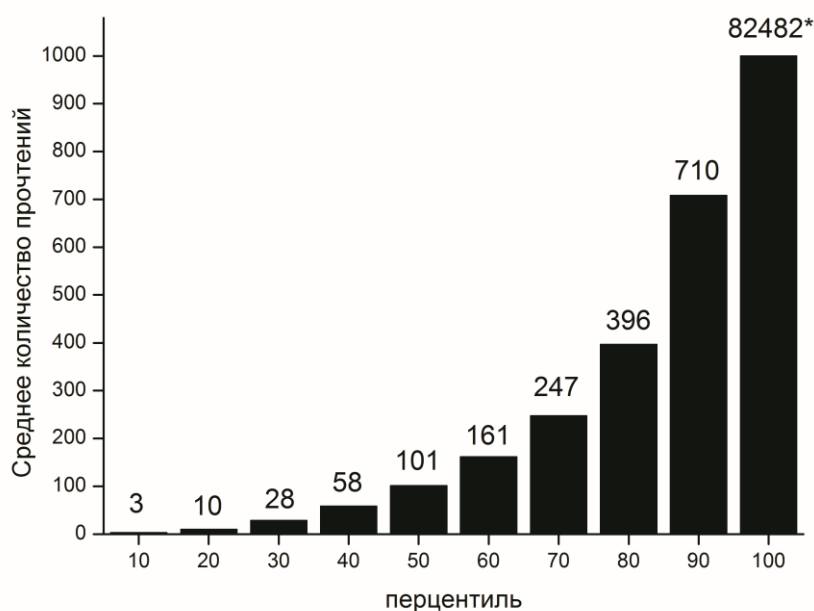


Рисунок 11. Распределение количества прочтений данных RNA-seq по перцентилям.

В **таблице 2** представлены 30 генов с наиболее высокой экспрессией в сетчатке крыс. Наиболее представленными транскриптами в сетчатке крыс были мРНК генов, кодирующих белки фоторецепторов, такие как *Gnat1*, *Rho* и *Sag*, что согласуется с данными RNA-seq сетчатки у мышей (Gamsiz et al. 2012).

Таблица 2. 30 генов с самой высокой экспрессией в сетчатке крыс.

| Ген | Название гена | Ensemble ID | Число ридов | Функция |
|---------------|--|---------------------|-------------|------------------------|
| <i>Rho</i> | Rhodopsin | ENSRNOG000000011144 | 152402 | Зрительное восприятие |
| <i>Gnat1</i> | Guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 1 | ENSRNOG000000017589 | 82482 | Зрительное восприятие |
| <i>Sag</i> | S-antigen; retina and pineal gland (arrestin) | ENSRNOG000000018185 | 50984 | Зрительное восприятие |
| <i>Gnb1</i> | Guanine nucleotide binding protein (g protein), beta polypeptide 1 | ENSRNOG000000016638 | 23089 | Сигнальная трансдукция |
| <i>Gngt1</i> | Guanine nucleotide binding protein (g protein), gamma transducing activity polypeptide 1 | ENSRNOG000000010546 | 18327 | Фототрансдукция |
| <i>Prph2</i> | Peripherin 2 | ENSRNOG000000033159 | 18108 | Зрительное восприятие |
| <i>Pdc</i> | Phosducin | ENSRNOG000000002517 | 16415 | Зрительное восприятие |
| <i>Pde6a</i> | Phosphodiesterase 6a, cgmp-specific, rod, alpha | ENSRNOG000000017816 | 15858 | Зрительное восприятие |
| <i>Aldoa</i> | Aldolase a, fructose-bisphosphate | ENSRNOG000000023647 | 15490 | Биосинтез АТФ |
| <i>Rom1</i> | Retinal outer segment membrane protein 1 | ENSRNOG000000019858 | 14685 | Зрительное восприятие |
| <i>Atp1a3</i> | Atpase, na+/k+ transporting, alpha 3 polypeptide | ENSRNOG000000020263 | 14672 | Ионный транспорт |
| <i>Pde6b</i> | Phosphodiesterase 6b, cgmp-specific, rod, beta | ENSRNOG000000000065 | 13547 | Зрительное восприятие |
| <i>Atp1b2</i> | Atpase, na+/k+ transporting, beta 2 polypeptide | ENSRNOG000000011227 | 11928 | Ионный транспорт |
| <i>Clstn1</i> | Calsyntenin 1 | ENSRNOG000000016398 | 10959 | Клеточная адгезия |
| <i>Pcdh21</i> | Protocadherin 21 | ENSRNOG000000013330 | 10936 | Зрительное восприятие |
| <i>Rbp3</i> | Retinol binding protein 3, interstitial | ENSRNOG000000020265 | 10919 | Развитие глаза |
| <i>Dkk3</i> | Dickkopf homolog 3 (xenopus laevis) | ENSRNOG000000016343 | 9949 | Сигнальная трансдукция |

Продолжение *таблицы 2.*

| | | | | |
|-------------------|---|----------------------|------|--------------------------------------|
| <i>Calm1</i> | Calmodulin 1 | ENSRNOG000000004060 | 9913 | Связывание ионов кальция |
| <i>Agpat3</i> | 1-acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 3 | ENSRNOG000000001205 | 9706 | Биосинтез фосфолипидов |
| <i>Ddx5</i> | Dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 5 | ENSRNOG0000000030680 | 9289 | Связывание АТФ |
| <i>Atp5b</i> | Atp synthase, h+ transporting, mitochondrial f1 complex, beta polypeptide | ENSRNOG000000002840 | 9188 | Окислительное фосфорилирование |
| <i>Krt12</i> | Keratin 12 | ENSRNOG0000000011986 | 9175 | Промежуточный филамент цитоскелета |
| <i>Syp</i> | Synaptophysin | ENSRNOG0000000010223 | 9162 | Синаптическая передача |
| <i>Tulp1</i> | Tubby like protein 1 | ENSRNOG000000000507 | 9101 | Фототрансдукция |
| <i>Slc17a7</i> | Solute carrier family 17 , member 7 | ENSRNOG0000000020650 | 8720 | Синаптическая передача |
| <i>Hsp90aa1</i> | Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class a member 1 | ENSRNOG0000000007219 | 8604 | Укладка белков |
| <i>D4abp8_rat</i> | Retinitis pigmentosa 1 homolog (human) | ENSRNOG0000000008807 | 8508 | Зрительное восприятие |
| <i>Abca4</i> | Atp-binding cassette, sub-family a (abc1), member 4 | ENSRNOG0000000012892 | 8310 | Зрительное восприятие |
| <i>Stxbp1</i> | Syntaxin binding protein 1 | ENSRNOG0000000015420 | 8279 | Внутриклеточный транспорт и секреция |
| <i>Aipl1</i> | Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 | ENSRNOG0000000007889 | 8097 | Фототрансдукция |

Используя 90й, 50й и 10й перцентиль количества прочтений, мы условно разделили данные RNA-seq на 3 группы: гены с высокой экспрессией (>90 перц.), гены со средней экспрессией (50-90 перц.) и с низкой экспрессией (10-50 перц.). Результаты анализа представленности биологических путей в группах с высокой, средней и низкой экспрессией по базе данных KEGG и Gene Ontology: biological process отражены в *таблице 3.*

Для того чтобы описать индивидуальные различия в экспрессии генов между всеми образцами сетчатки крыс, мы рассчитали коэффициент вариации для каждого картированного гена и выделили группы генов с высоким (>90 перц) и низким (<10

перц) коэффициентом вариации (**табл.3**). Группа генов с высоким коэффициентом вариации была обогащена генами иммунного ответа, липидного транспорта и структурных компонентов хрусталика ($BX < 10^{-3}$). В группе с низким коэффициентом вариации значимо были представлены гены, участвующие в процессинге мРНК и апоптозе ($BX < 10^{-6}$), что может свидетельствовать о жесткой транскрипционной регуляции этих клеточных процессов.

Таблица 3. Обогащение по терминам генных онтологий баз данных KEGG и Gene Ontology: biological process для групп генов с разным уровнем экспрессии в сетчатке крыс Вистар и OXYS. В скобках указан уровень значимости с поправкой БХ.

| | Уровень экспрессии | | |
|-----------------------------------|--|--|--|
| | «Высокий» (>90 перц.) | «Средний» (50-90 перц.) | «Низкий» (10-50 перц.) |
| KEGG | Рибосома ($<10^{-19}$) Окислительное фосфорилирование ($<10^{-8}$) Сплайсосома ($<10^{-6}$) | МАРК сигнальный путь ($<10^{-8}$) Фокальная адгезия ($<10^{-7}$) Убиквитин зависимый протеолиз ($<10^{-7}$) Сигнальный путь нейротрофина ($<10^{-5}$) | Взаимодействие нейроактивный лиганд - рецептор ($<10^{-9}$) Сигнальный путь кальция ($<10^{-3}$) Взаимодействие цитокин-цитокинный рецептор ($<10^{-3}$) |
| Gene Ontology: biological process | Элонгация трансляции ($<10^{-17}$) Процессинг мРНК ($<10^{-13}$) Биосинтез АТФ ($<10^{-8}$) Везикулярный транспорт ($<10^{-9}$) | Транспорт белков ($<10^{-19}$), Транскрипция ($<10^{-16}$) Катаболизм белков (10^{-13}) Клеточный ответ на стресс ($<10^{-10}$) | Иммунный ответ ($<10^{-14}$) Регуляция клеточной пролиферации ($<10^{-9}$) Ионный транспорт ($<10^{-9}$) Защитная реакция ($<10^{-7}$) |

Функциональный анализ обогащения терминами генных онтологий мажорных фракций транскриптома показал, что в сетчатке крыс на высоком уровне экспрессируются гены, ассоциированные с окислительным фосфорилированием, синтезом АТФ и белка, что согласуется с тем, что по уровню метаболизма сетчатка - наиболее активная и энергоемкая ткань в организме. Вследствие высокой метаболической активности, воздействия света и высокого напряжения кислорода вероятность развития в сетчатке окислительного стресса повышена, не удивительно, что среди генов с самой высокой экспрессией в сетчатке крыс представлены «неструктурные» гены *Dkk3* и *Hsp90aa1*, кодирующие белки с защитной функцией (**табл. 2**).

Корреляционный анализ показал наличие отрицательной связи между коэффициентом вариации и уровнем экспрессии гена ($r=-0,527$, $p<0,05$). Выявленная корреляция показывает, что низкокопийные гены имеют тенденцию к высокой вариабельности, тогда как высококопийные гены имеют более стабильную экспрессию.

Кластерный анализ профилей экспрессии 12 образцов сетчатки крыс показал разделение данных на две группы, соответствующих линиям OXYS и Вистар. Группы по возрастам 3 и 18 месяцев четко разделились для крыс Вистар, в отличие от крыс OXYS, у которых наблюдалась бóльшая вариабельность профиля экспрессии. Наиболее вариабельной была группа 18-месячных крыс OXYS: один образец отличался от всех остальных образцов как крыс OXYS, так и Вистар (*рис. 12*). Можно полагать, это обусловлено разным характером прогрессии ретинопатии.

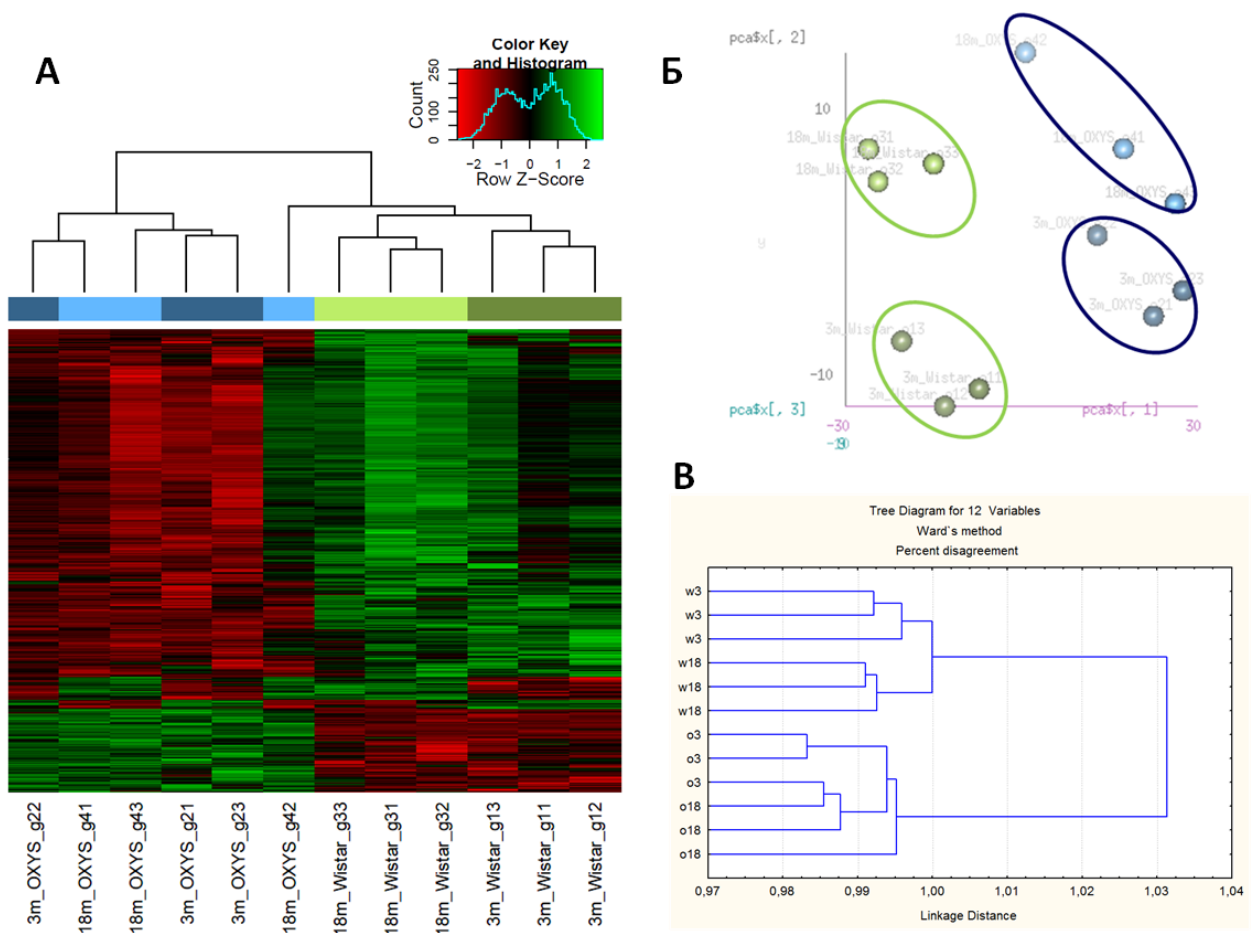


Рисунок 12. Кластерный анализ данных RNA-seq. А) Тепловая матрица (HeatMap). Большинство ДЭ генов проявляют сниженную экспрессию (красный цвет) у крыс OXYS. Б) Кластеризация методом главных компонент (Principal component analysis). В) Кластеризация с помощью алгоритма Ward (Statistica 6.0). Выделяются два основных кластера, соответствующие линиям крыс OXYS и Вистар. Наиболее вариабельной является группа 18-месячных крыс OXYS.

Количество ДЭ генов существенно зависело от использованного метода анализа (*табл. 4*). При консервативном уровне значимости, с поправкой на множественные сравнения ($p < 0,05$), перекрытие списков ДЭ генов между Cufflinks и DESeq составило 40%. Такой результат обусловлен разницей в параметрах статистических моделей методов, потому что после снижения порога значимости для каждого метода ($p < 0,01$, без поправки на множественные сравнения) перекрытие достигло 70%. Поэтому для дальнейшего анализа мы убрали поправку на множественные сравнения и комбинировали списки ДЭ генов обоих методов, опираясь на аналогичную стратегию в работе Newman с соавт. (2012). Списки генов, определенных как дифференциально экспрессирующиеся в 3 и 18 месяцев обоими методами при уровне значимости $p < 0,05$ с поправкой на множественные сравнения приведены в **приложении 2**.

Таблица 4. Количество дифференциально экспрессирующихся генов в сетчатке крыс OXYS, определяемых методами DESeq и Cufflinks с уровнем значимости $p < 0,05$ с поправкой на множественные сравнения.

| | Cufflinks | DESeq | Общих между методами | |
|------------|------------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 3 месяцев | 162 | 137 | 53 | } 17 общих между возрастaми |
| 18 месяцев | 251 | 100 | 46 | |

Межлинейные различия

Анализ результатов показал межлинейные различия в экспрессии нескольких сотен генов (*табл. 5*). Было выявлено 494 гена, экспрессия которых была изменена у крыс OXYS в возрасте 3 месяцев по сравнению с одновозрастными крысами Вистар, из них 388 со сниженной и 106 с повышенной экспрессией. При этом количество генов с экспрессией, измененной более чем в 2 раза, составило 331 ген. С возрастом количество генов, по-разному экспрессирующихся в сетчатке крыс OXYS и Вистар, практически не изменялось. Так, в возрасте 18 месяцев было выявлено 430 генов с измененной экспрессией, из них 329 со сниженной и 101 с повышенной экспрессией. Экспрессия 282 генов была изменена более чем в 2 раза для этого возраста.

Как видно из графика тепловой матрицы (*рис. 12а*) и диаграммы Венна (*рис. 13а*), и в 3, и в 18 месяцев для большинства генов (~70%) с измененной экспрессией в сетчатке крыс OXYS характерно снижение уровня мРНК. Примерно 40% (189) генов с межлинейной разницей по экспрессии перекрываются между возрастными группами.

Таблица 5. Количество генов, дифференциально экспрессирующихся в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в возрасте 3 и 18 месяцев из комбинированного списка ($p < 0,01$, без поправки на множественные сравнения). Стрелки обозначают повышение (\uparrow) и снижение (\downarrow) уровня мРНК.

| Возраст, в месяцах | Количество ДЭ генов между крысами OXYS и Вистар (межлинейные различия) | | Линия | Количество ДЭ генов с возрастом, между 3 и 18 месяцами | |
|--------------------|--|---|--------|--|---------------------------------------|
| | Всего | в 2 и более раз | | Всего | в 2 и более раз |
| 3 | 494 (106 \uparrow , 388 \downarrow) | 331 (46 \uparrow , 285 \downarrow) | OXYS | 145 (82 \uparrow , 63 \downarrow) | 84 (48 \uparrow , 36 \downarrow) |
| 18 | 430 (101 \uparrow , 329 \downarrow) | 282 (53 \uparrow , 229 \downarrow) | Вистар | 159 (91 \uparrow , 68 \downarrow) | 80 (51 \uparrow , 29 \downarrow) |

Следует отметить, что функции многих обнаруженных ДЭ генов (*LOC685067*, *LOC290595* и др.) не известны, их экспрессия в сетчатке крыс выявлена нами впервые. Например, экспрессия гена *Otop3* повышена у крыс OXYS более чем в 10 раз в 3 месяца и в 20 раз в 18 месяцев ($BX < 2.76 \times 10^{-21}$). О нем известно лишь то, что он участвует в кальциевой минерализации слуховой кости. Функциональная значимость повышения экспрессии этого гена в сетчатке крыс OXYS при развитии ретинопатии еще предстоит выяснить. Полный список всех ДЭ генов приведен в Supplemental File 2 в статье Kozhevnikova et al. 2013.

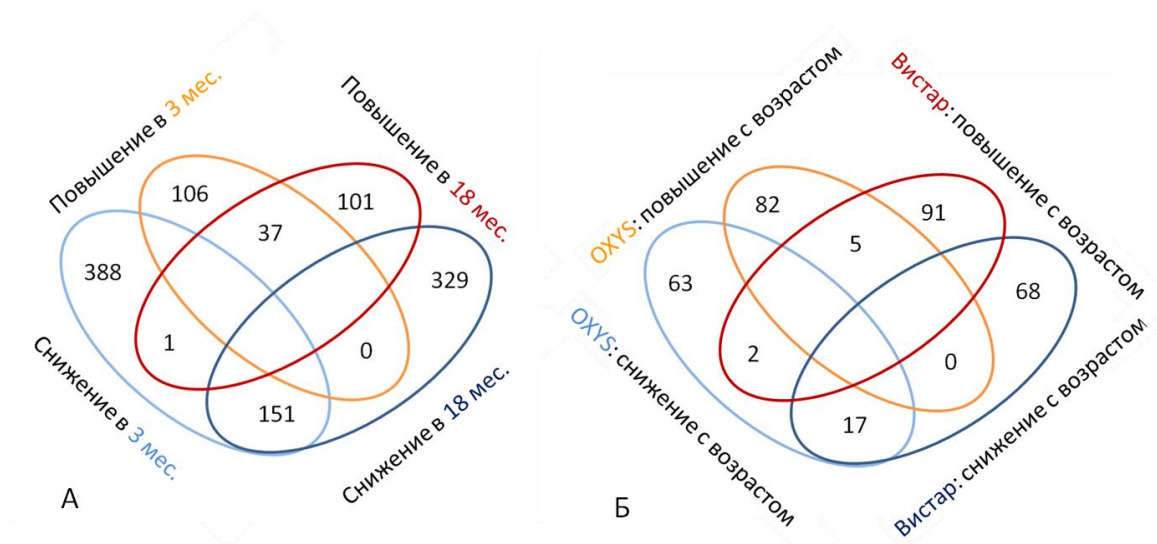


Рисунок 13. Диаграммы Венна для ДЭ генов. А) Указано количество генов в сетчатке крыс OXYS со сниженным и повышенным, по сравнению с крысами Вистар, уровнем мРНК в возрасте 3 и 18 месяцев и пересечения между группами генов; Б) указано количество генов, с возрастом снизивших и повысивших уровень мРНК у крыс OXYS и Вистар, и пересечения между группами генов.

Важно, что в список генов, экспрессия которых различается в сетчатке крыс OXYS и Вистар, вошли гены из локусов QTL 1-й хромосомы: 35 генов в возрасте 3 месяцев и 33 гена - в 18 месяцев. Гены приведены в **приложении 3**. Однако среди них не обнаружено генов-кандидатов, отобранных на целевой ДНК-микрочип, т.е. найденные с помощью ДНК-микрочипов небольшие межлинейные различия в экспрессии генов-кандидатов не были зафиксированы методом RNA-seq. Причины этого на данный момент неясны. Для их выяснения требуется проведение дополнительных исследований.

Дифференциальная экспрессия 15 генов была подтверждена методом ПЦР в реальном времени. Коэффициенты изменения их экспрессии, выявленные методом RNA-seq, практически совпали при оценке методом ПЦР-РВ. Только для гена *Lig4* отличия в экспрессии по данным ПЦР-РВ были существенно меньше, чем по данным RNA-seq (*рис. 14*).

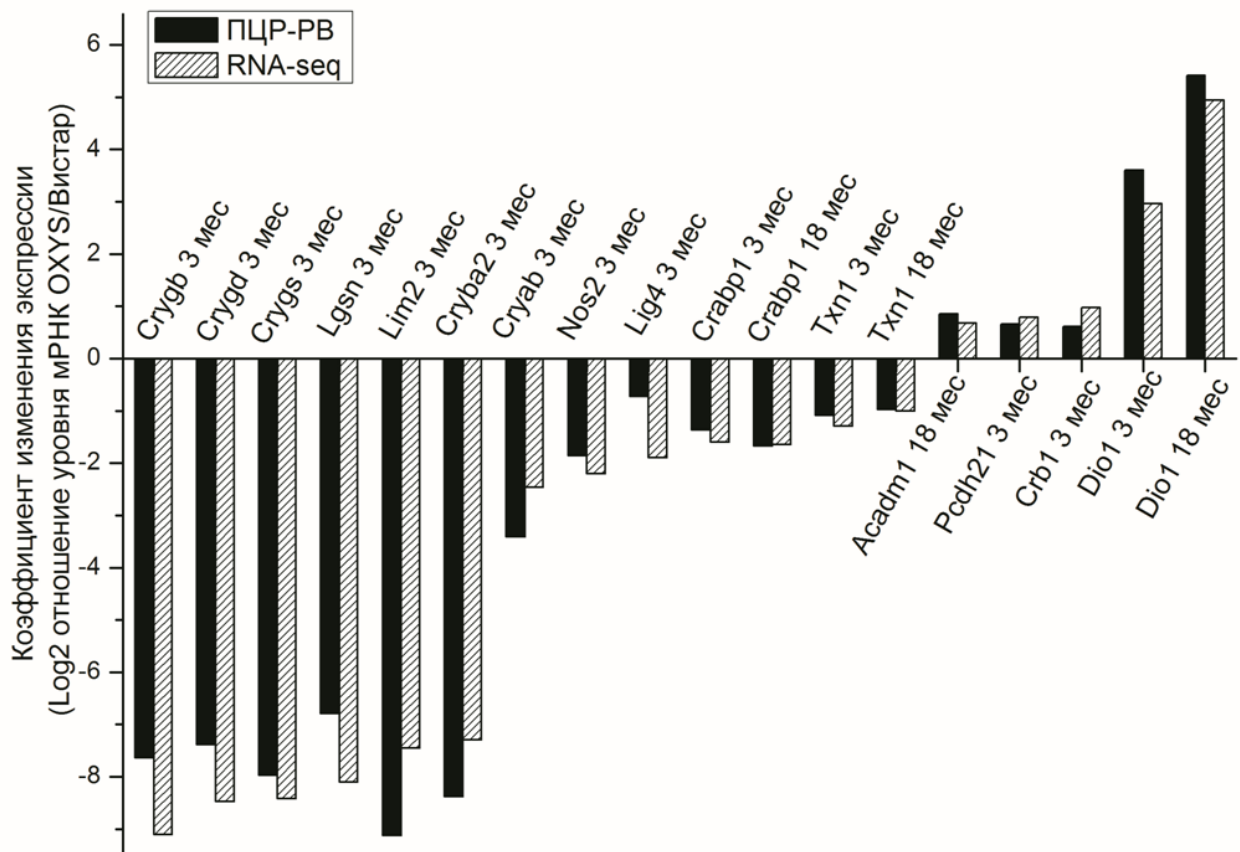


Рисунок 14. Сопоставление данных по изменению уровня экспрессии 15 генов в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар, полученных методами RNA-seq и ПЦР-РВ. Указан двоичный логарифм отношения уровня мРНК генов в сетчатке крыс OXYS к уровню мРНК в сетчатке крыс Вистар.

В возрасте 3 месяцев уровень мРНК генов, кодирующих структурные компоненты хрусталика, в том числе кристаллины (*Crygb*, *Crygs*, *Lgsn*, *Lim2*, *Cryab*, *Cryba2* и *Crygd*), в сетчатке крыс OXYS был более чем в 10 раз ниже, чем у крыс Вистар. При этом наблюдался разброс значений количества прочтений между образцами. Вариации в экспрессии этих генов также были обнаружены при проверке ПЦР-РВ на независимой выборке. Однако средний уровень мРНК генов кристаллинов у крыс OXYS был всегда ниже уровня крыс Вистар. Ранее было показано, что в хрусталике крыс OXYS существенно снижена экспрессия генов α -кристаллинов (Румянцева и др. 2008), поэтому полученный результат может быть следствием следового загрязнения образцов сетчатки тканями передней части глаза (хрусталик, водянистая влага, роговица), в которых гены кристаллинов экспрессируются на высоком уровне (Kamphuis et al. 2007). Однако мы предположили, что низкий уровень мРНК генов кристаллинов в сетчатке крыс OXYS не определяется их статусом экспрессии в хрусталике, т.е. может проявляться на системном уровне. Для проверки этой гипотезы мы оценили содержание белка кристаллина *Cryab* в сетчатке методом вестерн-блот анализа. Как видно из **рисунка 15**, содержание белка *Cryab* достоверно снижено у крыс OXYS по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Это может означать, что низкий уровень мРНК гена *Cryab* в сетчатке крыс OXYS не определяется его статусом экспрессии в хрусталике. Более того, иммуногистохимическое окрашивание препаратов сетчатки 4-месячных крыс OXYS и Вистар антителами к *Cryab*, выполненное к.б.н. Т.В. Карамышевой, подтвердило результаты вестерн-блот анализа (см. обсуждение).

Таким образом, с использованием метода RNA-seq были определены дифференциально экспрессирующиеся гены в сетчатке крыс OXYS при развитии ретинопатии в возрасте 3 и 18 месяцев по сравнению с одновозрастными крысами Вистар, у которых признаки ретинопатии отсутствуют.

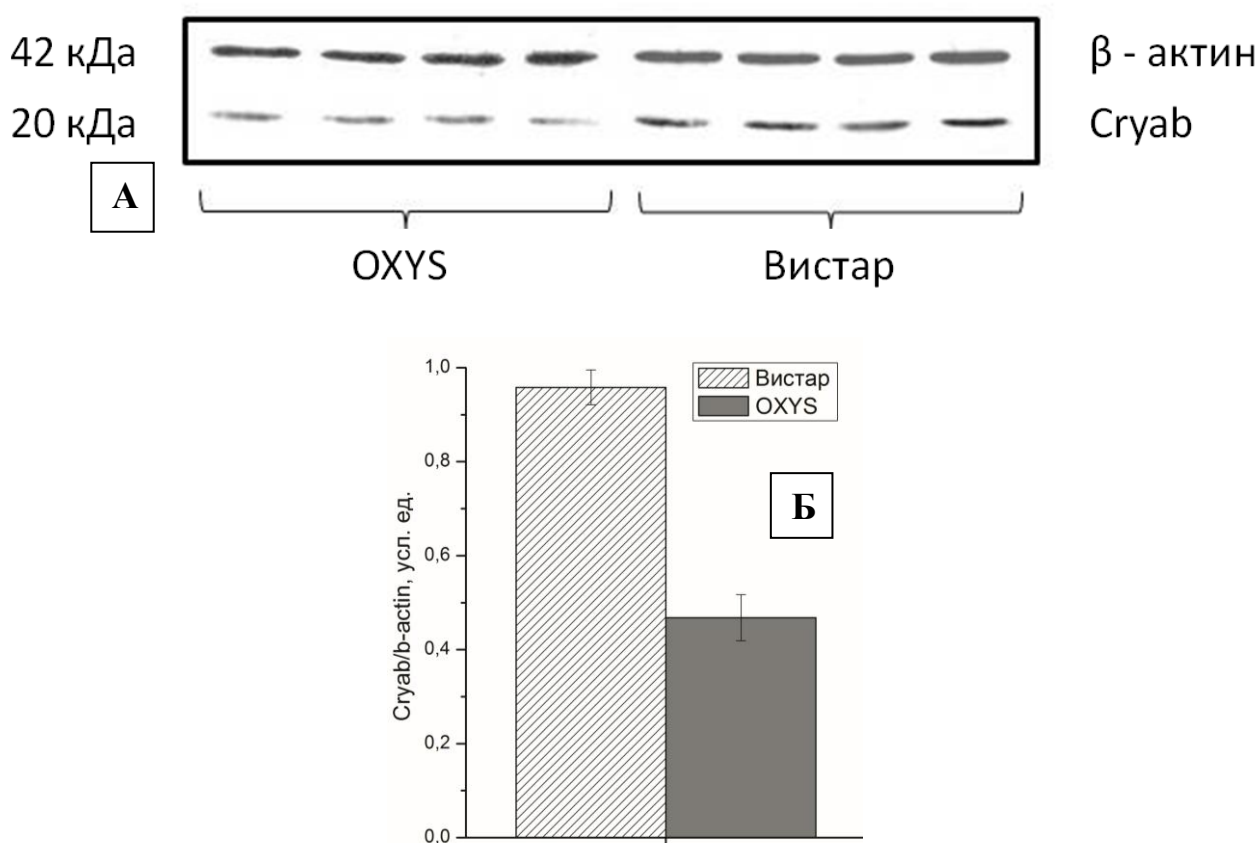


Рисунок 15. Содержание белка Cryab в сетчатке крыс ОХУС снижено по сравнению с крысами Вистар в возрасте 3 месяцев. А) Вестерн-блот анализ. Б) Отношение интенсивности свечения полос хемилюминесценции Cryab/ β -актин ($p < 0,001$).

Возрастные различия

Всего в процессе старения сетчатки - с 3 до 18 месяцев - у крыс Вистар изменилась экспрессия 159 генов, из них у 91 экспрессия повысилась, у 68 - снизилась. Экспрессия 80 генов была изменена более чем в 2 раза. В сетчатке крыс ОХУС с возрастом на фоне прогрессирования ретинопатии изменилась экспрессия 145 генов, из которых 82 повысили экспрессию и 63 – понизили. Более чем вдвое была изменена экспрессия 84 генов (*табл. 5, рис. 13б*). Сравнение списка генов, с возрастом изменяющих экспрессию в сетчатках крыс Вистар и ОХУС, показало, что только 24 из них (15%) изменяют свою экспрессию однонаправленно у крыс обеих линий, что может быть обусловлено различиями в механизмах старения сетчатки (*рис. 16*). Эти данные свидетельствуют, что изменения в экспрессии генов, характерные для прогрессирующей ретинопатии и для нормального старения сетчатки, слабо перекрываются между собой и зависят от генотипа.

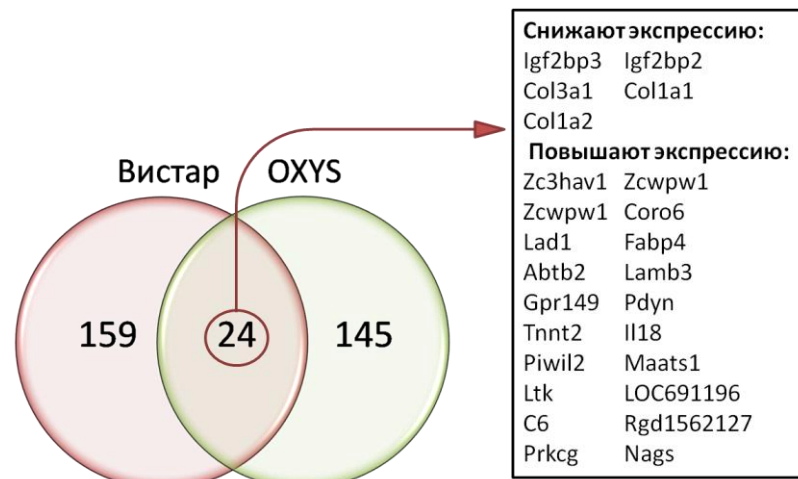


Рисунок 16. Список общих генов, изменяющих экспрессию с возрастом у крыс OXYS и Вистар.

Установлен ряд дифференциально экспрессирующихся с возрастом генов у крыс Вистар, уровень мРНК которых к возрасту 18 месяцев достигал уровня 3-месячных крыс OXYS (*рис. 17*). Иначе говоря, уже в 3 месяца у крыс OXYS уровень мРНК этих генов в сетчатке соответствовал уровню 18-месячных крыс Вистар, что может свидетельствовать об ускоренном старении сетчатки крыс OXYS.

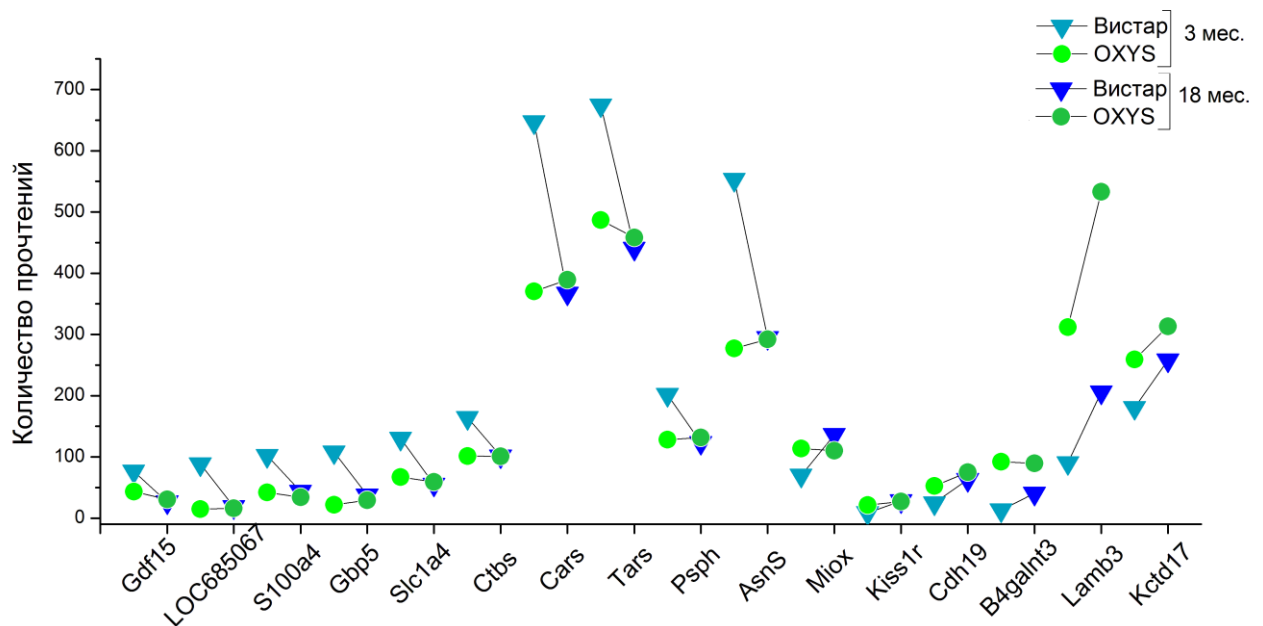


Рисунок 17. Гены, уровень мРНК которых у крыс Вистар к возрасту 18 месяцев приближается к уровню 3-месячных крыс OXYS.

Таким образом, с использованием метода RNA-seq были определены дифференциально экспрессирующиеся с возрастом гены в сетчатке крыс OXYS и Вистар.

3.6. Функциональная аннотация дифференциально экспрессирующихся генов

С помощью терминов Gene Ontology была проведена функциональная аннотация групп ДЭ генов в сетчатке крыс с возрастом (возрастные различия) и между крысами OXYS и Вистар (межлинейные различия).

Возрастные различия

На *рисунке 18* и *19* представлены основные процессы и метаболические пути (термины генных онтологий, Gene Ontology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов с возрастом у крыс OXYS и Вистар, соответственно.

Несмотря на то, что набор генов, экспрессия которых изменяется с возрастом, у крыс Вистар и OXYS существенно различается, они объединяются в сходные категории генных онтологий. Так, с возрастом в сетчатке крыс обеих линий изменяется экспрессия генов, связанных с организацией внеклеточного матрикса и иммунного ответа. У крыс Вистар с возрастом снижается экспрессия генов внеклеточного матрикса (*Lama1*, *Col3a1*, *Colla2*, *Igf1*, *Postn*, *Sparc*, *Colla1* и *Col4a5*), иммунного ответа (*Gbp5*, *Loc685067*, *Msh3*, *Cxcl3*, *Cxcl2*, *Oas1b*, *Cxcl6* и *Gbp2*), ответа на уровень нутриентов (*Acadm*, *Igf1*, *Asns*, *Sparc*, *Colla1* и *Psph*) и синтеза тРНК (*Iars*, *Tars*, *Cars*, *Aars*, *Mars* и *RGD1305089*). У старых крыс Вистар выше, чем у молодых, экспрессия генов, участвующих в негативной регуляции транскрипции (*Rarg*, *Nab2*, *Pparg*, *Per2*, *Fabp4* и *Hsf4*), циркуляции крови и регуляции давления (*Hrh3*, *Pparg*, *Myh6*, *Adipoq* и *Glp1r*), а также генов иммунного ответа (*Il20rb*, *C4b*, *C6*, *Il1rl2*, *Il18* и *Cfd*) и синаптической трансмиссии (*Kiss1r*, *Grm2*, *Bcan* и *Pdyn*).

В процессе старения в сетчатке крыс OXYS снижается экспрессия генов, ассоциированных с внеклеточным матриксом (*Aspn*, *Gpc3*, *Lum*, *Col3a1*, *Tgfbi*, *Eln*, *Colla2*, *Col6a1*, *Coll2a1*, *Colla1*, *Col5a1* и *Thbs4*), ремоделированием кровеносных сосудов и клеточной адгезии (*Col3a1*, *Eln*, *Colla2*, *Colla1*, *Col5a1* и *Thbs4*) и зрительного восприятия (*Pde6c*, *Opn1mw*, *Colla1*, *Pde6h* и *Aanat*). Сниженная экспрессия субъединиц cGMP-фосфодиэстеразы (*Pde6h* и *Pde6c*), ключевого фермента зрительной трансдукции в фоторецепторах указывает на нарушения их целостности и функций. С возрастом у крыс OXYS повышается экспрессия генов комплекса МНС класс I (*Rt1-A2*, *Rt1-M5*, *Rt1-Ce5* и *Rt1-T24 -1*), морфогенеза кровеносных сосудов (*Il18*, *Ntrk2*, *Zc3h12a* и *Fgf2*) и киназной активности (*Map3k5*, *Epha6*, *Rps6ka2*, *Mapk4*, *Ntrk2*, *Prkcg* и *Alk*).

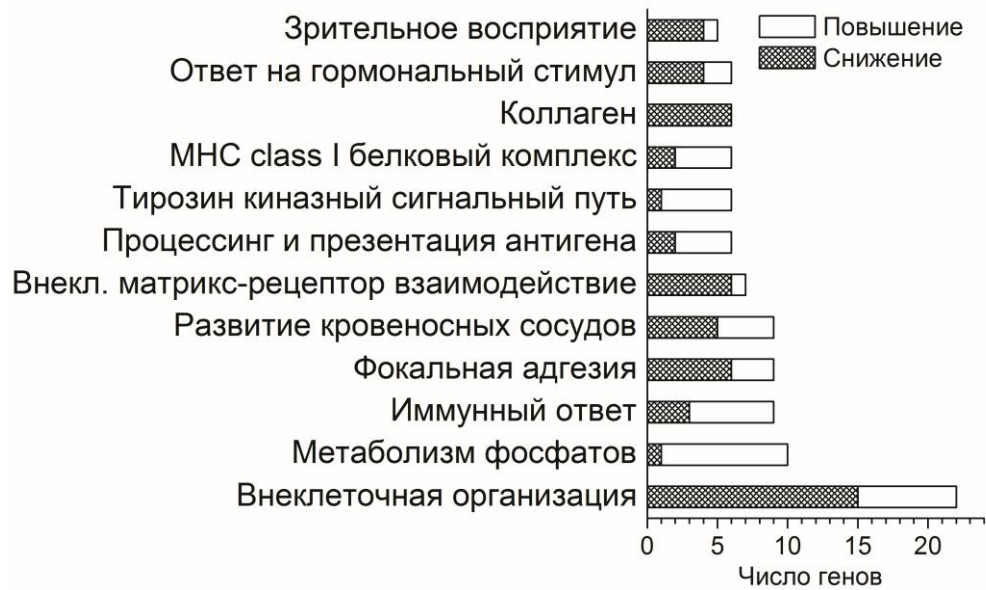


Рисунок 18. Значимые термины генных онтологий (Gene Ontology), объединяющие гены, экспрессия которых изменяется с возрастом в сетчатке крыс OXYS ($p < 0,05$).

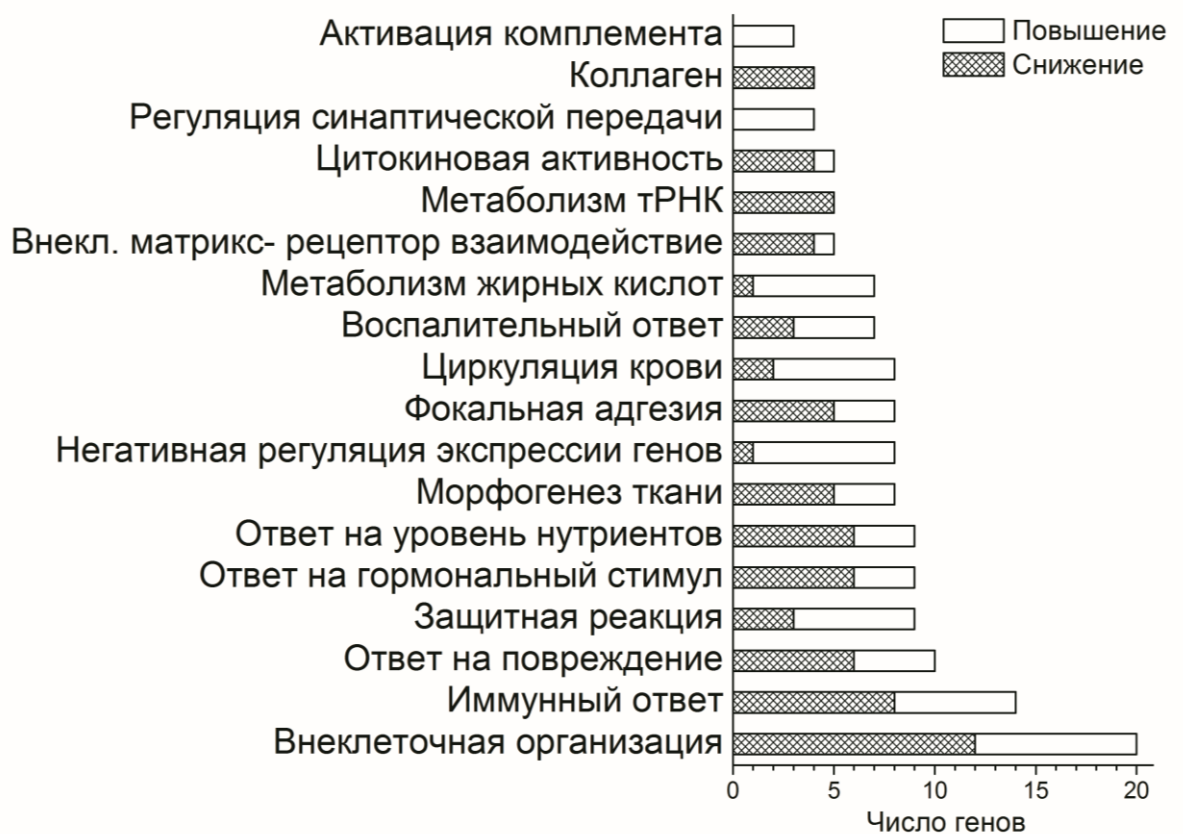


Рисунок 19. Значимые термины генных онтологий (Gene Ontology), объединяющие гены, экспрессия которых изменяется с возрастом в сетчатке крыс Вистар ($p < 0,05$).

В целом результаты функционального анализа указывают на то, что возрастные изменения в сетчатке крыс сопровождаются количественными изменениями мРНК генов, задействованных в процессах организации внеклеточного матрикса, клеточной адгезии и иммунной системы.

Межлинейные различия

На *рисунках 20 и 21* представлены основные процессы и метаболические пути (термины генных онтологий, Gene Ontology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов при развитии ретинопатии у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в 3 и 18 месяцев, соответственно.

Анализ специфичных для возраста 3 месяца ДЭ генов, показал, что на ранней стадии ретинопатии в сетчатке крыс OXYS изменена относительно крыс Вистар экспрессия генов иммунного ответа, ответа на стресс, структурных компонентов хрусталика, промежуточных филаментов цитоскелета. Экспрессия генов стресс-зависимого сигнального пути (*Wnt7b*, *Tnf*, *Myd88*, *Rgd1306565*, *Il1rn* и *Cryab*), GTPазной активности, регуляторов апоптоза, связывания кальция, сериновых пептидаз и др. снижена, экспрессия генов фототрансдукции (*Opn1mw*, *Opn1sw* и *Gnat2*), развития глаза (*Rax*, *Crb1*, *Hmg1l1*, *Rbp3*) и инозитол-фосфатного метаболизма (*Miox*, *Plcd3*, *Itpka*) - повышена.

В возрасте 3 месяцев у крыс OXYS снижена экспрессия генов участников сигнальных путей, ингибирующих апоптоз (*Birc3*, *Cdc2*, *Bcl2l10*, *Aven*, *Cflar* и др.). Более того, и в 3, и в 18 месяцев у них повышена экспрессия гена *Hmgb1*, маркера поздних стадий апоптоза, что согласуется с результатами морфометрии, выявившей высокий процент ядер с пикнозом в фоторецепторном и ганглионарном слоях сетчатки крыс OXYS (Жданкина и др. 2008).

В возрасте 3 месяцев у крыс OXYS снижена экспрессия генов сериновых протеаз (*Tmprss11b*, *Tmprss11d*, *Tmprss11f*, *Tmprss4*, *Tmprss11g*, *Prss22*, *Prss27*, *Prss32*, *Klk9* и *Klk13*) и их ингибиторов (*Serpinb5*, *Serpinb8*, *Serpinb3a*, *Serpinb11* и *Serpinb1a*). Сериновые протеазы участвуют в клеточной миграции, росте аксонов и синаптической пластичности. С нарушением протеолиза ассоциирован патогенез многих нейродегенеративных заболеваний.

Значительные различия в содержании мРНК были обнаружены для генов, кодирующих белки клеточной адгезии. При этом уровень экспрессии интегральных

белков, опосредующих взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом, был снижен (*Cldn7*, *Cldn23*, *Cldn4* и *Sdc1*), а экспрессия кадгеринов из семейства кальций-зависимых белков адгезии (*Pcdhgb6*, *Pcdhga9*, *Cdh19* и *Pcdh21*) – повышена. Также в сетчатке крыс OXYS в возрасте 3 месяцев была снижена экспрессия 12 генов из семейства промежуточных цитоскелетных филаментов (например, *Krt2*, *Krt14*, *Krt12*). Промежуточные филаменты играют основную роль в поддержании структурной целостности слоев внутренней сетчатки, в особенности Мюллеровских клеток. Показано, что отсутствие промежуточных филаментов в клетках Мюллера приводит к нарушению реакции сетчатки на ишемию (Lundkvist et al. 2004). Возможно, снижение экспрессии промежуточных филаментов отражает нарушения взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом в сетчатке крыс OXYS.



Рисунок 20. Значимые термины генных онтологий (Gene Ontology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в сетчатке в 3 месяца ($p < 0,05$).



Рисунок 21. Значимые термины генных онтологий (Gene Ontology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в сетчатке в 18 месяцев ($p < 0,05$).

В возрасте 18 месяцев гены со сниженной экспрессией у крыс OXYS группируются в категории (термины генных онтологий): ответ на повреждение (*Elf3*, *Cyp1a1*, *ErbB3*, *C6*, *ErbB2*, *Sphk1* и др.), окисление-восстановление (*Nqo1*, *Xdh*, *Cdo1*, *Cbr1* и др.), организация внеклеточных структур (*Lgals3*, *Serpinb5*, *Col3a1*, *Ccdc80* и др.), иммунный ответ (*Il18*, *C6*, *Rsad2*, *Oasl*, *Tnfrsf1b*, *Il20rb* и др.), воспалительный ответ (*Sdc1*, *Sphk1*, *Crcp*, *Cfd*, *Spp1* и др.), ответ на гипоксию (*Cyp1a1*, *Pdlim1*, *Nos2*, *Capn2*, *Xrcc1*, *Aldh3a1* и др.), регуляция клеточной адгезии (*Cd36*, *Ccdc80*, *Adipoq*, *Alox12*, *Spp1* и др.), окисление жирных кислот (*Cd36*, *Adh7*, *Decr1*, *Adipoq* и *Alox12*), электронно-транспортная цепь (*Nd4l*, *Cox8b*, *Txn1*, *Ndufa10*, *GlrX1* и *Etfa*) и презентация антигенов (*Rt1-A2*, *Rt1-Ce7*, *Rt1-S3* и *Tapbp*). Для категорий INTERPRO обнаружено обогащение по генам семейства аннексинов (*Anxa7*, *Anxa8*, *Anxa4* и *Anxa2*) и генам с доменом тиоредоксина (*Gpx2*, *Gstm4*, *Pdilt*, *Txn1*, *Clic1*, *Slc39a4* и *GlrX1*). Анализ KEGG путей выявил обогащение по генам, вовлеченным в метаболизм ксенобиотиков цитохромами группы P450 (*Gstm4*, *Cyp1a1*, *Adh7*, *Cyp3a9* и *Aldh3a1*).

В возрасте 18 месяцев в сетчатке крыс OXYS была снижена экспрессия генов антиоксидантных ферментов, катализирующих реакции с глутатионом (*Gpx2* и *Gstm4*), и оксиредуктаз тиоредоксинового семейства (*Glrx1* и *Txn1*), которые регулируют редокс-состояние и защищают клетки от окислительного стресса. Такие изменения, можно полагать, приводят к усиленному накоплению окисленных белков и липидов в тканях крыс OXYS этого возраста и лежат в основе их повышенной чувствительности к окислительному стрессу.

Поздние стадии ретинопатии протекают у крыс OXYS на фоне снижения экспрессии ключевых генов, регулирующих метаболизм витамина А и его производных – ретиноевой кислоты и 11-цис ретиналя (*Crabp1*, *Crabp2*, *Adh2*, *Retsat*, *Cyp3a9* и др.). Ретиналь участвует в зрительном цикле, нарушения его обмена приводят к накоплению фототоксичного компонента липофусциновых гранул А2Е.

В возрасте 18 месяцев у крыс OXYS повышена экспрессия генов, участвующих в процессах регуляции уровня гормонов (*Rdh8*, *Cyp11b1*, *Cyp11b2*, *Dio1* и *Vgf*), негативной регуляции метаболизма нуклеотидов (*Ciita*, *Gtpbp4*, *Hmgb2*, *Msh3*, *Hmg1l1*, *Drd4* и *Pax4*), окислительно-восстановительных реакциях (7), лигирования ДНК (*Hmgb2* и *Hmg1l1*) и других. В целом, для ДЭ генов, специфичных для 18 месяцев, обнаружено значимое обогащение по терминам генных онтологий: окисление-восстановление, окисление липидов, метаболизм ретинола, регуляция уровня гормонов.

У крыс OXYS обеих возрастных групп изменена экспрессия генов, продукты которых участвуют в реализации иммунного ответа, в том числе - генов маркеров лейкоцитов (*Nlrp6*, *Cd24*, *Tlr2* и др.), хемокинов (*Cxcl2*, *Cxcl3*, *Ccl6* и др.), цитокинов (*Il1a*, *Il18* и др.), интерферонзависимых белков (*Irf1*, *Isg20*, *Ifi47* и др.) и комплекса гистосовместимости МНС (*Rt1-M3-1*, *Rt1-Ce5* и др.). Из всего списка аннотированных ДЭ генов в возрасте 3 месяцев 107 генов и в возрасте 18 месяцев 87 имеют отношение к иммунным процессам, что составляет 23% и 21% соответственно. Подавляющее большинство этих генов имеют сниженный уровень мРНК у крыс OXYS. В **таблице 6** приведены ДЭ гены, связанные с иммунными процессами, согласно базе данных PANTHER. Интересно, что экспрессия генов из категории «активация комплемента» (complement activation) изменена у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар в возрасте 18 месяцев, т.е. при выраженных стадиях ретинопатии. В **таблице 7** приведены дифференциально экспрессирующиеся в разных возрастах гены

интерлейкинов и рецепторов к ним. Такие изменения свидетельствуют о нарушениях функционирования иммунной системы в сетчатке крыс OXYS.

Таблица 6. Дифференциально экспрессирующиеся гены в сетчатке крыс OXYS, связанные с иммунными процессами, согласно базе данных PANTHER.

| Gene Ontology (GO) | | 3 месяца | 18 месяцев |
|---|---|--|--|
| Процессинг и презентация антигена, antigen processing and presentation (GO:0019882) | | <i>Tuft1, RT1-S3, Tapbpl, RT1-M3-1, Nfkbiz, RT1-N3</i> | <i>Ciita, Nlrp6, Tuft1, RT1-S3, RT1-A2, Tapbp</i> |
| Активация макрофагов, macrophage activation (GO:0042116) | | <i>Il1rn, Cxcl2, Gbp4, Ehf, S100a16, Il1a, Gbp5, S100a9, Clec4f, S100a4, S100a6, Tnf, Sdc1, Elf3, S100a10, Ly75, Cxcl3, LOC685067, Cxcl1, S100a11, RGD1562234, LOC685385, Pla2r1</i> | <i>Myoc1c, Crocc, Ehf, RGD1560925, Rnf112, Sdc1, Elf3, S100a10, Col3a1, Ly75, Il22ra2, Il20rb, Tnfrsf1b, S100a11, RGD1562234, LOC100359550, Pla2r1</i> |
| Иммунный ответ, immune response (GO:0006955) | Иммунитет, связанный с В-лимфоцитами, B cell mediated immunity (GO:0019724) | <i>Il1rn, Ms4a8a, Ddx60, Ehf, Heph11, Tuft1, RT1-S3, Tnf, Elf3, LOC691921, RT1-M3-1, RT1-N3, Il6r</i> | <i>Ms4a8a, Ehf, Tuft, RT1-S3, RT1-A2, Tnfrsf1b, Scin</i> |
| | Активация натуральных киллеров, natural killer cell activation (GO:0030101) | <i>Il4ra, Tuft1, Tnf</i> | <i>Tuft1, Il20rb, Il22ra2</i> |
| | Ответ на интерферон-гамма, response to interferon-gamma (GO:0034341) | <i>Ifit1, Irf7, Cxcl2, Ifit2, Gbp4, Oas1k, Gbp5, Oas12, Tnf, Cxcl3, LOC685067, Ifit3, Cxcl1, Oas1a</i> | <i>Irf1, Oas1, RGD1560925, Rnf112, Il22ra2</i> |
| | Активация комплемента, complement activation (GO:0006956) | - | <i>Pglyrp4, Cd109, C6, Adipoq, Cfd, Ccdc80</i> |

И в 3, и в 18 месяцев среди ДЭ генов в сетчатке крыс OXYS обнаруживается кластер генов, продукты которых реагируют на изменения уровня кальция (*Calml4, Rcn1, Calml3, Camk1g, Tacstd2, Clca2* и др.), в том числе – кальцийзависимые сигнальные белки. Также независимо от возраста у крыс OXYS более чем вдвое снижена экспрессия генов, кодирующих аннексины (*Anxa1, Anxa2, Anxa8* и *Anxa9*) - Ca^{2+} зависимые фосфолипидсвязывающие белки. Аннексины опосредуют разные компоненты

воспалительного ответа, в том числе адгезию лейкоцитов к эндотелию сосудов. Другая группа связывающих кальций белков, экспрессия генов которых у крыс OXYS снижена, - белки семейства S100 (*S100a4*, *S100a11*, *S100a6*, *S100a9* и др.), участвующие в разных клеточных процессах: регуляции активности ферментов, динамике цитоскелета, клеточном росте и дифференцировке, Ca^{2+} гомеостазе.

Таблица 7. Дифференциально экспрессирующиеся в сетчатке крыс OXYS гены интерлейкинов и рецепторов к ним. Стрелки обозначают повышение (↑) и снижение (↓) уровня мРНК относительно крыс Вистар соответствующего возраста.

| Ген | Межлинейные различия (OXYS/Вистар) | | Возрастные различия (3мес./18 мес.) | |
|----------------|------------------------------------|------------|-------------------------------------|------|
| | 3 месяца | 18 месяцев | Вистар | OXYS |
| <i>Il18</i> | 2,8↓ | 3,2↓ | 3,0↑ | 2,2↑ |
| <i>Il1a</i> | 8,4↓ | | | |
| <i>Il23a</i> | 3,4↓ | | | 2,3↑ |
| <i>Il4ra</i> | 4,6↓ | | | |
| <i>Il1rn</i> | 2,8↓ | | | |
| <i>Il6r</i> | 1,5↓ | | | |
| <i>Il13ra1</i> | 1,5↓ | 1,5↓ | | |
| <i>Il22ra2</i> | | 5,3↓ | | |
| <i>Il20rb</i> | | 5,0↓ | 3,4↑ | |
| <i>Il1rl2</i> | | | 7,8↑ | |

В совокупности, результаты функционального анализа показали, что ретинопатия у крыс OXYS развивается на фоне изменения экспрессии генов, продукты которых участвуют в процессах иммунной системы и апоптоза, ассоциированы с окислительным стрессом и Ca^{2+} гомеостазом.

3.7. Накопление амилоидного пептида Aβ в сетчатке крыс OXYS

Растет количество фактов, указывающих на то, что усиленное накопление Aβ в сетчатке может провоцировать развитие ВМД у людей (Chiu et al. 2012, Dasari et al. 2011, Ohno-Matsui et al. 2011, Yoshida et al. 2005, Dentchev et al. 2003). Было замечено, что у генетически модифицированных мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера (bitransgenic APP/PS1), проявляются многие признаки ВМД, такие как друзоподобные отложения в субретинальном пространстве, дегенерация РПЭ и нейроретины (Ning et al. 2008). Популяционные исследования выявили высокую частоту когнитивных нарушений у больных ВМД, и, напротив, патологические изменения глазного дна у большинства больных Альцгеймером (Ермилов и др. 2013, Rovner et al. 2009, Clemons et

al. 2006, Klaver et al. 1999). Эти наблюдения свидетельствуют о системности этих заболеваний и возможных общих механизмах патогенеза.

Ретинопатия и ускоренное старение мозга у крыс OXYS развиваются параллельно, что предполагает общие механизмы развития нейродегенеративных процессов. Биоинформатический анализ локусов QTL 1-й хромосомы, ассоциированных с развитием ретинопатии, катаракты и признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS, показал их обогащение генами, связанными с нейродегенерацией, и значимую представленность генов из пути болезни Альцгеймера. Среди генов, показавших зависимый от генотипа уровень гибридизации с олигонуклеотидными зондами на ДНК-микрочипах, оказались гены *Picalm* и *Arpa2*, участвующие в процессинге белка-предшественника амилоида APP. Более того APP оказался одним из узлов ассоциативной сети, образуемой дифференциально экспрессирующимися генами по данным RNA-seq (к.б.н. А.В. Дорошков, см. обсуждение). На основании этих результатов мы выдвинули предположение о возможной связи ретинопатии крыс OXYS с изменениями в метаболическом пути болезни Альцгеймера, в частности, с накоплением пептида A β в сетчатке. Для его проверки мы сравнили содержание A β 42 в сетчатке крыс OXYS и Вистар в возрасте 3, 13 и 23 месяцев методами ИФА и иммуногистохимии. Следует подчеркнуть, что использованные антитела были специфичны к олигомеру амилоидного пептида A β 42, который, в отличие от других изоформ амилоида, *in vitro* образует нерастворимые агрегаты быстрее (Jarrett et al. 1993) и считается более токсичным, чем олигомер A β 40 (Barz et al. 2012). В исследованиях *in vivo* на мышах и дрозофиле было показано, что накопление A β 42, а не A β 40 приводит к образованию амилоидных фибрил (Iijima et al. 2004, McGowan et al. 2005, Yin et al. 2007). В сетчатке источниками A β являются клетки нейронов, РПЭ и глии (Johnson et al. 2002).

По результатам ИФА, уровень A β 42 в сетчатке с возрастом растет у крыс обеих линий, при этом в возрасте 3 месяцев он у крыс OXYS и Вистар не различается. Начиная с возраста 13 месяцев, уровень A β 42 становится у крыс OXYS вдвое выше, чем у крыс Вистар (*рис.22*). У крыс Вистар уровень A β в 13 месяцев такой же, как в возрасте 3 месяцев, и значимо увеличивается только к возрасту 23 месяцев.

Иммуногистохимическое окрашивание криосекций сетчатки крыс OXYS и Вистар специфическими антителами к A β 42 показало, что амилоидный пептид A β 42

локализуется на уровне РПЭ и мембраны Бруха и в наружных сегментах фоторецепторов (*рис. 23, 24*). Это согласуется с результатами выполненных ранее исследований локализации А β в сетчатке стареющих мышей и у людей (Ding et al. 2011, Hoh Kam et al. 2010). Как и ИФА, результаты иммуногистохимии показали, что А β 42 накапливается в сетчатке крыс с возрастом и в большей степени у крыс OXYS.

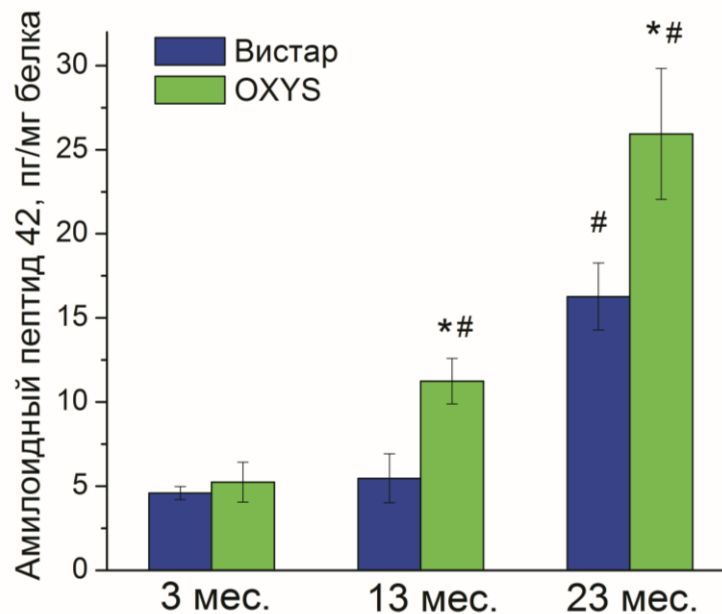


Рисунок 22. Содержание амилоидного пептида А β 42 в сетчатке крыс OXYS и Вистар разного возраста. * - достоверные межлинейные различия, # - достоверные различия по сравнению с крысами той же линии предыдущего возраста.

Необходимо отметить, что у крыс OXYS в возрасте 18 месяцев обнаружены обширные участки дегенеративных изменений сетчатки вплоть до исчезновения наружного ядерного (фоторецепторного) слоя и редукции числа ганглионарных нейронов (*рис. 24А*). Это согласуется с результатами выполненных ранее световой и электронной микроскопии, в которых показано локальное снижение с возрастом толщины внутренних слоев сетчатки крыс OXYS (Жданкина и др. 2008, Сапрунова и др. 2010). Особенно важным для нас оказалось появление сигнала А β 42 во внутренних слоях сетчатки в участках с выраженными нейродегенеративными изменениями, что свидетельствует о том, что усиленное накопление А β 42 участвует в патогенезе ретинопатии крыс OXYS (*рис. 24А*, стрелки). Интересно, что специфический сигнал обнаруживался у старых животных в клетках с бобовидным ядром вблизи РПЭ (*рис. 24Б*). Такая форма ядра и локализация клетки характерна для мононуклеарных фагоцитов, или макрофагов.

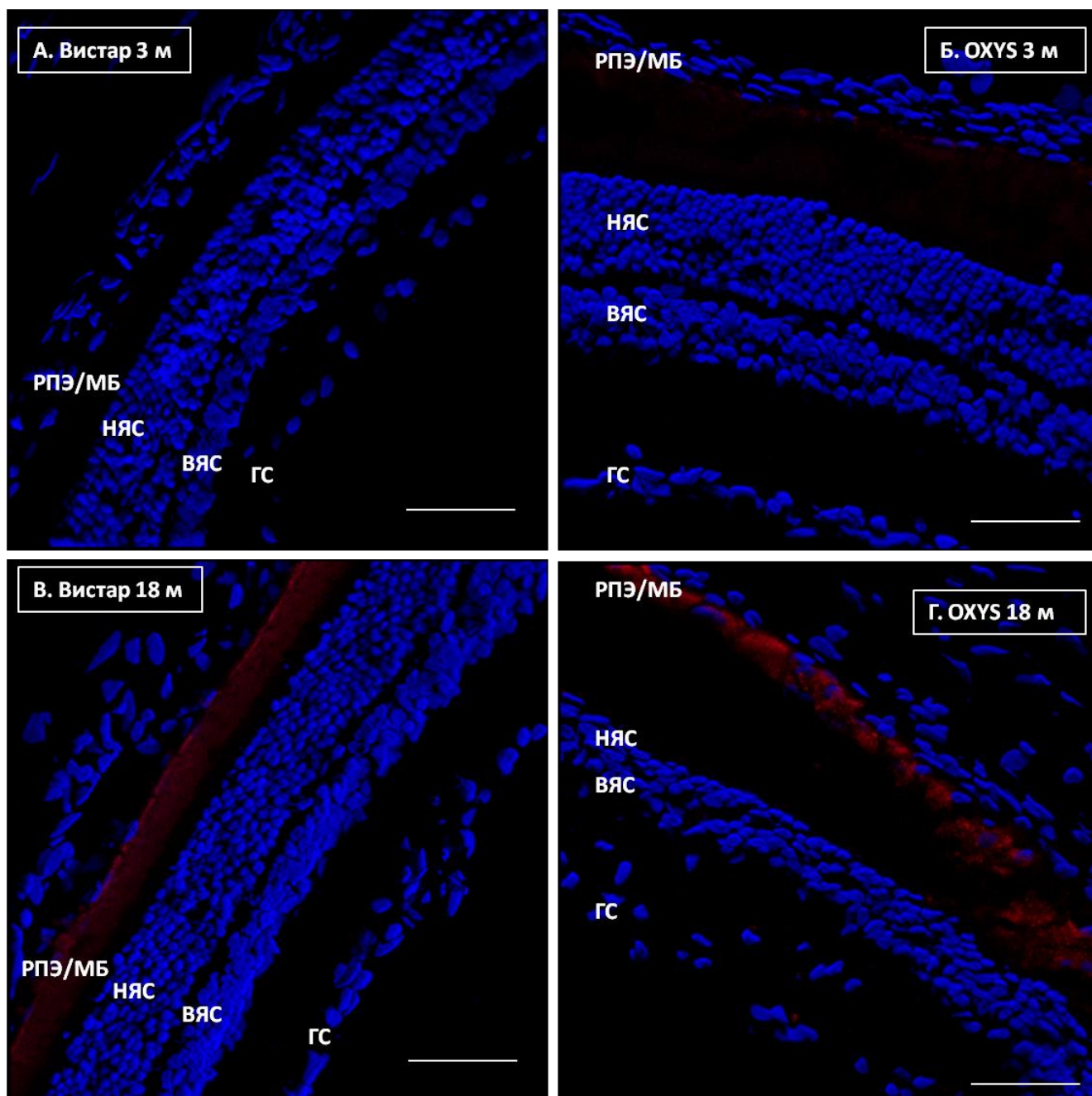


Рисунок 23. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов сетчатки крыс Вистар (А, В) и OXYS (Б, Г) антителами к Aβ42 (красный). Сигнал Aβ42 детектируется у крыс OXYS в возрасте 3 месяцев на фоновом уровне (Б) и более интенсивно - в 18 месяцев у крыс обеих линий (В, Г) в области РПЭ/мембраны Бруха. У крыс OXYS значительно снижена толщина внутренних слоев сетчатки и плотность ганглионарных нейронов. Ядра окрашены DAPI (синий). Масштаб – 50 мкм. РПЭ/МБ – ретинальный пигментный эпителий/мембрана Бруха, НЯС – наружный ядерный слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, ГС – ганглионарный слой.

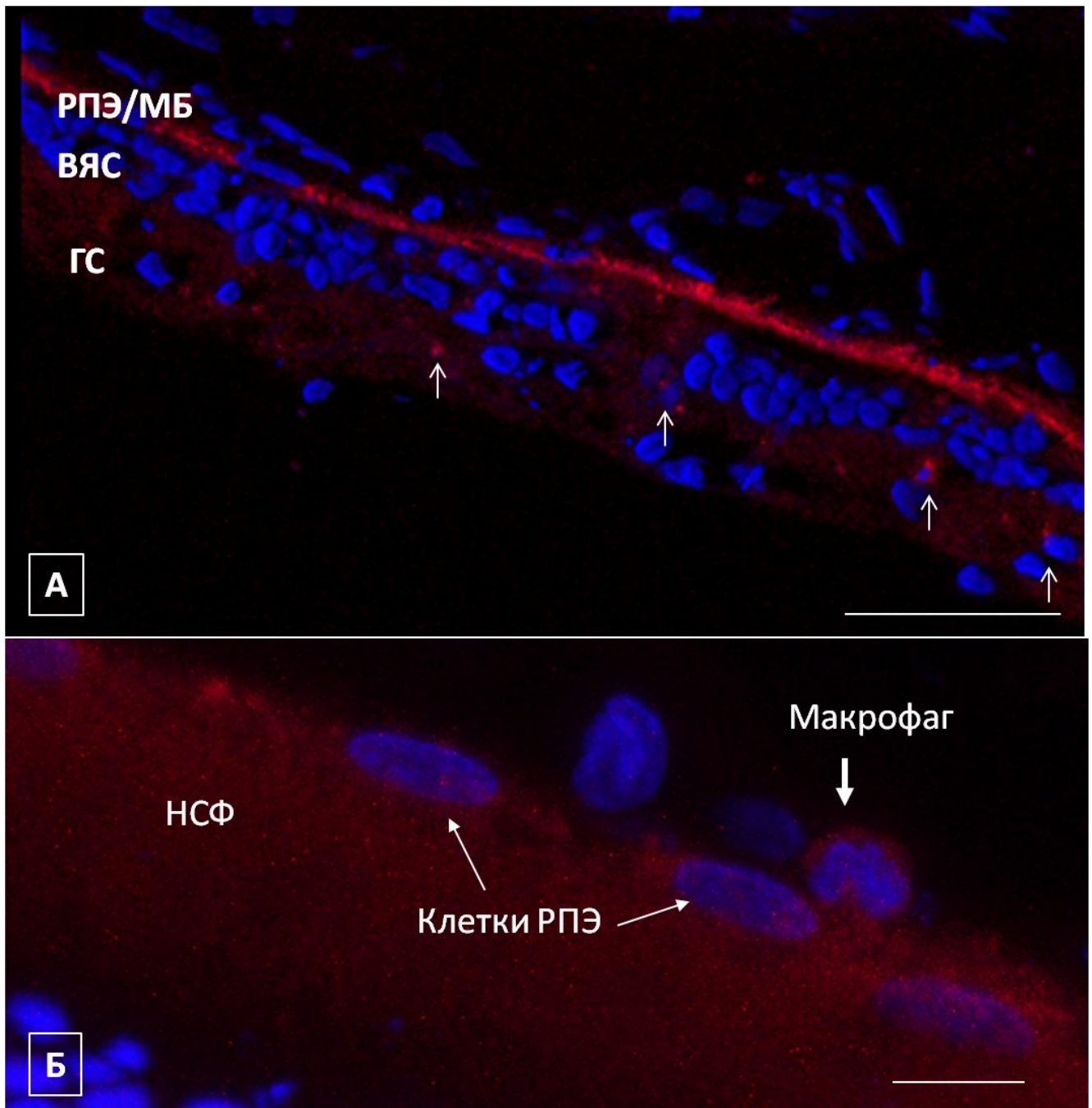


Рисунок 24. А) Участок сетчатки 18-месячных крыс ОХУС с выраженной нейродегенерацией. Стрелки – накопление $A\beta_{42}$ во внутренних слоях сетчатки. Масштаб – 50 мкм. Б) Пример накопления $A\beta_{42}$ в клетке мононуклеарного фагоцита вблизи РПЭ сетчатки крысы Вистар. Масштаб – 5 мкм. РПЭ/МБ – ретинальный пигментный эпителий/мембрана Бруха, ВЯС – внутренний ядерный слой, ГС – ганглионарный слой, НСФ – наружные сегменты фоторецепторов.

Таким образом, развитие у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД у людей, сопряжено с накоплением А β . При этом на ранней стадии заболевания в возрасте 3 месяцев, когда в сетчатке крыс OXYS изменена степень гибридизации с зондами на ДНК-микрочипе генов, связанных с болезнью Альгеймера, уровень А β не повышен. Его содержание увеличено в сетчатке 13- месячных крыс со 2-й стадией заболевания и ещё в большей степени – в возрасте 23 месяца, когда у крыс OXYS диагностируется 3-я стадия ВМД с выраженными нейродегенеративными изменениями и гибелью фоторецепторов.

ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВМД - многофакторное заболевание, в патогенезе которого участвуют сотни генов. Исследовать у людей ранние доклинические стадии заболеваний невозможно. На момент постановки задач настоящей работы публикаций, посвященных анализу транскриптома сетчатки у человека при развитии ВМД, не было. Закономерно, что для таких исследований необходимы адекватные биологические модели. Настоящее исследование выполнено на уникальной модели ВМД – линии преждевременно стареющих крыс OXYS. Его основной целью явилось выявление генов, с изменениями экспрессии которых связано развитие ретинопатии у крыс OXYS. Для достижения цели использовались два подхода: изучение экспрессии генов-кандидатов из локусов QTL 1-й хромосомы методом анализа целевых ДНК-микрочипов и полномасштабный анализ транскриптома сетчатки методом RNA-seq. Следует подчеркнуть, что под термином *экспрессия гена* мы подразумеваем уровень его транскрипта, или мРНК, как это принято в исследованиях транскриптома и англоязычной литературе.

На первом этапе работы была проведена оценка вклада локусов QTL 1-й хромосомы в генетический контроль ретинопатии, аналогичной ВМД, у крыс OXYS: анализ заболеваемости конгенных крыс, отбор генов-кандидатов из локусов QTL и анализ их экспрессии с помощью разработанных олигонуклеотидных ДНК-микрочипов. Вторая часть исследования посвящена анализу изменений транскриптома сетчатки крыс с возрастом и при развитии ретинопатии методом RNA-seq. При использовании каждого из этих подходов были получены результаты, указывающие на участие в патогенезе заболевания метаболического пути болезни Альцгеймера. Поэтому завершает работу исследование содержания и локализации амилоидного пептида A β в сетчатке крыс Вистар и OXYS.

Оценка вклада локусов QTL 1-й хромосомы в генетический контроль ретинопатии крыс OXYS

Результаты проведенного ранее QTL анализа указывают на существование на 1-й хромосоме крыс OXYS двух локусов, ответственных за развитие ретинопатии (Ойдопова и др. 2008, Korbolina et al. 2012). Небольшая плотность микросателлитных маркеров и относительно ограниченная выборка животных, использование в анализе животных обоего пола являются ограничивающими факторами подлинности выявленных QTL (Redina et al. 2006, 2013, Korbolina et al. 2012). Поэтому для выяснения

вклада найденных локусов QTL в регуляцию признаков преждевременного старения крыс OXYS, локусы QTL 1-й хромосомы были перенесены возвратными скрещиваниями в геном крыс инбредной линии WAG, у которых ретинопатия не развивается. Полученные конгенные линии были названы WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 (Korbolina et al. 2012). Как показали офтальмоскопические осмотры, ретинопатия развивается у крыс обеих конгенных линий, при этом заболеваемость у крыс WAG/OXYS-1.2 выше. Следует подчеркнуть, что ретинопатия у крыс обеих конгенных линий не прогрессирует с возрастом. По тяжести течения (выраженности патологических изменений) крысы конгенных линий также различаются: OXYS > WAG/OXYS-1.2 > WAG/OXYS-1.1. Для исследования патоморфологических признаков ретинопатии и проведения ДНК-микрочипового анализа была выбрана конгенная линия WAG/OXYS-1.2 с более выраженными клиническими проявлениями заболевания.

Как показала световая микроскопия, в сетчатке крыс конгенной линии WAG/OXYS-1.2 развиваются характерные для крыс OXYS нейродегенеративные изменения во внутреннем ядерном и ганглионарном слоях нейронов. В то же время характер поражения их сетчатки отличается от такового у крыс OXYS. Во-первых, у крыс OXYS, как правило, не обнаруживается лимфоцитарная инфильтрация, выявленная у крыс конгенной линии. Во-вторых, у конгенных животных не обнаружены патологические изменения сосудов хориоидеи, но при этом признаки нарушения кровотока присутствуют в интравитреальных сосудах. Неполная пенетрантность признака и различия в характере поражения сетчатки у крыс конгенных линий и крыс OXYS свидетельствуют о том, что перенесенные локусы контролируют только часть проявлений ретинопатии крыс OXYS. Выявленные особенности ретинопатии крыс конгенных линий могут быть обусловлены как влиянием генетического фона линии-реципиента WAG на перенесенные локусы, так и отсутствием других локусов, участвующих в формировании комплексного признака – ретинопатии крыс OXYS. Поскольку ретинопатия инициируется, но не прогрессирует с возрастом у крыс конгенных линий, можно полагать, что в локусах QTL 1-й хромосомы располагается генетический фактор/факторы предрасположенности к ретинопатии, но не ее прогрессии. В целом, в настоящей работе показано, что конгенная линия WAG/OXYS-1.2 может быть использована в качестве модели ретинопатии, пригодной для изучения нейродегенеративных процессов в сетчатке.

В областях локусов QTL 1-й хромосомы был проведен поиск генов-кандидатов с помощью биоинформатических подходов: функциональной аннотации района и методом приоритезации. Как показал анализ литературы, изменения экспрессии многих генов QTL района ассоциированы с развитием нейродегенеративных процессов. В частности, значимым оказалось присутствие категорий метаболических путей, изменения в которых вносят вклад в патогенез болезни Альцгеймера. Для отобранных генов-кандидатов был разработан олигонуклеотидный ДНК-микрочип.

Анализ ДНК-микрочипов выявил достоверные отличия в степени гибридизации кДНК сетчатки крыс OXYS с зондами 14 генов-кандидатов от таковых крыс Вистар. Все выявленные межлинейные различия лежат в пределах от 20 до 60%, что является небольшим диапазоном. При измерении экспрессии генов на микрочипах высокой плотности с тысячами олигонуклеотидных зондов такие небольшие изменения остались бы незамеченными. Так как для некротных изменений высок риск артефактов, дифференциально экспрессирующимися на микрочипах высокой плотности считаются только гены, отличающиеся по уровню экспрессии более чем в 2 раза (Свешникова и др. 2007, Zien et al. 2001, Bolstad et al. 2003, Kreil et al. 2005, Furusawa et al. 2009). Однако в нашем случае были использованы разработанные (home-made) целевые ДНК-микрочипы с ограниченным количеством зондов (112). Поэтому мы полагаем, что выявленные небольшие изменения в степени гибридизации для генов-кандидатов между крысами OXYS и Вистар могут расцениваться как изменения экспрессии этих генов.

Принципиально важно, что среди 14 различающихся по степени гибридизации с зондами на ДНК-микрочипах в сетчатке крыс Вистар и OXYS генов были гены *Picalm* и *Arpa2*, продукты которых участвуют в процессинге белка предшественника амилоида (APP) и ассоциированы с болезнью Альцгеймера. Белок *Picalm* принадлежит семейству фосфоинозитол-связывающих клатриновых белков, играющих ключевую роль в эндоцитозе. И сверхэкспрессия, и недостаток экспрессии гена *Picalm* нарушают правильное течение эндоцитоза, играющего важную роль в нервной системе (Baig et al. 2010). Полногеномный анализ ассоциаций выявил ассоциацию полиморфизмов гена *PICALM* с болезнью Альцгеймера (Harold et al. 2009, Liu et al. 2013). Так как процессинг APP сопровождается эндоцитозом, предполагается, что *Picalm* опосредованно через эндоцитоз может регулировать уровень Аβ. *Arpa2* - нейрональный адаптерный белок, который взаимодействует с APP. Связываясь с APP, он его стабилизирует, тем самым

ингибируя продукцию протеолитических фрагментов (Saito et al. 2008). Митохондриальные гены *Vdac1* и *Ndufv1* с измененной степенью гибридизации у крыс OXYS также тесно связаны с болезнью Альцгеймера (Liang et al. 2008, Hur et al. 2012). В совокупности эти результаты и данные функциональной аннотации локусов QTL 1-й хромосомы позволяют предположить, что метаболический путь болезни Альцгеймера участвует в патогенезе ретинопатии крыс OXYS, аналогичной ВМД.

Необходимо отметить, что анализ ДНК-микрочипов не выявил достоверных отличий в степени гибридизации кДНК сетчатки с зондами генов-кандидатов крыс WAG/OXYS-1.2 ни от крыс Вистар, ни от крыс OXYS. С одной стороны, такие результаты могут говорить о том, что уровни мРНК селектированных генов-кандидатов не связаны с развитием ретинопатии у крыс WAG/OXYS-1.2. Однако они не позволяют исключить эти гены из списка потенциальных генов-кандидатов, поскольку преимущество QTL-анализа в том, что он способен фиксировать молекулярные варианты, влияющие на все уровни экспрессии гена (мРНК, белок), посттрансляционные модификации, регуляцию микроРНК и мутации в регуляторных областях. С другой стороны, такие результаты могут быть обусловлены влиянием «нового» генетического окружения перенесенных локусов. Для оценки вклада этих и других генов из локусов QTL в патогенез ретинопатии крыс OXYS необходимы дальнейшие исследования.

Анализ изменений транскриптома сетчатки крыс с возрастом и при развитии ретинопатии методом RNA-seq

Для анализа транскриптома методом RNA-seq были использованы животные в возрасте 3 месяцев, к которому заболеваемость крыс OXYS ретинопатией достигает 100%, но при этом преобладают изменения, соответствующие 1-й стадии ВМД у людей, и в возрасте 18 месяцев, когда патологические изменения сетчатки соответствуют выраженным стадиям заболевания (Markovets et al. 2011). Как и ожидалось, были обнаружены межлинейные и межвозрастные различия в уровне транскриптов многих генов.

Провоспалительный фон рассматривается как одно из проявлений старения (Kaarniranta et al. 2012, Cai et al. 2012a). Признаки воспаления в сетчатке пациентов с ВМД более выражены, но аналогичны тем, которые наблюдаются при нормальном старении глаза (Chen et al. 2008, Chen et al. 2010, Xu et al. 2009). Закономерно, что

сравнение профилей транскриптома при старении сетчатки крыс Вистар и OXYS выявило изменения нескольких общих функциональных групп генов (далее - пути): иммунный ответ и внеклеточная организация. Однако принципиально важно, что эти два пути представлены разными генами. Только уровень мРНК 24 генов (15%) изменился с возрастом одинаково и у крыс OXYS, и у крыс Вистар, что указывает на то, что скорость и механизмы возрастных изменений в их сетчатке различны. Как при нормальном старении сетчатки, так и при развитии ретинопатии наиболее существенно с возрастом изменялась экспрессия генов, участвующих в модуляции иммунного ответа, и генов внеклеточного матрикса. Такие результаты хорошо согласуются с исследованиями других авторов, выявивших изменения экспрессии генов воспалительного ответа, цитокиновой активности и внеклеточного матрикса с возрастом в различных тканях многих видов животных (Chen et al. 2008, Chen et al. 2010, Landis et al. 2012, Zahn et al. 2007, Cai et al. 2012).

Из 24 генов, экспрессия которых изменилась с возрастом и у крыс OXYS, и у крыс Вистар, у 5 генов уровень мРНК снижался с возрастом. Это гены *Igf2bp2* и *Igf2bp3*, кодирующие белки, которые связываются с 5'UTR мРНК гена инсулинподобного ростового фактора *Igf2* и регулируют его трансляцию, а также гены *Colla1*, *Colla2*, *Col3a1*, кодирующие структурные компоненты внеклеточного матрикса. Интересно, что при исследовании клеточного старения клеток РПЭ человека (РПЭ340, РПЭ341) в культуре было выявлено снижение уровня мРНК генов *Colla1*, *Colla2*, *Col3a1* и повышение уровня мРНК гена *Igf2bp2*, одного из модуляторов биодоступности инсулинподобного ростового фактора *Igf2* (Shelton et al. 1999). Поскольку *Igf2bp2* и *Igf2bp3* регулируют трансляцию мРНК гена *Igf2*, снижение их экспрессии с возрастом в сетчатке крыс может свидетельствовать об увеличении количества белка Igf2.

Специфичность возрастных изменений транскрипционного профиля в зависимости от генотипа линии показана ранее (Carter et al. 2005, Jelcick et al. 2011, Shelton et al. 1999). Так, в исследовании Carter с соавт. (2005) было выявлено, что паттерны изменений транскриптома с возрастом в гиппокампе и сетчатке близкородственных сублиний преждевременно стареющих мышей SAMP8 и SAMP10 отличаются не только от паттерна линий C57BL/6J и SAMR с нормальным темпом старения, но и между собой. Во всех 4 линиях сходным образом была изменена экспрессия только одного транскрипта (AI845165). Анализ транскриптома с помощью

микрочипов в сетчатке мышей линий C57BL/6/J, AKR/J, CAST/EiJ, и NOD.NON-H2-nb1 в ранний постнатальный период показал, что развитие сетчатки этих линий зависит от генотипа и сопровождается изменением уровня мРНК более 3000 генов (Jelcick et al. 2011). Кроме того, было показано, что возрастные изменения транскриптома тканеспецифичны. Zahn с соавт. (2007) выявили большую гетерогенность в количестве измененных с возрастом транскриптов в разных тканях мышей, среди которых сетчатка заняла второе место после тимуса по числу измененных транскриптов.

В целом полученные данные позволяют предположить, что механизмы ускоренного старения сетчатки крыс OXYS отличны от механизмов, задействованных в «нормальном», физиологическом старении.

Мы показали, что по уровню мРНК многих генов в сетчатке крысы OXYS существенно отличаются от крыс Вистар. При этом оказалось, что и в 3 месяца, и в 18 месяцев 70% от общего числа генов с измененным уровнем мРНК составляют гены со сниженной экспрессией. Это нетипичная ситуация, поскольку при оценке изменений транскриптома сетчатки на большинстве биологических моделей ВМД исследователи выявляют увеличение уровня мРНК подавляющего большинства ДЭ генов (Chen et al. 2010). Однако в сетчатке преждевременно стареющих мышей SAMP8, являющихся моделью спонтанной ВМД, как и в нашем исследовании, уровень мРНК большинства ДЭ генов (76%) снижен (Carter et al. 2005). Авторы работы объясняют выявленный феномен следующим образом: при нормальном старении запускается некий триггерный механизм(ы), который активирует транскрипцию генов адаптивного ответа на старение, а у мышей SAMP8 этот процесс нарушен, вместо индукции происходит репрессия транскрипции (Carter et al. 2005).

Независимо от возраста и патологических изменений в сетчатке крыс OXYS была снижена экспрессия мРНК многих регуляторов и эффекторов иммунной системы, таких, как маркеры лейкоцитов, хемокины, цитокины, компоненты комплемента, интерферон-индуцируемые белки и компоненты МНС (главного комплекса гистосовместимости). Например, в возрасте 18 месяцев было выявлено резкое снижение экспрессии гена *Nlrp6* (-38), который является негативным регулятором воспаления и иммунной защиты организма в целом (Anand et al. 2012).

Профиль экспрессии генов иммунного ответа свидетельствует о подавлении воспалительных реакций в сетчатке крыс OXYS. Так, в возрасте 3 месяцев у крыс OXYS

сочетанно изменена экспрессия 26 генов ответа на интерферон- γ , в их числе ген *Gbp5* (guanylate binding protein 5), уровень мРНК которого снижен в 5 раз, транскрипционные факторы *Irf1* и *Irf7* (interferon regulatory factor) и их эффекторы: цитокины *Tnf*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Oasl*, *Oasl1a*, *Ifit1*, *Ifit2*, *Ifit3* и др. (**рис. 25**). Интерферон- γ продуцируется Т-клетками и натуральными киллерами в ответ на чужеродные антигены. Он индуцирует дифференцировку миелоидных клеток из костного мозга в зрелые моноциты, активирует макрофаги. Закономерно встает вопрос о воспалении в сетчатке у крыс Вистар. Поскольку у крыс Вистар ретинопатия не развивается вплоть до 24 месяцев включительно, мы полагаем, что наблюдаемые уровни мРНК генов иммунного ответа у крыс Вистар являются базальными и оптимальными для соответствующего возраста, а их уровни у крыс OXYs снижены.

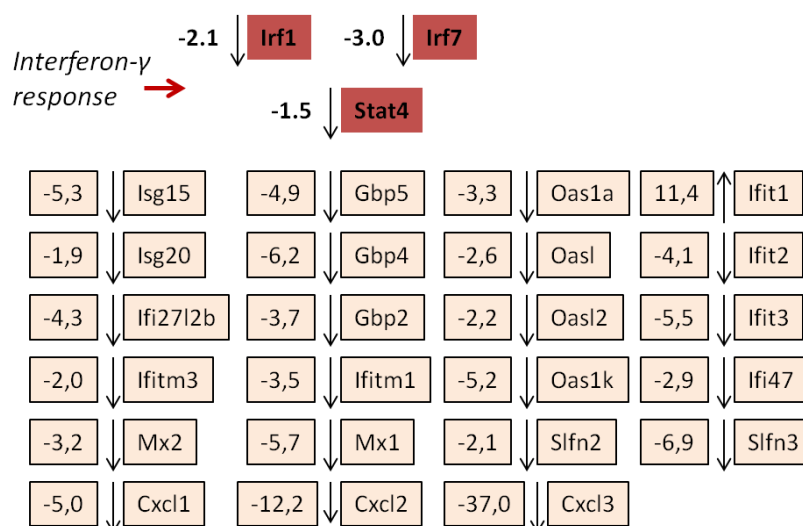


Рисунок 25. Дифференциально экспрессирующиеся гены ответа на интерферон - γ у крыс OXYs в возрасте 3 месяцев.

Белок *Gbp5* стимулирует активацию NLRP3 инфламмосомы при инфекции. У мышей-нокауты *Gbp5* $^{-/-}$ обнаружено пониженное содержание сывороточных цитокинов *Il1b* и *Il18*, дефекты расщепления каспазы-1 и связанные с ними нарушения иммунной защиты организма от патогенов (Shenoy et al. 2012). Экспрессия гена провоспалительного цитокина *Il18* также снижена у крыс OXYs в 3 месяца в 2 раза, в 18 месяцев в 3 раза. У мышей-нокауты *Irf1* $^{-/-}$ выявлено снижение количества зрелых CD8 $^{+}$ (позитивных) клеток в тимусе и периферических лимфатических органах (Penninger et al. 1997). Интересно, что в тимусе крыс OXYs по сравнению с крысами Вистар также снижено количество CD8 $^{+}$ клеток (Obukhova et al. 2009). Таким образом,

сниженный профиль коэкспрессии генов иммунного ответа у крыс OXYS находит подтверждение в литературе, посвященной исследованию эффектов изменения их экспрессии на других модельных объектах.

Иммунная система. Растет число фактов, свидетельствующих о важной роли иммунной системы в патогенезе ВМД (Forrester J.V. 2013, Patel, Chan 2008). Исследования ПГАА выявили локусы, связанные с иммунным ответом, которые имеют строгую ассоциацию с ВМД: *CFH*, *Fb/C2*, *C3*, *C5*, локус *HLA*, *CX3CR1*, *CCR3*, *TLR3* и *TLR4* (Hageman et al. 2005, Tuo et al. 2012, Zarepari et al. 2005). Отложения друз и поражения сетчатки при ВМД могут инициировать воспалительные реакции, а также сигнальные каскады врожденного и адаптивного иммунного ответа, такие как высвобождение цитокинов/хемокинов, рекрутирование макрофагов, миграция микроглии в субретинальное пространство и активация комплемента (Tuo et al. 2012). Похожие воспалительные механизмы задействованы в патогенезе других дегенеративных заболеваний, характеризующихся накоплением внеклеточных отложений, в том числе - болезни Альцгеймера и атеросклероза (Cai et al. 2012a, Akiyama et al. 2000, Mullins et al. 2000, Anderson et al. 2004, Song et al. 2001, Kumar et al. 2011). Постулируется, что усиленное накопление друз вызывает локальное воспаление, которое может спровоцировать системный иммунный ответ (Hageman et al. 2001, Damico et al. 2012). Однако ситуация сложнее, так как экспрессионный профиль, характерный для воспаления, был обнаружен в РПЭ/хориоиде человека и в отсутствии друз на стадии, которую авторы обозначили как «потенциальную» стадию ВМД (Newman et al. 2012). Было показано, что у мышей дикого типа РПЭ и хориоидея при старении становятся иммунологически активными тканями. Из них поступают сигналы привлечения лейкоцитов и активации комплемента (Chen et al. 2008). Предполагается, что привлеченные лейкоциты (макрофаги, лимфоциты, гранулоциты) необходимы для удаления накопленных продуктов жизнедеятельности. Эти возрастные изменения могут стать причиной возникновения ошибки в регуляции иммунной активности, приводя к развитию патологий сетчатки. Chen с соавт. (2008) полагают, что генетические дефекты в системе комплемента не приводят к развитию ВМД до тех пор, пока возрастные изменения в сетчатке не приводят к повышению ее иммунореактивности. Это означает, что воспаление и активация каскада комплемента могут быть причиной друзогенеза, а не его следствием (Forrester J.V. 2013, Mullins et al. 2000).

Ситуация со снижением экспрессии паттерна генов иммунной системы в сетчатке крыс OXYS противоположна той, что наблюдалась в сетчатке у мышей AJ, модели ВМД: экспрессия соответствующих генов у них была повышена (Mustafi et al. 2012). Недавно Newman с соавт. (2012) идентифицировал более 50 генов, связанных с иммунным ответом, экспрессия которых в РПЭ/хориоиде постмортальных образцов сетчатки человека с диагнозом ВМД повышена. В частности, они обнаружили повышение экспрессии генов комплемента и главного комплекса гистосовместимости при развитии ВМД. С другой стороны, есть работы, показывающие, что дефицит эффекторов иммунной системы также может приводить к патологическим изменениям сетчатки. Например, модели мышей с нокаутом ассоциированных с ВМД генов (*Cfh*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-} и *Ccl2*^{-/-}/*Cx3cr1*^{-/-}), с нарушением рекрутинга макрофагов проявляют многие признаки ВМД: накопление в сетчатке друзоподобных отложений, липофусциновых гранул и факторов комплемента (Ramkumar et al. 2010, Ambati et al. 2003). По-видимому, на ранних стадиях ВМД, макрофаги исполняют роль «уборщиков» друз и пораженных клеток (Ding et al. 2009). Считается, что как снижение, так и чрезмерно активное повышение экспрессии хемокинов могут указывать на нарушение миграции макрофагов в пораженную ткань. Фенотип *Ccl2*^{-/-} и *Ccr2*^{-/-} мышей предполагает защитную роль макрофагов в патогенезе ВМД. Дефицит хемокинов приводит к нарушению миграции и прикрепления макрофагов к местам поражения сетчатки, что приводит к накоплению отложений (Ambati et al. 2003). Сниженный профиль экспрессии генов иммунной системы у крыс OXYS также может объясняться недостаточным привлечением макрофагов в сетчатку вследствие угнетения хемотаксиса и нарушения их адгезии к эндотелию сосудов.

Известно, что снижение функциональных резервов иммунной системы вносит существенный вклад в процесс старения и развитие связанных с ним заболеваний. В наибольшей степени при старении изменяется тимусзависимое звено иммунитета, включающее сам тимус и популяцию развивающихся в нем Т-клеток (Обухова и др. 2013). При этом снижается фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов. Воспалительный ответ, опосредуемый системой комплемента и цитокинами, является механизмом защиты организма против патогенов и инфицированных клеток со сложной системой регуляции (Damico et al. 2012). Ранее у крыс OXYS был обнаружен низкий уровень реакции гиперчувствительности замедленного типа, свидетельствующий о

нарушениях Т-клеточного звена иммунной системы на фоне ускоренной инволюции тимуса (Маркова и др. 2003). Возможно, наблюдаемая у крыс OXYS ускоренная инволюция тимуса приводит к функциональной недостаточности периферических Т-лимфоцитов, что в свою очередь провоцирует системный иммунный дисбаланс, который создает специфическое окружение для развития у крыс OXYS ретинопатии как одного из проявлений их преждевременного старения. В таком случае динамика изменений экспрессии генов иммунной системы может отражать состояние иммунодефицита при преждевременном старении крыс OXYS - прогрессирующее и генерализованное снижение иммунных функций организма: уменьшение массы тимуса, снижение численности CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов на периферии, активация процессов гранулопоэза в костном мозге и нарушение функциональной активности макрофагов, Т-лимфоцитов и NK-клеток (Obukhova et al. 2009, Sauce et al. 2011).

Найденные изменения экспрессии «иммунных» генов в сетчатке крыс OXYS укладываются в рамки концепции паравоспаления, вклад которого в патогенез ВМД в настоящее время активно обсуждается. Паравоспаление, или низкоинтенсивное воспаление, определяется как промежуточное состояние между базовым уровнем и острой воспалительной реакцией, как адаптивный ответ ткани на постоянный стресс, направленный на поддержание гомеостаза ткани (Xu et al. 2009, Parmeggiani et al. 2012). Дисрегуляция паравоспаления как в сторону гиперфункции, так и гипофункции иммунной системы может быть причиной или, по крайней мере, сопутствующим процессом при ВМД. Таким образом, наблюдаемый профиль экспрессии генов иммунной системы у крыс OXYS можно охарактеризовать как неполноценное воспаление.

Ответ на стресс. У крыс OXYS изменена экспрессия ключевых генов ответа на стресс. Среди них гены участников JNK каскада - активируемого стрессом киназного сигнального пути (*Tnf*, *Il1a*, *Wnt7b*, *Il1rn*, *Cbs*, *Myd88* и *RGD1306565*) - и гены кристаллинов α , β , и γ - семейств. Функция кристаллинов заключается в защите белков от неправильного сворачивания и агрегации, т.е. они являются шаперонами. Экспрессия генов, кодирующих кристаллины, существенно снижена в сетчатке крыс OXYS по данным анализа Cufflinks. Вместе с тем для них был обнаружен высокий разброс значений количества прочтений между образцами. Из-за высокого разброса,

анализ DESeq не рассматривает кристаллины в качестве ДЭ генов. Вариации в экспрессии этих генов были обнаружены также при проверке ПЦР-РВ на независимой выборке. Однако средний уровень мРНК генов кристаллинов у крыс OXYS был всегда ниже уровня крыс Вистар. Большие индивидуальные различия в экспрессии генов семейства кристаллинов в сетчатке были показаны ранее (Xi et al. 2003). Высокая вариабельность в содержании транскриптов генов, кодирующих кристаллины в сетчатке, корреляция их уровня между образцами может объясняться заносом материала хрусталика при выделении сетчатки (Kamphuis et al. 2007). Ранее снижение экспрессии генов, кодирующих α -кристаллины, было выявлено в хрусталиках крыс OXYS во время развития катаракты, что может частично объяснить полученные данные (Rumyantseva et al. 2008). Тем не менее в литературе имеются данные в пользу возможности независимого от хрусталика снижения их экспрессии в сетчатке. Во-первых, кристаллины обнаруживаются в числе генов с самой высокой экспрессией в сетчатке у мышей (Mustafi et al. 2012). Во-вторых, изменения экспрессии кристаллинов были показаны на различных моделях ретинопатии. Например, повышенный уровень транскриптов генов кристаллинов в сетчатке выявлен при диабетической ретинопатии и при экспериментальном увеите (Kandpal et al. 2012, Xu et al. 2003, Kamphuis et al. 2007). В третьих, известно, что шаперонная активность кристаллинов в сетчатке снижается с возрастом, что может приводить к накоплению неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме и последующей лизосомальной дисфункции (Kerr et al. 2010). *In vitro* было показано, что кристаллины ингибируют каспазы и защищают клетки от индуцируемого перекисью водорода апоптоза (Kamradt et al. 2001). Показано, что при дефиците α -кристаллинов клетки РПЭ становятся восприимчивыми к апоптозу, индуцируемому окислительным стрессом (Yaung et al. 2007). Особенно интересным является тот факт, что причиной снижения уровня белков кристаллинов в сетчатке может быть хроническая гипоксия (Yaung et al. 2008). Как было сказано выше, при развитии ретинопатии у крыс OXYS увеличивается число хориокапилляров с признаками нарушения кровотока, что может приводить к гипоксическим поражениям сетчатки (Марковец А.М. 2011, Фурсова А.Ж. 2009).

В нашей работе мы показали, что не только уровень мРНК, но и уровень белка Cryab снижен в сетчатке крыс OXYS (*рис. 22*). Более того, иммуногистохимическое окрашивание препаратов сетчатки 4-месячных крыс OXYS и Вистар антителами к

Сгуаб, выполненное к.б.н. Т.В. Карамышевой в рамках совместного исследования, подтвердило результаты вестерн-блот анализа. Как видно на *рисунке 26*, интенсивный сигнал Сгуаб детектируется в РПЭ и ганглионарном слое сетчатки крыс обеих линий, однако в наружном и внутреннем ядерных слоях у крыс OXYS сигнал Сгуаб значительно слабее, чем у крыс Вистар.

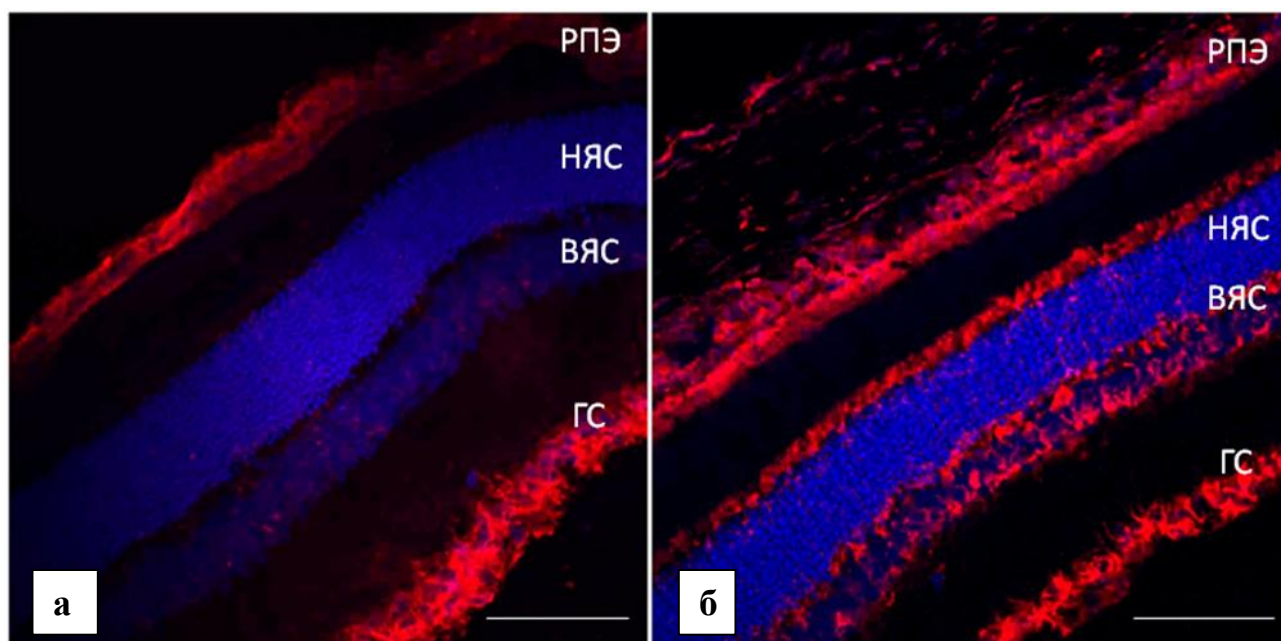


Рисунок 26. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов сетчатки 4-месячных крыс OXYS (а) и Вистар (б) антителами к Сгуаб (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Фотографии предоставлены к.б.н. Т.В. Карамышевой.

Окислительный стресс. В настоящее время не вызывает сомнений, что в патогенезе ВМД участвует окислительный стресс, вероятность которого при старении растет на фоне ослабления системы антиоксидантной защиты и увеличения генерации АФК (Jarrett, Boulton 2012, Synowiec et al. 2013). Неудивительно, что мы обнаружили межлинейные различия в экспрессии генов, дисбаланс которых может приводить к окислительному стрессу. Отметим, что большинство изменений в экспрессии генов ответа на окислительный стресс специфичны для крыс OXYS в возрасте 18 месяцев. Иначе говоря, наши данные укладываются в современные представления о том, что окислительный стресс в большей степени не причина, а следствие старения (Barrientos A. 2012). Среди генов со сниженной экспрессией были кодирующие антиоксидантные ферменты, катализирующие реакции с восстановленным глутатионом (*Gpx2* и *Gstm4*) и оксиредуктазы из семейства тиоредоксина (*Glrx1* и *Txn1*), которые регулируют тиоловый редокс-статус клетки (Yoshihara et al. 2010). Сниженная экспрессия этих генов

у крыс OXYS может обуславливать повышенное накопление окислительных повреждений белков и липидов, зарегистрированное ранее (Sinitsyna et al. 2005, Kolosova et al. 2006), подтверждая высокую чувствительность крыс OXYS к окислительному стрессу. Например, уровень мРНК гена *Nqo1* снижен у крыс OXYS в 2,5 раза в 3 месяца и в 4,3 раза - в 18 месяцев. Ген *Nqo1* кодирует фермент NAD(P)H-хинон оксиредуктазу (ЕС 1.6.99.2) – облигатный двухэлектронный восстановитель широкого спектра субстратов, включающих хиноны, хинонимины и нитросоединения (Siegel et al. 2004). Восстанавливая хиноны до гидрохинонов, обладающих антиоксидантными свойствами, белок Nqo1 предотвращает образование супероксиданиона и перекиси водорода (Zhu et al. 2007). Доказано, что белок Nqo1 служит «скавенджером» супероксид аниона в цитозольной мембране (Siegel et al. 2004). Клетки с избытком Nqo1 более устойчивы к повреждениям, вызванным митохондриальными токсинами, менее подвержены окислительному стрессу и апоптозу (Kim et al. 2013). Выявлена нейропротекторная роль белка Nqo1 в патогенезе болезни Альцгеймера: нейроны с повышенным уровнем Nqo1 не накапливают амилоидный пептид (Hyun et al. 2010). Интересно, что у нокаутных по этому гену мышей потеря активности фермента Nqo1 приводит к изменению внутриклеточного редокс-статуса в направлении увеличения NAD(P)H, снижению уровня пиридиновых нуклеотидов, нарушениям в метаболизме углеводов и липидов, приводящим к снижению количества жировой ткани и, соответственно, массы тела животных (Gaikwad et al. 2001). Характерно, что у крыс OXYS масса тела меньше, чем у крыс Вистар и в 3, и 18 месяцев (Kolosova et al. 2012a). Также у *Nqo1*–/– мышей обнаружено увеличение количества гранулоцитарно-макрофагальных предшественников в костном мозге, которое наблюдается и у крыс OXYS, начиная с возраста 12 месяцев (Орловская и др. 2007).

RNA-seq выявил у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар согласованное снижение экспрессии генов сериновых протеаз и в 3, и в 18 месяцев. Известна роль сериновых протеаз в функционировании ЦНС. При становлении нервной системы сериновые протеазы участвуют в миграции клеток, росте аксонов и удалении не сформировавших контакты синапсов. Во взрослом организме они играют роль в нейрональной пластичности, связанной с обучением и памятью (Almonte et al. 2011). Нарушения протеолиза ассоциированы со многими нейродегенеративными заболеваниями (Molinari et al. 2003). В сетчатке сериновые протеазы посредством

протеолиза внеклеточных компонентов матрикса участвуют в ремоделировании мембраны Бруха, необходимом для поддержания ее избирательной проницаемости и для осуществления обмена между хориокапиллярами и клетками РПЭ (Booij et al. 2010). Неожиданно, но экспрессия генов, кодирующих белки серпины - ингибиторы сериновых протеаз, также оказалась значимо сниженной в сетчатке крыс OXYS. Серпины регулируют множество клеточных процессов, включая фагоцитоз, коагуляцию, фибринолиз и клеточную адгезию (Almonte et al. 2011, Molinari et al. 2003). Недавно при исследовании протеома сетчатки больных ВМД были обнаружены изменения белкового состава внеклеточного матрикса, соотношения протеазы/ингибиторы, указывающие на нарушения структурной целостности и дисфункции сосудов хориоидеи (Yuan et al. 2010). Принимая во внимание, что в мозге крыс OXYS изменены состав и содержание протеогликанов (Ryкова et al. 2011), а также уровни экспрессии генов ферментов их синтеза и метаболизма (Шевелев и др. 2012), вполне закономерно, что экспрессия генов, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса, была изменена и в сетчатке.

В сетчатке крыс OXYS мы выявили также изменения экспрессии генов, участвующих в превращениях ретиноевой кислоты и ее производных (*Rarres*, *Rbp3*, *Rbp2*, *Crabp1*, *Crabp2*, *Retsat*, *Rarg* и *Rdh8*). Эти данные согласуются с результатами исследования протеома РПЭ больных ВМД, в котором были найдены однонаправленные изменения уровня белков, участвующих в метаболизме ретиноевой кислоты (Nordgaard et al. 2006). Ретиноевая кислота контролирует дифференцировку, пролиферацию клеток и экспрессию генов через связывание с ядерными рецепторами. Активно обсуждается связь между метаболизмом ретиноевой кислоты и болезнью Альцгеймера (Goodman et al. 2003, Husson et al. 2006). Впервые влияние нарушения сигнального пути ретиноевой кислоты на накопление А β в мозге было выявлено на крысах Corcoran и соавт. (2004). Доступ ретиноевой кислоты к ядерным рецепторам в клетке напрямую зависит от уровня связывающих её белков, таких, как *Crabp1* и *Retsat*, экспрессия которых снижена у крыс OXYS. В опытах *in vitro* было показано, что отношение А β 42/А β 40 коррелирует с уровнем *Crabp1* (Uhrig et al. 2008). Интересно, что обработка культуры РПЭ амилоидом А β 40 приводила к снижению количества мРНК и белка *Crabp*, сходного по функциям с белком *Crabp1* (Yoshida et al. 2005). Белок *Retsat* восстанавливает all-транс-ретинол до all-транс-13,14-дигидроперинола и участвует в механизмах резистентности к стрессу (Nagaoka-Yasuda et al. 2007).

Обращает внимание тот факт, что многие ДЭ гены в сетчатке крыс OXYS кодируют белки, связывающие Ca^{2+} . В качестве возможной причины дисрегуляции экспрессии генов Ca^{2+} -связывающих белков в сетчатке крыс OXYS можно рассматривать изменения в сигнальном пути Wnt (*Wnt7b*, *Wnt10a*, *Wnt4* и *Sfrp4*), одной из функций которого является регуляция уровня свободного кальция в цитоплазме. В последних исследованиях обнаружено, что сигнальный путь Wnt участвует в метаболическом пути болезни Альцгеймера. Было показано, что блокирование Wnt-сигналинга приводит к нарушению протеолиза APP и гиперфосфолированию тау-белка, а его активация предотвращает цитотоксический эффект добавления к клеткам A β (Inestrosa et al. 2012).

По результатам RNA-seq к.б.н. А. В. Дорошковым была проведена реконструкция ассоциативных сетей регуляторных и белок-белковых взаимодействий между ДЭ генами в программе автоматического анализа текстов Pathway studio. Она выявила значительное количество связей между ДЭ генами, что заслуживает дальнейшего анализа, но в задачи настоящей работы не входило. Тем не менее, мы обратили внимание, что одним из узлов сети является белок-предшественник амилоида – APP (*рис. 27*).

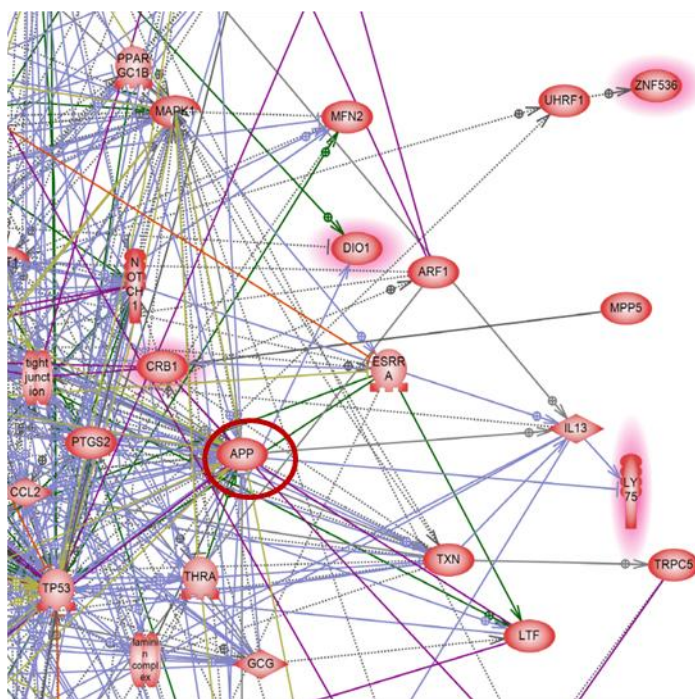


Рисунок 27. Фрагмент ассоциативной сети, образуемой ДЭ генами. Показан узел APP.

С нарушением процессинга APP связывают образование сенильных бляшек при болезни Альцгеймера, основной компонент которых - амилоидный пептид - продукт

расщепления APP. Среди ДЭ генов наиболее достоверно повышен уровень экспрессии у гена *Dio1* ($BX < 10^{-34}$), экспрессия которого в сетчатке ранее не исследовалась. Экспрессия *Dio1* повышена у крыс OXYS в 3 месяца в 7 раз, в 18 месяцев в 30 раз. Рассмотрим возможную связь ДЭ гена *Dio1* с APP. Ген *Dio1* (type 1 iodothyronine deiodinase) кодирует фермент дейодиназу, которая катализирует удаление остатка йода из молекулы тироксина Т4 с образованием либо активной формы трийодтиронина Т3, либо неактивного метаболита rТ3. Таким образом, *Dio1* регулирует баланс тиреоидных гормонов, которые участвуют в метаболизме всех тканей в организме (Maia et al. 2012). Что касается сетчатки крыс, то неизвестно, какая форма тиреоидного гормона образуется при катализе ферментом *Dio1* – активная Т3 или неактивная rТ3. Известно, что баланс тиреоидных гормонов влияет на нейродегенеративные процессы. Было показано, что Т3 ингибирует транскрипционную активность гена APP (Belakavadi et al. 2011, Contreras-Jurado et al. 2012). У гипотиреоидных мышей уровень APP в разных отделах мозга повышен (Contreras-Jurado et al. 2012). В мозге больных Альцгеймером обнаружены низкий уровень тиреоидных рецепторов и пониженная конверсия Т4 в Т3. Сообщается, что в спинной жидкости больных страдающих болезнью Альцгеймера снижен уровень Т3 и повышен уровень неактивной формы rТ3, при этом в сыворотке крови уровень тиреоидных гормонов не отличается от нормы (Sampaolo et al. 2005). Феномен «локального гипотирозидизма» в мозге больных Альцгеймером объясняется патологической активностью дейодиназ, в частности *Dio1* (Belakavadi et al. 2011). У нас есть предположение, что резкое повышение экспрессии *Dio1* у крыс OXYS в 18 месяцев может приводить к накоплению продукта расщепления APP – амилоидного пептида в сетчатке.

Важно отметить, что результаты анализа экспрессии генов-кандидатов в сетчатке с помощью целевого ДНК-микрочипа и методом RNA-seq согласуются для большинства генов. Однако небольшие различия (20-60%) для ряда генов, найденные микрочипами, методом RNA-seq не были выявлены. Не выявлено изменений и в степени гибридизации с зондом *Nos2*, который согласно RNA-seq является ДЭ геном. Причины такого расхождения результатов не совсем понятны. Поскольку эксперименты были разделены по времени, различия в оценке уровней мРНК могли быть обусловлены неодинаковой выраженностью патологических изменений сетчатки у крыс OXYS в возрасте 3 месяцев. На результатах могла сказаться специфика разработанных микрочипов - использование

олигонуклеотидных зондов, соответствующих 3' концу мРНК. Также необходимо иметь в виду существенные различия в принципах методов RNA-seq и ДНК-микрочипов.

Неполную сходимость данных, полученных на микрочипах и RNA-seq, отмечают многие авторы (Asmann et al. 2009, Fu et al. 2009, Malone et al. 2011). Несовпадение результатов оценки уровня мРНК разными методами отражает сложность регуляции транскриптома клетки, его высокую чувствительность к изменяющимся условиям среды. Поэтому при исследованиях транскриптома критично использование образцов, полученных в одно и то же время в одинаковых условиях, и различающихся только по изучаемому параметру (линия, возраст, препарат). Использование в качестве контроля профилей экспрессии, полученных ранее, особенно другим методом, приводит к искажению результатов. Более того, изменения экспрессии гена на уровне транскрипции и трансляции могут быть разнонаправленными, т.е. содержание мРНК в ткани может быть высоким при пониженном содержании белкового продукта. С учётом ограничений для каждой из технологий в настоящее время признано, что оба метода, основанные на разных принципах гибридизации и секвенирования, должны рассматриваться как комплементарные, а не конкурирующие способы исследования экспрессии генов (Kogenaru et al. 2012, Liu et al. 2007, Hornshøj et al. 2009, Merrick et al. 2013, Nookaew et al. 2012).

Содержание и локализация амилоидного пептида Аβ в сетчатке крыс Вистар и OXYS

Сетчатка является периферическим отделом зрительного анализатора мозга, и поэтому изменения в ней в определенной степени отражают происходящие в мозге нейродегенеративные процессы (Dasari et al. 2011). В настоящее время широко обсуждается наличие общих патогенетических механизмов ВМД и болезни Альцгеймера (Chiu et al. 2012, Dasari et al. 2011, Dentchev et al. 2003, Kaarniranta et al. 2011, Ohno-Matsui 2011, Yoshida et al. 2005). Как и болезнь Альцгеймера, ВМД характеризуется отложениями Аβ и ассоциирована с изменениями в работе системы комплемента и ApoE (Laws et al. 2003, Loeffler et al. 2008). Окислительный стресс и воспаление участвуют в патогенезе обоих заболеваний (Kaarniranta et al. 2011). Оба заболевания строго зависят от возраста. Основной патологический признак болезни Альцгеймера - образование в мозге сенильных бляшек, внеклеточных отложений с высоким содержанием амилоидного пептида Аβ. Первоначально в сетчатке больных

ВМД Аβ был обнаружен в составе друз (Johnson et al. 2002, Mullins et al. 2000, Luibl et al. 2006). Кроме того, в их составе были обнаружены другие белки и липиды, которые также присутствуют в сенильных бляшках у пациентов с болезнью Альцгеймера (Booij et al 2010, Mullins et al. 2000). Было показано, что Аβ токсичен для клеток РПЭ и его накопление влияет на экспрессию генов (Yoshida et al. 2005).

Как признаки ускоренного старения мозга крыс OXYS рассматриваются характерные для стареющих людей и животных изменения поведения, снижение исследовательской активности, способности к ассоциативному обучению и памяти (Kolosova et al. 2009, Stefanova et al. 2011, Stefanova et al. 2010, 2013). Эти признаки формируются на фоне прогрессирующих с возрастом нейродегенеративных процессов в мозге и характерных для хронической ишемии изменений церебральных сосудов (Агафонова и др. 2007). Мы показали, что локусы QTL, ассоциированные с развитием ретинопатии у крыс OXYS, обогащены генами, участвующими в нейродегенеративных процессах. С помощью анализа ДНК-микрочипов в сетчатке крыс OXYS были найдены изменения в экспрессии генов *Picalm* и *Arpa2*, участвующих в метаболическом пути болезни Альцгеймера. Одним из узлов ассоциативной сети, образуемой ДЭ генами по данным RNA-seq, является белок-предшественник амилоида APP. Полученные результаты и анализ литературы подтолкнули нас к непосредственному измерению содержания амилоида в сетчатке.

Результаты измерения содержания амилоида в сетчатке методами ИФА и иммуногистохимии показали повышение вдвое содержания патологической изоформы амилоида Аβ42 у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар. Мы полагаем, что усиленное накопление Аβ42 в клетках РПЭ отражает нарушения гомеостатических взаимодействий между клетками РПЭ, мембраной Бруха и наружными сегментами фоторецепторов. Особенно важным для нас оказалось появление сигнала Аβ42 во внутренних слоях сетчатки, в участках с выраженными нейродегенеративными изменениями, что свидетельствует о том, что усиленное накопление Аβ42 участвует в патогенезе ретинопатии крыс OXYS.

Нарушения процессинга APP считается одним из основных механизмов развития болезни Альцгеймера. Однако до сих пор не известно, каким образом Аβ приводит к гибели нейронов (Kaarniranta et al. 2011). Согласно одной из рассматриваемых версий, накопление амилоидных отложений приводит к чрезмерной активации

периваскулярных макрофагов и клеток микроглии, двух основных типов фагоцитов в ЦНС, которые присутствуют в ткани мозга больных Альцгеймером (Yazawa et al. 2001). Механизмы удаления А β фагоцитирующими клетками тесно связаны с локальными воспалительными реакциями, которые могут быть цитотоксичными для окружающих клеток (Mandrekar et al. 2009, Rogers et al. 2001). Клетки микроглии при болезни Альцгеймера, активированные клетки РПЭ и макрофаги при ВМД секретируют сходные медиаторы воспаления (Kaarniranta et al. 2011). Мы также обнаружили А β 42-позитивные моноклеарные фагоциты вблизи РПЭ и во внутренних слоях сетчатки. Очевидно, существует связь между накоплением А β и нарушениями функциональности иммунной системы крыс OXYS.

Следует отметить, что параллельно данной работе было выявлено усиленное накопление с возрастом А β 42 в гиппокампе и коре головного мозга крыс OXYS (Stefanova et al. 2013). Такие результаты подтверждают гипотезу об общности механизмов нейродегенеративных изменений в мозге и сетчатке при развитии ретинопатии у крыс OXYS, и, можно полагать, болезни Альцгеймера и ВМД у людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из полученных нами результатов, определенный вклад в генетический контроль развития у крыс OXYS ретинопатии, аналогичной ВМД, вносят локусы QTL 1-й хромосомы. Согласно результатам биоинформатического анализа, эти локусы обогащены генами, связанными с нейродегенерацией, в них значимо представлены гены из пути болезни Альцгеймера. С помощью разработанного для отобранных из локусов QTL генов-кандидатов олигонуклеотидного ДНК-микрочипа установлено, что в сетчатке крыс OXYS изменен уровень мРНК генов *Picalm* и *Arpa2*, продукты которых участвуют в процессинге белка-предшественника амилоида APP.

Исследование транскриптома сетчатки крыс, впервые выполненное методом RNA-seq, позволило выявить общие и специфичные для крыс Вистар и OXYS изменения экспрессии генов с возрастом, определить молекулярно-генетические пути, с которыми ассоциировано развитие ретинопатии у крыс OXYS. Патологические изменения сетчатки развиваются у крыс OXYS на фоне дисбаланса экспрессии генов, связанных с иммунной системой, воспалением, окислительным стрессом, Ca^{2+} гомеостазом и апоптозом. Одним из узлов ассоциативной сети, образуемой генами, дифференциально экспрессирующимися по данным RNA-seq, оказался APP, что также указывает на связь развития ретинопатии у крыс OXYS с изменениями в метаболическом пути болезни Альцгеймера. Существование такой связи подтвердили измерения содержания амилоида в сетчатке методами ИФА и иммуногистохимии, которые показали, что в сетчатке крыс OXYS уровень патологической изоформы амилоида A β 42 вдвое выше, чем у крыс Вистар. Важно, что усиление сигнала A β 42 обнаружено во внутренних слоях сетчатки крыс OXYS с выраженными нейродегенеративными изменениями. Мы полагаем, что усиленное накопление A β 42 в клетках РПЭ отражает нарушения гомеостатических взаимодействий между клетками РПЭ, мембраной Бруха и наружными сегментами фоторецепторов. Полученные результаты подтверждают адекватность крыс OXYS как модели ВМД и открывают возможности для исследования механизмов патогенеза, лежащих в основе двух комплексных заболеваний – болезни Альцгеймера и ВМД.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что ретинопатия развивается у крыс обеих конгенных линий: WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2, более выражено - у крыс WAG/OXYS-1.2.
2. Функциональная аннотация локусов QTL 1-й хромосомы, ассоциированных с развитием признаков преждевременного старения у крыс OXYS, выявила их обогащение генами, связанными с нейродегенерацией и патогенезом болезни Альцгеймера.
3. Разработан олигонуклеотидный ДНК-микрочип для измерения экспрессии генов-кандидатов из локусов QTL 1-й хромосомы. С помощью ДНК-микрочипов в сетчатке крыс OXYS выявлены изменения экспрессии генов *Picalm* и *Arpa2*, продукты которых связаны с процессингом белка-предшественника амилоида APP.
4. Впервые проведен анализ возрастных изменений транскриптома сетчатки крыс OXYS и Вистар методом RNA-seq и определены гены, экспрессия которых изменяется с возрастом и при развитии ретинопатии у крыс OXYS.
5. С возрастом в сетчатке крыс OXYS и Вистар изменяется экспрессия более 100 генов, большинство из них связаны с иммунной системой и внеклеточным матриксом. Из них только 24 гена - общие для крыс OXYS и Вистар.
6. Ретинопатия у крыс OXYS развивается на фоне изменения в сетчатке уровня мРНК более 600 генов по сравнению с крысами Вистар, основная часть которых связана с иммунным ответом, воспалением, окислительным стрессом, Ca^{2+} гомеостазом и апоптозом. Для 15 генов измененная экспрессия подтверждена методом ПЦР в реальном времени.
7. У крыс OXYS развитие ретинопатии сопряжено с усиленным накоплением в сетчатке амилоида $\text{A}\beta_{42}$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова И.Г., Колосова Н.Г., Мищенко Н.П., Чайкина Е.Л., Стоник В.А. Влияние гистохрома на состояние сосудов головного мозга и поисково-исследовательскую активность преждевременно стареющих крыс линии OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2007. – № 4. – С.446-450.
2. Аксенович Т.И. Картирование генов, детерминирующих распространенные болезни человека // Мед. генетика. – 2006. – №2. – С. 11-15.
3. Аульченко Ю.С., Аксенович Т.И. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10. – № 1. – Р. 189-202.
4. Бакарев М.А., Непомнящих Л.М. Структурные проявления нарушений митохондриальной функции в скелетных мышцах у преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2004. – Т.138. – №12. – С.674-679.
5. Баранов В. С., Глотов О. С., Баранова Е. В. Геномика старения и предиктивная медицина // Успехи геронтол. – 2010. – Т. 23. – № 3. – С. 329–338.
6. Вреугденхил Д., Коорнэф М., Сергеева Л.И. Применение QTL-анализа в физиологических исследованиях. Физиология растений. – 2007. – №54. – С.15-21.
7. Ермилов В.В., Тюренков И.Н., Нестерова А.А., Загребин В.Л. Болезнь Альцгеймера и геронтоофтальмологические заболевания в аспекте амилоидогенеза // Архив патологии. – 2013. – Т. 75. – № 2. – С. 37-42.
8. Жданкина А.А., Кон Г.А., Плотников М.Б., Варакута Е.Ю., Логвинов С.В., Просенко А.Е., Колосова Н.Г. Исследование нейроретинопротекторной активности тиафана при инволюционной хориоретинальной дегенерации крыс линии OXYS // Бюлл. сибирской медицины. – 2013. – Т. 12. – № 3. – С. 24–31.
9. Жданкина А.А., Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Колосова Н.Г., Фурсова А.Ж., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Логвинов С.В. Морфологические аспекты применения полусинтетического антиоксиданта диборнола при инволюционной центральной хориоретинальной дегенерации у крыс линии OXYS // Бюлл. сибирской медицины. – 2009. – № 3. – С.27-32.
10. Жданкина А.А., Фурсова А.Ж., Логвинов С.В., Колосова Н.Г. Клинико-морфологические особенности хориоретинальной дегенерации у преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2008. – № 10. – С. 435–437.
11. Колосова Н.Г., Айдагулова С.В., Непомнящих Г.И. Динамика структурно-функциональных изменений митохондрий гепатоцитов преждевременно стареющих крыс линии OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2001. – Т.132. – №8. – С.235-240.
12. Колосова Н.Г., Куторгин Г.Д., Сафина А.Ф. Особенности минерализации костной ткани преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2002. – Т.133. – С.203-206.
13. Колосова Н.Г., Лебедев П.А., Фурсова А.Ж., Морозкова Т.С., Гусаревич О.Г. Преждевременно стареющие крысы OXYS как модель сенильной катаракты человека // Успехи геронтол. – 2003. – №12. – С. 143-148.

14. Колосова Н.Г., Щеглова Т.В., Амстиславская Т.Г., Лоскутова Л.В. Сравнительный анализ содержания продуктов перекисного окисления липидов в структурах мозга крыс Вистар и OXYS разного возраста // Бюлл. эксперим. биол. – 2003. – Т. 136. – С. 467-471.
15. Лоскутова Л.В., Колосова Н.Г. Эмоциональный статус и способность к однократному обучению у крыс линии OXYS с наследственно повышенной способностью к радикалообразованию // Бюлл. эксперим. биол. – 2000. – Т.130. – № 8. – С. 155-158.
16. Маркова Е.В., Обухова Л.А. Показатели активности клеточного звена иммунного ответа крыс линий Вистар и OXYS и особенности их поведения в тесте «открытое поле» // Бюлл. эксперим. биол. – 2003. – Т.136. – №12. – С. 427-429.
17. Марковец А.М. Возрастные изменения экспрессии генов Vegfa и Pcdh при развитии дистрофии сетчатки у крыс OXYS. Дис. канд. биол. наук. – Новосибирск. – 2011. – 151 с.
18. Меньщикова Е.Б., Шабалина И.Г., Зенков Н.К., Колосова Н.Г., Панин Л.Е. Регистрация генерации активированных кислородных метаболитов ферментативными системами преждевременно стареющих крыс линии OXYS методами хемилюминесцентного анализа // Бюлл. СО РАМН. – 2000. – № 3-4 (97-98). – С. 43-50.
19. Непомнящих Л.М., Семёнов Д.Е., Соловьёва Н.А., Салганик Р.И. Клеточные механизмы генетически детерминированной гипертрофической кардиомиопатии у крыс линии W/SSM // Бюлл. эксперим. биол. – 1994. – Т.118. – №11. – С.547–551.
20. Обухова Л. А., В. Б. Вайс, Л. Е. Бакеева, С. В. Сергеева, Н. Г. Колосова. Структурно-функциональные основы ускоренной инволюции тимуса у крыс OXYS // Успехи геронтол. – 2013. – Т. 26. – № 2. – С. 229-235.
21. Ойдопова (Кожевникова) О.С., Польшгалова Н.Е., Корболина Е.Е., Колосова Н.Г. Поиск генетических детерминант преждевременного старения крыс OXYS // Успехи геронтол. – 2008. – Т. 21. – № 3. – С. 499–500.
22. Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Феофанова Н.А., Колосова Н.Г. Особенности костномозгового гемопоэза у преждевременно стареющих крыс OXYS // Бюлл. эксперим. биол. – 2007. – Т. 144. – № 4. – С. 96-99.
23. Островский М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения // Успехи биол. химии. – 2005. – Т. 45. – С. 173-204.
24. Панин Л.Е., Шалбуева Н.И., Максимов В.Ф., Поляков Л.М., Зенков Н.К., Колосова Н.Г. Структурные изменения и особенности окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс линии OXYS // Биологические мембраны. – 2004. – Т. 21. – №1. – С.33-38.
25. Пузырев В.П. Генетика мультифакториальных заболеваний: между прошлым и будущим // Мед. генетика. – 2003. – Т.2. – №12. – С.498-508.
26. Сапрунова В.Б. Ультраструктура митохондрий в условиях окислительного стресса: Дис. док. биол. наук. – Москва. – 2008. – 262 с.
27. Сапрунова В.Б., Лелекова М.А., Колосова Н.Г., Бакеева Л.Е. SkQ1 замедляет развитие деструктивных процессов в сетчатке и стареющих крыс Wistar и OXYS // Биохимия (Москва). – 2012. – Т.77. – №6. – С.796-808.

28. Сапрунова В.Б., Пилипенко Д.И., Алексеевский А.В., Фурсова А.Ж., Колосова Н.Г., Бакеева Л.Е. Динамика липофусциновых гранул при развитии макулодистрофии, зависимой от возраста // Биохимия (Москва). – 2010. – Т. 75. – №2. – С. 158-168.
29. Свешникова А.Н., Иванов П.С. Экспрессия генов и микрочипы: проблемы количественного анализа // Рос. хим.ж. – 2007. – №1. – С.127-134.
30. Соловьева Н.А., Морозкова Т.С., Салганик Р.И. Получение сублинии крыс с признаками наследственной галактоземии и исследование их биохимических особенностей // Генетика. – 1975. – Т.18. – №5. – С.63-71.
31. Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонифицированная медицина // Acta naturae. – 2010. – Т.2. – № 4. – С.18-34.
32. Стефанова Н.А., Жданкина А.А., Фурсова А.Ж., Колосова Н.Г. Перспективы использования мелатонина для профилактики возрастной макулярной дегенерации: экспериментальное исследование // Успехи геронтол. – 2012. – Т. 26. – № 1. – С. 122-129.
33. Фаламеева О.В., Садовой М.А., Храпова Ю.В., Колосова Н.Г. Структурно-функциональные изменения костной ткани позвоночника и конечностей крыс OXYS // Хирургия позвоночника. – 2006. – Т.1. – С.88-94.
34. Фурсова А.Ж. Хориоретинальная дистрофия: особенности развития у преждевременно стареющих крыс охус и её коррекция митохондриальным антиоксидантом: Дис. док. мед. наук. – Новосибирск. – 2009. – 189 с.
35. Фурсова А.Ж., Гусаревич О.Г., Гончар А.М. и др. Экстракт черники в профилактике макулярной дегенерации и катаракты у крыс OXYS // Успехи геронтол. – 2005. – №16. – С. 76-79.
36. Шабалина И.Г., Колосова Н.Г., Гришанова А.Ю., Соловьева Н.А., Соловьев В.Н., Салганик Р.И. Активность окислительного фосфорилирования, F0F1-АТФ-азы и содержание цитохромов митохондрий печени крыс с врожденным повышением способности радикалообразования // Биохимия. – 1995. – Т.60. – №12. – С. 45-52.
37. Шевелев О.Б., Рыкова В.И., Федосеева Л.А., Леберфарб Е.Ю., Дымшиц Г.М., Колосова Н.Г. Экспрессия Ext1, Ext2 и гепараназы в мозге преждевременно стареющих крыс OXYS в период раннего онтогенеза и развития нейродегенеративных изменений // Биохимия (Москва). – 2012. – Т. 77. – №1. – С. 71 – 78.
38. Aerts S., Lambrechts D., Maity S., Van Loo P., Coessens B., De Smet F., Tranchevent L.C., De Moor B., Marynen P., Hassan B., Carmeliet P., Moreau Y. Gene prioritization through genomic data fusion // Nat Biotechnol. – 2006. – V.24. – N.5. – P. 537-544.
39. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Kolosova N.G., Stonik V.A. Comparative study on hypertension-induced cerebral vascular alterations in two rat lines by magnetic resonance angiography // Appl Magn Reson. – 2012. – N. 42. – P. 487–497.
40. Akiyama H., Barger S., Barnum S. et al. Inflammation and Alzheimer's disease // Neurobiol Aging. – 2000. – V.21. – N. 3. – P.383–421.
41. Allen A.E., Cameron M.A., Brown T.M., Vugler A.A., Lucas R.J. Visual responses in mice lacking critical components of all known retinal phototransduction cascades // PLoS One. – 2010. – V.29. – 5(11):e15063.

42. Almonte A.G., Sweatt J.D. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior // *Brain Res.* – 2011. – N. 1407. – P.107-122.
43. Ambati J., Anand A., Fernandez S., et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice // *Nat Med.* – 2003. – V.9. – N. 11. –P.1390-1397.
44. Anand P.K., Malireddi R.K.S., Lukens J.R. et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens // *Nature.* – 2012. –V.488. – N. 7411. – P.389–393.
45. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data // *Genome biol.* – 2010. –N. 11(10):R106.
46. Anderson D.H., Mullins R.F., Hageman G.S., Johnson L.V. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye // *Am J Ophthalmol.* – 2002. – V.134. – N. 3. – P. 411–431.
47. Anderson D.H., Radeke M.J., Gallo N.B., Chapin E.A., Johnson P.T., Curletti C.R., Hancox L.S. et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis revisited // *Prog Retin Eye Res.* – 2010. – V. 29(2). – P.95-112.
48. Anderson D.H., Talaga K.C., Rivest A.J., Barron E., Hageman G.S., Johnson L.V. Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration // *Exp Eye Res.* – 2004. – V. 78(2). – P.243-256.
49. Ansorge W.J. Next-generation DNA sequencing techniques // *N Biotechnol.* – 2009. – V. 25(4). – P.195-203.
50. Ardeljan D., Chan C.C. Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging // *Prog Retin Eye Res.* – 2013 [Epub ahead of print].
51. AREDS (Age-related eye disease study research group). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8 // *Arch. Ophthalmol.* – 2001. – V. 119. – P. 1417–1437.
52. AREDS (Age-related eye disease study research group). The effect of five-year zinc supplementation on serum zinc, serum cholesterol and hematocrit in persons randomly assigned to treatment group in the age-related eye disease study: AREDS Report No. 7 // *J Nutr.* – 2002. – V. 132(4). – P.697-702.
53. Asmann Y.W., Klee E.W., Thompson E.A., Perez E.A., Middha S., Oberg A.L., Therneau T.M., Smith D.I., Poland G.A., Wieben E.D., Kocher J.P. 3' tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer // *BMC Genomics.* – 2009. – V.10:531.
54. Aspinall R., Mitchell W. Reversal of age-associated thymic atrophy: treatments, delivery, and side effects // *Exp Gerontol.* – 2008. – V. 43(7). – P.700-705.
55. Baig S., Joseph S.A., Tayler H., Abraham R., Owen M.J., Williams J., Kehoe P.G., Love S. Distribution and expression of Picalm in Alzheimer disease // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2010. – V. 69(10). – P.1071-7.
56. Barrientos A. Complementary roles of mitochondrial respiration and ROS signaling on cellular aging and longevity // *Aging (Albany NY).* – 2012. – V. 4(9). – P. 578–9
57. Barouch F.C., Miller J.W. The role of inflammation and infection in age-related macular degeneration // *Int Ophthalmol Clin.* – 2007. – V.47 (2). – P. 185-197.

58. Barz B., Urbanc B. Dimer formation enhances structural differences between amyloid β -protein (1-40) and (1-42): an explicit-solvent molecular dynamics study // PLoS One. – 2012. – V. 7(4):e34345.
59. Bashir A., Bansal V., Bafna V. Designing deep sequencing experiments: detecting structural variation and estimating transcript abundance // BMC Genomics. – 2010. – V.11:385.
60. Belakavadia M., Dell J., Grover G.J., Fondell J.D. Thyroid hormone suppression of amyloid precursor protein gene expression in the brain involves multiple epigenetic regulatory events // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2011. – N.339. – P. 72–80.
61. Bennett S., Barnes C., Cox A., Davies L., Brown C. Toward the 1,000 dollars human genome // Pharmacogenomics. – 2005. – V.6. – P. 373–382.
62. Ben-Shlomo G., Ofri R., Bandah D., Rosner M., Sharon D. Microarray-based gene expression analysis during retinal maturation of albino rats // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2008. – V.246. – P. 693–702.
63. Bhutto I.A., Baba T., Merges C., Juriasinghani V., McLeod D.S., Luttly G.A. C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration // Br J Ophthalmol. – 2011. – V. 95(9). – P. 1323-1330.
64. Biesemeier A., Schraermeyer U., Eibl O. Chemical composition of melanosomes, lipofuscin and melanolipofuscin granules of human RPE tissues // Exp Eye Res. – 2011. – V. 93(1). – P. 29-39.
65. Blalock E.M., Chen K.C., Sharrow K., Herman J.P., Porter N.M., Foster T.C., Landfield P.W. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment // J Neurosci. – 2003. – N. 23(9). – P. 3807-3819.
66. Bobko A.A., Sergeeva S.V., Bagryanskaya E.G., Markel A.L., Khramtsov V.V., Reznikov V.A., Kolosova N.G. 19F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and OXYS rats // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 330(2). – P. 367-370.
67. Bodmer W., Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. – Nat Genet. – 2008. – V. 40(6). – P. 695-701.
68. Bolstad B.M. Low Level Analysis of High-density oligonucleotide array data: Background, normalization and summarization. – 2004. In PhD Thesis. – University of California at Berkeley, Department of Statistics.
69. Bonilha V.L. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium // Clinical ophthalmology (Auckland, NZ). – 2008. – N.2. – P. 413–424.
70. Booij J.C., Baas D.C., Beisekeeva J., Gorgels T.G., Bergen A.A. The dynamic nature of Bruch's membrane // Prog Retin Eye Res. – 2010. – V. 29(1). – P. 1-18.
71. Botstein D., Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease // Nat Genet. – 2003. – V.33. – P. 228-237.
72. Boulton M.E., Qi X., Kanda A. et al. ARMS2 association with the mitochondrial outer membrane is reduced in RPE cells exposed to oxidative stress and in AMD // ARVO. – 2012. – V. 476: Program number 5301.
73. Bressler S.B., Muñoz B., Solomon S.D., West S.K. Salisbury Eye Evaluation (SEE) Study Team. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project // Arch Ophthalmol. – 2008. – V. 126(2). – P.241-5.

74. Brooks M.J., Rajasimha H.K., Roger J.E., Swaroop A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl (-/-) retinal transcriptomes // *Mol Vis.* – 2011. – V.17. – P. 3034–54.
75. Bullard J.H., Purdom E., Hansen K.D., Dudoit S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments // *BMC Bioinformatics.* – 2010. – V.11:94.
76. Burden C.J., Pittelkow Y.E., Wilson S.R. Statistical Analysis of Adsorption Models for Oligonucleotide Microarrays // *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology.* – 2003. – N. 3. Article 35.
77. Burger C., Lopez M.C., Baker H.V., Mandel R.J., Muzyczka N. Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus // *Neurobiol Learn Mem.* – 2008. – N. 89(4). – P. 379-396.
78. Cai D., Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF-Kb // *Aging (Albany NY).* – 2012a. – V. 4(2). – P. 98-115.
79. Cai H., Fields M.A., Hoshino R., Priore L.V. Effects of aging and anatomic location on gene expression in human retina // *Front Aging Neurosci.* – 2012. – V.4:8.
80. Cardona A.E., Pioro E.P., Sasse M.E., Kostenko V., Cardona S.M., Dijkstra I.M., Huang D. et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor // *Nat Neurosci.* – 2006. – V. 9(7). – P. 917-24.
81. Carter T.A., Greenhall J.A., Yoshida S., Fuchs S., Helton R., Swaroop A., Lockhart D.J., Barlow C. Mechanisms of aging in senescence-accelerated mice // *Genome Biol.* – 2005. – V. 6(6):R48.
82. Cavallotti C., Artico M., Pescosolido N., Leali F.M.T., Feher J. Age-related changes in the human retina // *Canadian journal of ophthalmology.* – 2004. – V. 39. – P. 61–8.
83. Chakravarthy U., Augood C., Bentham G.C., de Jong P.T., Rahu M., Seland J., Soubrane G. et al. Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study // *Ophthalmology.* – 2007a. – V. 114(6). – P. 1157-63.
84. Chakravarthy U., Wong T.Y., Fletcher A., Piau E., Evans C., Zlateva G., Buggage R., Pleil A., Mitchell P. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis // *BMC Ophthalmol.* – 2010. – V.10:31.
85. Chan C.C., Tuo J., Bojanowski C.M., Csaky K.G., Green W.R. Detection of CX3CR1 single nucleotide polymorphism and expression on archived eyes with age-related macular degeneration // *Histol Histopathol.* – 2005. – V. 20(3). – P. 857-63.
86. Chang B., Hawes N.L., Hurd R.E., Davisson M.T., Nusinowitz S., Heckenlively J.R. Retinal degeneration mutants in the mouse // *Vision Res.* – 2002. – V. 42(4). – P. 517-25.
87. Chang B., Mandal M.N., Chavali V.R., Hawes N.L., Khan N.W., Hurd R.E., Smith R.S. et al. Age-related retinal degeneration (arrd2) in a novel mouse model due to a nonsense mutation in the Mdm1 gene // *Hum Mol Genet.* – 2008. – V. 17(24). – P. 3929-41.
88. Chen H., Liu B., Lukas T.J., Neufeld A.H. The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration // *PLoS One.* – 2008. – V. 3(6):e2339.
89. Chen M., Forrester J.V., Xu H. Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice // *PLoS One.* – 2011. – V. 6(8):e22818.

90. Chen M., Muckersie E., Forrester J.V., Xu H. Immune activation in retinal aging: a gene expression study // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – V. 51(11). – P. 5888–96.
91. Chen Z., McGee M., Liu Q. A Distribution-Free Convolution Model for background correction of oligonucleotide microarray data // *BMC genomics.* – 2009. – V. 10. – P. 19.
92. Chiu K., Chan T-F., and Wu A. et al. Neurodegeneration of the retina in mouse models of Alzheimer's disease: what can we learn from the retina? *Age (Dordr).* – 2012. – V.34. – P. 633–49.
93. Choe S.E., Boutros M., Michelson A.M. et al. Preferred analysis methods for Affymetrix genechips revealed by a wholly defined control dataset // *Genome Biol.* – 2005. – V.6:R16.
94. Chong N.H., Keonin J., Luthert P.J., Frennesson C.I., Weingeist D.M., Wolf R.L., Mullins R.F., Hageman G.S. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration // *Am J Pathol.* – 2005. – V. 166(1). – P. 241-51.
95. Chowers I., Liu D., Farkas R.H., Gunatilaka T.L., Hackam A.S., Bernstein S.L., Campochiaro P.A., Parmigiani G., Zack D.J. Gene expression variation in the adult human retina // *Hum Mol Genet.* – 2003. – V. 12(22). – P. 2881-93.
96. Clemons T.E., Rankin M.W., McBee W.L. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Cognitive impairment in the Age-Related Eye Disease Study: AREDs report no. 16 // *Arch Ophthalmol.* – 2006. – V. 124(4). – P. 537-43.
97. Cookson W., Liang L., Abecasis G., Moffatt M., Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression // *Nat Rev Genet.* – 2009. – V. 10(3). – P. 184-94.
98. Coffey P.J., Gias C., McDermott C.J., Lundh P., Pickering M.C., Sethi C., Bird A., Fitzke F.W. et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104(42). – P.16651-6.
99. Combadière C., Feumi C., Raoul W., Keller N., Rodéro M., Pézard A., Lavalette S., Houssier M. et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration // *J Clin Invest.* – 2007. – V. 117(10). – P. 2920-8.
100. Contreras-Jurado C., Pascual A. Thyroid hormone regulation of APP (b-amyloid precursor protein) gene expression in brain and brain cultured cells // *Neurochemistry International.* – 2012. – N. 60. – P. 484–487.
101. Corcoran J.P., So P.L., Maden M. Disruption of the retinoid signaling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain // *Eur J Neurosci.* – 2004. – N. 20. – P. 896-902.
102. Crabb J., Miyagi M., Gu X., Shadrach K., West K., Sakeguchi H., Kamei M., et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – V. 99. – P. 14682–14687.
103. Damico F.M., Gasparin F., Scolari M.R., Pedral L.S., Takahashi B.S. New approaches and potential treatments for dry age-related macular degeneration // *Arq Bras Oftalmol.* – 2012. – V. 75(1). – P. 71–6.
104. Danciger M., Yang H., Ralston R., Liu Y., Matthes M.T., Peirce J., Lavail M.M. Quantitative genetics of age-related retinal degeneration: a second F1 intercross between the A/J and C57BL/6 strains. // *Mol. Vis.* – 2007. – V.13. – P. 79–85.

105. Dasari B., Prasanthi J.R., Marwarha G. et al. Cholesterol-enriched diet causes age-related macular degeneration-like pathology in rabbit retina // *BMC Ophthalmol.* – 2011. – V.11:22.
106. Davis M.D., Gangnon R.E., Lee L.Y., Hubbard L.D., Klein B.E., Klein R., Ferris F.L., Bressler S.B., Milton R.C.; Age-Related Eye Disease Study Group. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17 // *Arch Ophthalmol.* – 2005. – V. 123(11). – P.1484-98.
107. de Brevern A.G., Hazout S., Malpertuy A. Influence of microarrays experiments missing values on the stability of gene groups by hierarchical clustering // *BMC Bioinformatics.* – 2004. – V.5:114.
108. De Jong PT V.M. Age-related macular degeneration // *The New England journal of medicine.* – 2006. – V. 355. – P. 1474–85.
109. Degner J.F., Marioni J.C., Pai A.A., Pickrell J.K., Nkadori E., Gilad Y., Pritchard J.K. Effect of read-mapping biases on detecting allele-specific expression from RNA-sequencing data // *Bioinformatics.* – 2009. – V.25. – P. 3207–3212.
110. Dentchev T., Milam A.H., Lee V.M.-Y. et al. Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas // *Mol Vis.* – 2003. – V. 9. – P. 184–90.
111. Dewan A., Liu M., Hartman S., Zhang S.S., Liu D.T., Zhao C., Tam P.O., Chan W.M., Lam D.S., Snyder M., Barnstable C., Pang C.P., Hoh J. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration // *Science.* – 2006. – V.314. – N. 5801. – P. 989-92.
112. Ding J-D., Johnson L.V., Herrmann R. et al. (2011) Anti-amyloid therapy protects against retinal pigmented epithelium damage and vision loss in a model of age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V.108:E279–87.
113. Ding X., Patel M., Chan C. Molecular pathology of age-related macular degeneration // *Prog Retin Eye Res.* – 2009. – Vol. 28. – P. 1-18.
114. Donoso L.A., Kim D., Frost A., Callahan A., Hageman G. The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration // *Surv Ophthalmol.* – 2006. – N.51(2). – P. 137-152.
115. Doyle S.L., Campbell M., Ozaki E. et al. NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components // *Nat Med.* – 2012. – V. 18 (5). – P. 791–798.
116. Dunne A. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection // *Biochem Soc Trans.* – 2011. – V. 39 (2). – P. 669–673.
117. Edwards A.O., Ritter 3rd R., Abel K.J., Manning A., Panhuysen C., Farrer L.A. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration // *Science.* – 2005. – V. 308. – N. 5720. – P. 421–424.
118. Ehrlich R., Harris A., Kheradiya N.S., Winston D.M., Ciulla T.A., Wirotko B. Age-related macular degeneration and the aging eye // *Clinical interventions in aging.* – 2008. – V.3. – P. 473–82.
119. Evans J.R., Henshaw K. Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2008. (1):CD000253.

120. Farkas M.H., Grant G.R., White J.A., Sousa M.E., Consugar M.B., Pierce E.A. Transcriptome analyses of the human retina identify unprecedented transcript diversity and 3.5 Mb of novel transcribed sequence via significant alternative splicing and novel genes // *BMC Genomics*. – 2013. – V. 14(1):486.
121. Feher J., Kovacs I., Artico M., Cavallotti C., Papale A., Balacco Gabrieli C. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration // *Neurobiology of aging*. – 2006. – V. 27. – P. 983–993.
122. Feigl B. Age-related maculopathy - linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis // *Prog Retin Eye Res*. – 2009. – V. 28(1). – P. 63-86.
123. Ferris F.L., Davis M.D., Clemons T.E. et al. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS report no. 18 // *Arch Ophthalmol* // – 2005. – V. 123(11). – P.1570–1574.
124. Finnemann S.C., Leung L.W., Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – V. 99 (6). – P. 3842–3847.
125. Forrester J.V. Bowman lecture on the role of inflammation in degenerative disease of the eye // *Eye* (London, England). – 2013.
126. Fritsche L.G., Chen W., Schu M., Yaspan B.L., Yu Y., Thorleifsson G., Zack D.J., Arakawa S. et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration // *Nat Genet*. 2013. – V. 45(4). – P.433-9
127. Fritsche L.G., Loenhardt T., Janssen A., Fisher S.A., Rivera A., Keilhauer C.N., Weber B.H. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA // *Nat Genet*. – 2008. – V. 40(7). – P. 892-6.
128. Fu X., Fu N., Guo S., Yan Z., Xu Y., Hu H., Menzel C., Chen W., Li Y., Zeng R., Khaitovich P. Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics // *BMC Genomics*. – 2009. – V.10:161.
129. Furusawa C., Ono N., Suzuki S., Agata T., Shimizu H., Yomo T. Model based analysis of non-specific binding for background correction of high-density oligonucleotide microarrays // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25. – №1. – P. 36-41
130. Fuse N., Miyazawa A., Mengkegale M., Yoshida M., Wakusawa R., Abe T., Tamai M. Polymorphisms in Complement Factor H and Hemicentin-1 genes in a Japanese population with dry-type age-related macular degeneration // *Am J Ophthalmol*. – 2006. – V. 142(6). – P. 1074-6.
131. Gaikwad A., Long D.J. 2nd, Stringer J.L., Jaiswal A.K. In vivo role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the regulation of intracellular redox state and accumulation of abdominal adipose tissue // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276(25). – P. 22559-64.
132. Gamsiz E.D., Ouyang Q., Schmidt M., Nagpal S., Morrow E.M. Genome-wide transcriptome analysis in murine neural retina using high-throughput RNA sequencing // *Genomics*. – 2012. – V. 99(1). – P. 44–51.
133. Gass J.D. Drusen and disciform macular detachment and degeneration // *Trans Am Ophthalmol Soc*. – 1972. – V.70. – P. 409–436.
134. Gehrs K.M., Anderson D.H., Johnson L.V., Hageman G.S. Age-related macular degeneration – emerging pathogenetic and therapeutic concepts // *Ann Med*. – 2006. – V. 38(7). – P. 450-71.
135. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments // *Nat Rev Genet*. – 2012. – V. 13(2). – P. 135-45.

136. Gibson J., Hakobyan S., Cree A.J., Collins A., Harris C.L., Ennis S., Morgan B.P., Lotery A.J. Variation in complement component C1 inhibitor in age-related macular degeneration // *Immunobiology*. – 2012. – V. 217(2). – P. 251-5.
137. Goodman AB, Pardee AB: Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease // *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:2901-2905.
138. Gracia-Aznarez F.J., Fernandez V., Pita G., Peterlongo P., Dominguez O., de la Hoya M., Duran M. et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles // *PLoS One*. – 2013. – V. 8(2):e55681.
139. Gray D.A., Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste // *Sci Aging Knowledge Environ*. – 2005. – V.5:re1.
140. Guo Y., Sheng Q., Li J., Ye F., Samuels D.C., Shyr Y. Large scale comparison of gene expression levels by microarrays and RNAseq using TCGA data // *PLoS One*. – 2013. – P. 8(8):e71462.
141. Haddad S., Chen C.A., Santangelo S.L., Seddon J.M. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date // *Surv Ophthalmol*. – 2006. – V. 51(4). – P. 316-63.
142. Hageman G., Luthert P., Chong N., Johnson L., Anderson D., Mullins R. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration // *Prog Retin Eye Res*. – 2001. – V. 20(6). – P. 705–732.
143. Hageman G.S., Anderson D.H., Johnson L.V. et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – V. 102(20). – P. 7227–7232.
144. Hageman G.S., Anderson D.H., Johnson L.V., Hancox L.S., Taiber A.J., Hardisty L.I., Hageman J.L. et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – V. 102(20). – P.7227-32.
145. Haines J.L., Hauser M.A., Schmidt S. et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration // *Science*. – 2005. – V. 308 (5720). – P. 419–421
146. Hansen K.D., Brenner S.E., Dudoit S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming // *Nucleic Acids Res*. – 2010. – V.38 (12):e131.
147. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radicals and radiation biology // *J Gerontol*. – N.11. – P. 298-300.
148. Harold D., Abraham R., Hollingworth P., Sims R., Gerrish A., Hamshere M.L., Pahwa J.S. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease // *Nat Genet*. – 2009. – V.41 (10). – P.1088-93
149. He X., Hahn P., Iacovelli J., Wong R., King C., Bhisitkul R., Massaro-Giordano M., Dunaief J.L. Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration // *Prog Retin Eye Res*. – 2007. – V. 26(6). – P. 649-73.
150. Hemminki K., Försti A., Bermejo J.L. The 'common disease-common variant' hypothesis and familial risks // *PLoS One*. – 2008. – V. 3(6):e2504.
151. Hindorff L.A., Sethupathy P., Junkins H.A., Ramos E.M., Mehta J.P., Collins F.S., Manolio T.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – V. 106(23). – P. 9362-7.

152. Hogan M.J. Role of the retinal pigment epithelium in macular disease // *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* – 1972. – N.76 (1). – P. 64–80.
153. Hoh Kam J., Lenassi E., Jeffery G. Viewing ageing eyes: diverse sites of amyloid Beta accumulation in the ageing mouse retina and the up-regulation of macrophages // *PloS One.* – 2010.
154. Hornshøj H., Bendixen E., Conley L.N., Andersen P.K., Hedegaard J., Panitz F., Bendixen C. Transcriptomic and proteomic profiling of two porcine tissues using high-throughput technologies // *BMC Genomics.* – 2009. – N.10:30.
155. Hosokawa M., Abe T., Higuchi K., Shimakawa K., Omori Y., Matsushita T., Kogishi K., Deguchi E., Kishimoto Y., Yasuoka K., Takeda T. Management and design of the maintenance of SAM mouse strains: an animal model for accelerated senescence and age-associated disorders // *Exp Gerontol.* – 1997. – N. 32. – P. 111-116.
156. Hosokawa M., Ueno M. Aging of blood-brain barrier and neuronal cells of eye and ear in SAM mice // *Neurobiol Aging.* – 1999. – N. 20. – P. 117-123.
157. Huang da W., Sherman B.T., Zheng X., Yang J., Imamichi T., Stephens R., Lempicki R.A. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID // *Curr Protoc Bioinformatics.* – 2009. – Chapter 13. – Unit 13.11.
158. Huang Q.-Y., Li G.H.Y., Cheung W.M.W. et al. Prediction of osteoporosis candidate genes by computational disease-gene identification strategy // *J Hum Genet.* – 2008. – N. 53. – P. 644–55.
159. Hughes A.E., Orr N., Esfandiary H., Diaz-Torres M., Goodship T., Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration // *Nat Genet.* – 2006. – V. 38(10). – P. 1173-7.
160. Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M. et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer // *Nat Biotechnol.* – 2001. – V. 19(4). – P. 342-7.
161. Hur J.Y., Teranishi Y., Kihara T., Yamamoto N.G., Inoue M., Hosia W., Hashimoto M., Winblad B., Frykman S., Tjernberg L.O. Identification of novel γ -secretase-associated proteins in detergent-resistant membranes from brain // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287(15). – P. 11991-2005.
162. Husson M., Enderlin V., Delacourte A., Ghenimi N., Alfos S., Pallet V., Huguieret P. Retinoic acid normalizes nuclear receptor mediated hypo-expression of proteins involved in beta-amyloid deposits in the cerebral cortex of vitamin A deprived rats // *Neurobiol Dis* 2006, 23:1-10.
163. Hyun D.H., Mughal M.R., Yang H., Lee J.H., Ko E.J., Hunt N.D., de Cabo R., Mattson M.P. The plasma membrane redox system is impaired by amyloid β -peptide and in the hippocampus and cerebral cortex of 3xTgAD mice // *Exp Neurol.* – 2010. – V. 225(2). – P. 423-9.
164. Iijima K., Liu H.P., Chiang A.S., Hearn S.A., Konsolaki M., Zhong Y. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – V. 101(17). – P. 6623-8.
165. Irizarry R.A., Warren D., Spencer F., Kim I.F., Biswal S., Frank B.C., Gabrielson E., Garcia J.G. et al. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms // *Nat Methods.* – 2005. – V. 2(5). – P. 345-50.
166. Ito Y.N., Mori K., Young-Duvall J., Yoneya S. Aging changes of the choroidal dye filling pattern in indocyanine green angiography of normal subjects // *Retina (Philadelphia, Pa).* – 2001. – N. 21. – P. 237–42.

167. Jakobsdottir J., Conley Y.P., Weeks D.E., Mah T.S., Ferrell R.E., Gorin M.B. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26 // *Am J Hum Genet.* – 2005. – V. 77. – P. 389–407.
168. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis // *Ann N Y Acad Sci.* – 1993. – N.695. – P.144-8.
169. Jarrett S.G., Boulton M.E. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration // *Mol Aspects Med.* – 2012. – V. 33(4). – P. 399-417.
170. Jelcick A.S., Yuan Y., Leehy B.D., Cox L.C., Silveira A.C., Qiu F., Schenk S., Sachs A.J., Morrison M.A., Nystuen A.M., DeAngelis M.M., Haider N.B. Genetic variations strongly influence phenotypic outcome in the mouse retina // *PLoS One.* – 2011. – N. 6(7):e21858.
171. Jiang H., Qu Y., Dang G., Zhang X., Yin N., Zhang Y., Bi H., Pan X., Xu X., Zhou F., Dai H. Analyses of single nucleotide polymorphisms and haplotype linkage of LOC387715 and the HTRA1 gene in exudative age-related macular degeneration in a Chinese cohort // *Retina.* – 2009. – V. 29(7). – P. 974-9.
172. Johnson L.V., Forest D.L., Banna C.D. et al. Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V. 108 (45). – P. 18277–18282.
173. Johnson L.V., Ozaki S., Staples M.K., Erickson P.A., Anderson D.H. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation // *Exp Eye Res.* – 2000. – V. 70 (4). – P. 441–449.
174. Johnson L.V., Leitner W.P., Rivest A.J. et al. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – V.99. – P. 11830–5.
175. Kaarniranta K., Hyttinen J., Ryhanen T., Viiri J., Paimela T., Toropainen E., Sorri I., Salminen A. Mechanisms of protein aggregation in the retinal pigment epithelial cells // *Front Biosci (Elite Ed).* – 2010. – N.2. – P.1374-84.
176. Kaarniranta K., Kauppinen A. Salminen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes // *Aging (Albany NY).* – 2012. – V. 4(3). – P.166-75.
177. Kaarniranta K., Salminen A., Haapasalo A., Soininen H., Hiltunen M. Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? // *J Alzheimers Dis.* – 2011. – V. 24(4). – P. 615-31.
178. Kamei M., Hollyfield J.G. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – V. 40(10). – P. 2367-75.
179. Kameya S., Hawes N.L., Chang B., Heckenlively J.R., Naggert J.K., Nishina P.M. Mfrp, a gene encoding a frizzled related protein, is mutated in the mouse retinal degeneration 6 // *Hum Mol Genet.* – 2002. – V. 11(16). – P. 1879-86.
180. Kamphuis W., Dijk F., Kraan W., Bergen A.A.B. Transfer of lens-specific transcripts to retinal RNA samples may underlie observed changes in crystallin-gene transcript levels after ischemia // *Mol Vis.* – 2007. – N.13. – P. 220–8.
181. Kamradt M.C., Chen F., Cryns V.L. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276(19). – P.16059–63.
182. Kanda A., Chen W., Othman M., Branham K.E., Brooks M., Khanna R., He S., Lyons R., Abecasis G.R., Swaroop A. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly

associated with age-related macular degeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104(41). – P. 16227-32.

183. Kandpal R.P., Rajasimha H.K., Brooks M.J. et al. Transcriptome analysis using next generation sequencing reveals molecular signatures of diabetic retinopathy and efficacy of candidate drugs // *Mol Vis.* – 2012. – N.18. – P. 1123–46.

184. Kashani A.H., Zimmer-Galler I.E., Shah S.M., Dustin L., Do D. V., Elliott D., Haller J.A., Nguyen Q.D. Retinal thickness analysis by race, gender, and age using Stratus OCT // *American journal of ophthalmology.* – 2010. – N.149. – P. 496–502.e1.

185. Kato T., Iwamoto K., Kakiuchi C., Kuratomi G., Okazaki Y. Genetic or epigenetic difference causing discordance between monozygotic twins as a clue to molecular basis of mental disorders // *Mol. Psychiatry.* – 2005. doi:10.1038/sj.mp.4001662

186. Kawai S.I., Vora S., Das S., Gachie E., Becker B., Neufeld A.H. Modeling of risk factors for the degeneration of retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion in rats: effects of age, caloric restriction, diabetes, pigmentation, and glaucoma // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 1285–7.

187. Kemeleva E.A., Sinitsyna O.I., Kolosova N.G., Vasyunina E.A., Zharkov D.O., Conlon K.A., Berrios M., Nevinsky G.A. Immunofluorescent detection of 8-oxoguanine DNA lesions in liver cells from aging OXYS rats, a strain prone to overproduction of free radicals // *Mutat Res.* – 2006. – V. 599(1-2). – P.88-97.

188. Kerr B.A., Byzova T.V. alphaB-crystallin: a novel VEGF chaperone // *Blood.* – 2010. – V. 115(16). – P. 3181–3.

189. Kim J., Kim S.K., Kim H.K., Mattson M.P., Hyun D.H. Mitochondrial function in human neuroblastoma cells is up-regulated and protected by NQO1, a plasma membrane redox enzyme // *PLoS One.* – 2013. – V. 8(7):e69030.

190. Klaver C.C., Ott A., Hofman A., Assink J.J., Breteler M.M., de Jong P.T. Is age-related maculopathy associated with Alzheimer's disease? The Rotterdam Study // *Am J Epidemiol.* – 1999. – V. 150(9). – P. 963-8.

191. Klein R.J., Zeiss C., Chew E.Y. et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration // *Science.* – 2005. – V. 308. – N. 5720. – P. 385–389.

192. Kogenaru S., Qing Y., Guo Y., Wang N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling // *BMC Genomics.* – 2012. – V.15. – N.13:629.

193. Kolosova N.G., Muraleva N.A., Zhdankina A.A. et al. Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in rats // *Am J Pathol.* – 2012. – N. 181. – P. 472–7.

194. Kolosova N.G., Shcheglova T.V., Sergeeva S.V., Loskutova L.V. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats // *Neurobiol Aging.* – 2006. – V. 27(9). – P. 1289–97.

195. Kolosova N.G., Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P. The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats // *Aging (Albany NY).* – 2012a. – V. 4(10). – P. 686-94.

196. Kolosova N.G., Stefanova N.A., Sergeeva S. V. OXYS Rats: A Prospective Model for Evaluation of Antioxidant Availability in Prevention and Therapy of Accelerated Aging and Age-Related Cognitive

Decline // In: Gariépy Q and Ménard R, eds. *Handbook of Cognitive Aging: Causes, Processes and Effects*. – 2009. Nova Science Publishers, NY. – P. 47-82.

197. Korbolina E., Agafonova I., Sergeeva S., Trofimova N., Mishenko N., Kolosova N. 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.

198. 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. – N. 4. – P. 49–59.

199. Kortvely E., Hauck S.M., Duetsch G., Gloeckner C.J., Kremmer E., Alge-Priglinger C.S., Deeg C.A., Ueffing M. ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2010. – V. 51(1). – P.79-88.

200. 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. – V.12(11). – P. 1745-1761.

201. Kreil D.P., Russell R.R. There is no silver bullet—a guide to low-level data transforms and normalisation methods for microarray data // *Brief Bioinform.* – 2005. – N. 6(1). – P.86-97

202. Kumar S., Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – N. 3(8). – P.803-12.

203. Kurihara R., Yamaoka K., Sawamukai N. et al. C5a promotes migration, proliferation, and vessel formation in endothelial cells // *Inflamm Res*. – 2010. – V.59 (8). – P. 659–666.

204. Lakkaraju A., Finnemann S.C., Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – V.104 (26). – P. 11026–11031.

205. Landis G., Shen J., Tower J. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster* // *Aging (Albany NY)*. – 2012. – V. 4(11). – P.768–89.

206. Langdon W.B., Upton G.J., Harrison A.P. Probes containing runs of guanines provide insights into the biophysics and bioinformatics of Affymetrix GeneChips // *Briefings in bioinformatics*. – 2009. – V. 10. – N. 3. – P. 259-277.

207. Lappalainen Z., Lappalainen J., Oksala N.K., Laaksonen D.E., Khanna S., Sen C.K., Atalay M. J. Diabetes impairs exercise training-associated thioredoxin response and glutathione status in rat brain // *Appl Physiol*. – 2009. – V. 106(2). – P.461-7.

208. Laws S.M., Hone E., Gandy S., Martins R.N. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription // *J Neurochem*. – 2003. – N.84. – P.1215–36.

209. Lesage S., Zouali H., Cezard J.P. et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease // *Am. J. Hum. Genet*. – 2002. – V. 70. – N. 4. – P. 845–857.

210. Li B., Ruotti V., Stewart R.M., Thomson J.A., Dewey C.N. RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty // *Bioinformatics*. – 2010. – N. 26(4). – P.493-500.

211. Li M., Atmaca-Sonmez P., Othman M., Branham K.E., Khanna R., Wade M.S., Li Y., Liang L., Zarepari S., Swaroop A., Abecasis G.R. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration // *Nat Genet.* – 2006. – N. 38(9). – P.1049-54.
212. Liang W.S., Reiman E.M., Valla J., Dunckley T., Beach T.G., Grover A., Niedzielko T.L. et al. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – N. 105(11). – P. 4441-6.
213. Libby R.T., Gould D.B. Endoplasmic reticulum stress as a primary pathogenic mechanism leading to age-related macular degeneration // *Adv Exp Med Biol.* – 2010. – N. 664. – P.403-9.
214. Liu C.C., Kanekiyo T., Xu H., Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy // *Nat Rev Neurol.* – 2013. – N. 9(2). – P. 106-18.
215. Liu G., Zhang S., Cai Z., Ma G., Zhang L., Jiang Y., Feng R., Liao M., Chen Z., Zhao B., Li K. PICALM gene rs3851179 polymorphism contributes to Alzheimer's disease in an Asian population // *Neuromolecular Med.* – 2013. – N. 15(2). – P. 384-8.
216. Liu X.S. Getting Started in Tiling Microarray Analysis // *PLoS Comput Biol.* – 2007. – N. 3(10): e183.
217. Loeffler D.A., Camp D.M., Bennett D.A. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease // *J Neuroinflammation.* – 2008. – N. 5:9.
218. Loh A., Hadziahmetovic M., Dunaief J.L. Iron homeostasis and eye disease // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – N. 1790(7). – P. 637-49.
219. Lu B., Rutledge B.J., Gu L., Fiorillo J., Lukacs N.W., Kunkel S.L., North R., Gerard C., Rollins B.J. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice // *J Exp Med.* – 1998. – N. 187(4). – P.601-8.
220. Luhmann U.F., Robbie S., Munro P.M., Barker S.E., Duran Y., Luong V., Fitzke F.W., Bainbridge J.W., Ali R.R., MacLaren R.E. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – N. 50(12). – P.5934-43.
221. Luibl V., Isas J.M., Kaye R., et al. Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers // *J Clin Invest.* – 2006. – N. 116. – P.378–85.
222. Lundkvist A., Reichenbach A., Betsholtz C., Carmeliet P., Wolburg H., Pekny M. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences // *J Cell Sci.* – 2004. – N.117. – P.3481–8.
223. Ma W., Coon S., Zhao L., Fariss R.N., Wong W.T. A2E accumulation influences retinal microglial activation and complement regulation // *Neurobiol Aging.* – 2013. – N. 34(3). – P. 943-60.
224. Maccioni R.B., Muñoz J.P., Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders // *Arch Med Res.* – 2001. – V. 32(5). – P. 367-81.
225. Maia A.L., Goemann I.M., Meyer E.L.S., Wajner S.M. Deiodinases: the balance of thyroid hormone. Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease // *Journal of Endocrinology.* – 2011. – N. 209. – P. 283–297.

226. Majji A.B., Cao J., Chang K.Y., Hayashi A., Aggarwal S., Grebe R.R., De Juan E. Jr. Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – V. 41(12). – P. 3936-42.
227. Maller J., George S., Purcell S., Fagerness J., Altshuler D., Daly M.J., Seddon J.M. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration // *Nat Genet.* – 2006. – V. 38(9). – P. 1055-9.
228. Malone J.H., Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome // *BMC Biol.* – 2011. – N.31. – P. 9:34.
229. Mandal M.N., Ayyagari R. Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2006. – N. 47(9). – P. 4091-7.
230. Mandrekar S., Jiang Q., Lee C.Y.D., et al. Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis // *J Neurosci.* – 2009. – N. 29. – P. 4252–62.
231. Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorff L.A., Hunter D.J. et al. Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature.* – 2009. – V. 461. – N. 7265. – P. 747-53.
232. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2008. – N.9. – P. 387-402.
233. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature.* – 2005. – V. 437. – N. 7057. – P. 376-80.
234. Marioni J.C., Mason C.E., Mane S.M., Stephens M., Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays // *Genome Res.* – 2008. – V. 18(9). – P. 1509-17.
235. Markova E.V., Kozlov V.A., Trofimova N.A. et al. Stimulation of cell component of the immune response activates exploratory behavior in senescence accelerated OXYS rats // *Bull. of experim. biol. and medicine.* – 2005. – V. 140. – P. 345-347.
236. Markovets A.M., Saprunova V.B., Zhdankina A.A., Fursova A.Z., Bakeeva L.E., Kolosova N.G. Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescent-accelerated OXYS rats // *Aging (Albany NY).* – 2011. – V.3 (1). – P. 44-54.
237. Markovets A.M., Fursova A.Z., Kolosova N.G. Therapeutic action of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on retinopathy in OXYS rats linked with improvement of VEGF and PEDF gene expression // *PloS One.* – 2011. – N. 6(7):e21682.
238. McGowan E., Pickford F., Kim J., Onstead L., Eriksen J., Yu C., Skipper L., Murphy M.P. et al. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice // *Neuron.* – 2005. – V. 47(2). – P. 191-9.
239. McKay G.J., Patterson C.C., Chakravarthy U., Dasari S., Klaver C.C., Vingerling J.R., Ho L., de Jong P.T. et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies // *Hum Mutat.* – 2011. – V. 32(12). – P. 1407-16.
240. McLeod D.S., Grebe R., Bhutto I., Merges C., Baba T., Luty G.A. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – N. 50. – P. 4982–91.

241. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation // *Nature*. – 2008. – V. 454. – N. 7203. – P. 428-35.
242. Meindl A., Ditsch N., Kast K., Rhiem K., Schmutzler R.K. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts // *Dtsch Arztebl Int*. – 2011. – V. 108(19). – P. 323-30.
243. Merrick B.A., Phadke D.P., Auerbach S.S., Mav D., Stiegelmeier S.M., Shah R.R., Tice R.R. RNA-Seq profiling reveals novel hepatic gene expression pattern in aflatoxin B1 treated rats // *PLoS One*. – 2013. – N. 8(4):e61768.
244. Mi H., Lazareva-Ulitsky B., Loo R., Kejariwal A., Vandergriff J., Rabkin S., Guo N., Muruganujan A., Doremioux O., Campbell M.J., Kitano H., Thomas P.D. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – N.33 (Database issue). – P. 284-8.
245. Miller J.W. Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture // *Am J Ophthalmol*. – 2013. – V. 155(1). – P. 1–35.e13.
246. Molinari F., Meskaneite V., Munnich A., Sonderegger P., Colleaux L. Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system // *Hum Mol Genet*. – 2003. – N.12 Spec No: R195–200.
247. Mori K., Gehlbach P.L., Kabasawa S., Kawasaki I., Oosaki M., Iizuka H., Katayama S., Awata T., Yoneya S. Coding and noncoding variants in the CFH gene and cigarette smoking influence the risk of age-related macular degeneration in a Japanese population // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2007. – V. 48(11). – P. 5315-9.
248. Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq // *Nat Methods*. – 2008. – V. 5(7). – P. 621-8.
249. Mullins R.F., Russell S.R., Anderson D.H., Hageman G.S. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease // *FASEB J*. – 2000. – V.14 (7). – P. 835–846.
250. Munch I.C., Sander B., Kessel L., Hougaard J.L., Taarnhøj N.C., Sørensen T.I., Kyvik K.O., Larsen M. Heredity of small hard drusen in twins aged 20-46 years // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2007. – V. 48(2). – P. 833-8.
251. Murakami Y., Miller J.W., Vavvas D.G. RIP kinase-mediated necrosis as an alternative mechanisms of photoreceptor death // *Oncotarget*. – 2011. – V. 2(6). – P. 497–509.
252. Muraleva N.A., Ofitserov E.N., Tikhonov V.P., Kolosova N.G. Efficacy of glucosamine alendronate alone & in combination with dihydroquercetin for treatment of osteoporosis in animal model // *Indian J Med Res*. – 2012. – N. 135. – P. 221-7.
253. Murphy D. Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects // *Adv Physiol Educ*. – 2002. – V. 26(1-4). – P. 256-70.
254. Mustafi D., Maeda T., Kohno H., Nadeau J.H., Palczewski K. Inflammatory priming predisposes mice to age-related retinal degeneration // *J Clin Invest*. – 2012. – V. 122(8). – P. 2989–3001.
255. Nadeau J.H., Singer J.B., Matin A., Lander E.S. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains // *Nat Genet*. – 2000. – V. 24(3). – P. 221-5.

256. Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., Snyder M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing // *Science*. – 2008. – V. 320. – N. 5881. – P. 1344-9.
257. Nagaoka-Yasuda R., Matsuo N., Perkins B., Limbaeck-Stokin K., Mayford M. An RNAi-based genetic screen for oxidative stress resistance reveals retinol saturase as a mediator of stress resistance // *Free Radic Biol Med*. – 2007. – V. 43(5). – P. 781-788.
258. Nair J., Sinitsina O., Vasunina E.A., Nevinsky G.A., Laval J., Bartsch H. Age-dependent increase of etheno-DNA-adducts in liver and brain of ROS overproducing OXYS rats // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – V. 336(2). – P. 478-82.
259. Neroev V.V., Archipova M.M., Bakeeva L.E., Fursova A.Zh., Grigorian E.N., Grishanova A.Y. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of aging program. 4. Age-related eye diseases. SkQ1 returns vision to blind animals // *Biochemistry (Mosc)*. – 2008. – V. 73(12). – P. 1317-1328.
260. Newman A.M., Gallo N.B., Hancox L.S. et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks // *Genome Med*. – 2012. – V. 4(2):16.
261. Nguyen K. Extended investigations in the physics of oligonucleotide microarrays // *The ANU Undergraduate Research Journal*. – 2009. – N.1. – P. 29-38
262. Ning A., Cui J., To E., Ashe K.H., Matsubara J. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2008. – V. 49(11). – P. 5136-5143.
263. Nolan T., Hands R., Bustin S. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // *Nature protocols*. – 2006. – V. 1. – N. 3. – P. 1560-1581.
264. Nookaew I., Papini M., Pornputtapong N., Scalcinati G., Fagerberg L., Uhlén M., Nielsen J. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res*. – 2012. – V. 40(20). – P.10084-10097.
265. Nordgaard C.L., Berg K.M., Kapphahn R.J. et al. Proteomics of the retinal pigment epithelium reveals altered protein expression at progressive stages of age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2006. – V. 47(3). – P. 815–822.
266. Nowak J. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy // *Pharmacological Reports*. – 2006. – N. 58. – P. 353-363.
267. Nowak M.S., Jurowski P., Grzybowski A., Goś R., Pastuszka M., Kapica A., Śmigielski J. A prospective study on different methods for the treatment of choroidal neovascularization. The efficacy of verteporfin photodynamic therapy, intravitreal bevacizumab and transpupillary thermotherapy in patients with neovascular age-related macular degeneration // *Med Sci Monit*. – 2012. – V. 18(6). – P. 374-380.
268. Nozaki M., Raisler B.J., Sakurai E., Sarma J.V., Barnum S.R., Lambris J.D., Chen Y., Zhang K., Ambati B.K., Baffi J.Z., Ambati J. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – V. 103(7). – P. 2328-2333.

269. Obukhova L.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats // *Aging* (Albany NY). – 2009. – V. 1(4). – P. 389-401.
270. Ohno-Matsui K. Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease // *Prog Retin Eye Res.* – 2011. – N.30. – P. 217–238.
271. Ormsby R.J., Ranganathan S., Tong J.C., Griggs K.M., Dimasi D.P., Hewitt A.W., Burdon K.P., Craig J.E., Hoh J., Gordon D.L. Functional and structural implications of the complement factor H Y402H polymorphism associated with age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. – V. 49(5). – P. 1763-1770.
272. Oshlack A., Robinson M.D., Young M.D. From RNA-seq reads to differential expression results // *Genome Biol.* – 2010. – N. 11(12):220.
273. Oshlack A., Wakefield M.J. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology // *Biol Direct.* – 2009. – N.16. – P. 4-14.
274. Pachter L. Models for transcript quantification from RNA-Seq // *arXiv:1104.3889v2 [q-bio.GN]* 13 May 2011.
275. Parmeggiani F., Romano M.R., Costagliola C., Semeraro F., Incorvaia C., D'Angelo S., Perri P., De Palma P., De Nadai K., Sebastiani A. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration // *Mediators Inflamm.* – 2012. 546786. doi: 10.1155/2012/546786
276. Penfold P.L., Liew S.C., Madigan M.C., Provis J.M. Modulation of major histocompatibility complex class II expression in retinas with age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1997. – V. 38 (10). – P.2125–2133.
277. Peng B., Kimmel M. Simulations provide support for the common disease-common variant hypothesis // *Genetics.* – 2007. – V. 175(2). – P. 763-76.
278. Pennesi M.E., Neuringer M., Courtney R.J. Animal models of age related macular degeneration // *Mol Aspects Med.* – 2012. – V. 33(4). – P. 487-509.
279. Penninger J.M., Sirard C., Mittrücker H.W., Chidgey A., Kozieradzki I., Nghiem M., Hakem A., Kimura T., Timms E., Boyd R., Taniguchi T., Matsuyama T., Mak T.W. The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8+ thymocytes // *Immunity.* – 1997. – V. 7(2). – P. 243-254.
280. Pickering M.C., Cook H.T. Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals // *Clin Exp Immunol.* – 2008. – V. 151(2). – P. 210-230.
281. Pickrell J.K., Marioni J.C., Pai A.A., Degner J.F., Engelhardt B.E., Nkadori E., Veyrieras J.B., Stephens M., Gilad Y., Pritchard J.K. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing // *Nature.* – 2010. – V. 464. – N. 7289. – P. 768-772.
282. Plafker S.M., O'Mealey G.B., Szweda L.I. Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2012. – N. 298. – P. 135-177.
283. Pritchard J.K., Cox N.J. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant ... or not? // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – V. 11. – N. 20. – P. 2417–2423.

284. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification // *N Engl J Med.* – 2006. – N. 354. – P. 2463–2472.
285. Rakoczy P., Meaghan J., Yu S., Chang B., Heckenlively J. Mouse models of age-related macular degeneration // *Experimental Eye Research.* – 2006. – N. 82. – P. 741–752.
286. Ramkumar H.L., Zhang J., Chan C.C. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD) // *Prog Retin Eye Res.* – 2010. – N. 29(3). – P. 169-190.
287. Ramrattan R.S., Van der Schaft T.L., Mooy C.M., De Bruijn W.C., Mulder P.G., De Jong P.T. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1994. – N. 35. – P. 2857–2864.
288. Rapaport F., Khanin R., Liang Y., Pirun M., Krek A., Zumbo P., Mason C.E., Socci N.D., Betel D. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data // *Genome Biol.* – 2013. – N. 14(9):R95.
289. Ratnapriya R., Chew E.Y. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update // *Clin Genet.* – 2013. – V. 84(2). – P. 160-166.
290. Rattner A., Nathans J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities // *Nature.* – 2006. – V. 7. – P. 860–872.
291. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. The genetic control of blood pressure and body composition in rats with stress-sensitive hypertension // *Clin Exp Hypertens.* – 2013. – V. 35(7). – P. 484-495.
292. Redina O.E., Machanova N.A., Efimov V.M., Markel A.L. 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 // *Clinical and experimental pharmacology and physiology.* – 2006. – N. 33. – P.456-464.
293. Reich D.E., Lander E.S. On the allelic spectrum of human disease // *Trends Genet.* – 2001. – V. 17. – N. 9. – P. 502–510.
294. Rein D.B., Wittenborn J.S., Zhang X., Honeycutt A.A., Lesesne S.B., Saaddine J. Vision Health Cost-Effectiveness Study Group. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments // *Arch Ophthalmol.* – 2009. – N. 127(4). – P. 533-540.
295. Relógio A., Schwager C., Richter A., Ansorge W., Valcárcel J. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – N. 30(11):e51.
296. Rhone M., Basu A. Phytochemicals and age-related eye diseases // *Nutr Rev.* – 2008. – V. 66(8). – P. 465-472.
297. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis // *Nat Immunol.* – 2010. – V. 11 (9). – P. 785–797.
298. Ristow M., Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis) // *Exp Gerontol.* – 2010. – N. 45(6). – P. 410-418.
299. Rivera A., Fisher S.A., Fritsche L.G., Keilhauer C.N., Lichtner P., Meitinger T., Weber B.H. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration,

contributing independently of complement factor H to disease risk // *Hum Mol Genet.* – 2005. – Vol. 14. – P. 3227–3236.

300. Robinson R. Common Disease, Multiple Rare (and Distant) Variants // *PLoS Biol.* – 2010. – N. 8(1): e1000293.

301. Robson P. The maturing of the human embryonic stem cell transcriptome profile // *Trends Biotechnol.* – 2004. – V. 22(12). – P.609-612.

302. Rogers J., Lue L.-F. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease // *Neurochem Int.* – 2001. – N. 39. – P. 333–340.

303. Rovner B.W., Casten R.J., Leiby B.E., Tasman W.S. Activity loss is associated with cognitive decline in age-related macular degeneration // *Alzheimers Dement.* – 2009. – N. 5(1). – P. 12-17.

304. Rumyantseva Y.V., Fursova A.Zh., Fedoseeva L.A., Kolosova N.G. Changes in physicochemical parameters and alpha-crystallin expression in the lens during cataract development in OXYS rats // *Biochemistry (Mosc).* – 2008. – Vol. 73(11). – P. 1176-1182.

305. Rykova V.I., Leberfarb E.Y., Stefanova N.A., Shevelev O.B., Dymshits G.M., Kolosova N.G. Brain proteoglycans in postnatal development and during behavior decline in senescence-accelerated OXYS rats // *Adv Gerontol.* – 2011. – V. 24(2). – P. 234–243.

306. Saito Y., Sano Y., Vassar R., Gandy S., Nakaya T., Yamamoto T., Suzuki T. X11 proteins regulate the translocation of amyloid beta-protein precursor (APP) into detergent-resistant membrane and suppress the amyloidogenic cleavage of APP by beta-site-cleaving enzyme in brain // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283(51). – P. 35763-35771.

307. Salganik R.I., Shabalina I.G., Solovyova N.A. et al. Impairment of respiratory functions in mitochondria of rats with an inherited hyperproduction of free radicals // *Biochemical and biophysical research communications.* – 1994. – V. 205. – P. 180-185.

308. Sampaolo S., Campos-Barros A., Mazziotti G., Carlomagno S., Sannino V., Amato G., Carella C., Di Iorio G. Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'-triiodothyronine in patients with Alzheimer's disease // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2005. – N. 90. – P. 198–202.

309. Samuel M.A., Zhang Y., Meister M., Sanes J.R. Age-related alterations in neurons of the mouse retina // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* – 2011. – N. 31. – P. 16033–16044.

310. Sanfilippo P.G., Hewitt A.W., Hammond C.J., Mackey D.A. The heritability of ocular traits // *Surv Ophthalmol.* – 2010. – V. 55(6). – P. 561-583.

311. Sauce D., Appay V. Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults? // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – V. 23(4). – P. 543–548.

312. Schaumberg D.A., Hankinson S.E., Guo Q., Rimm E., Hunter D.J. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors // *Arch Ophthalmol.* – 2007. – V. 125(1). – P. 55-62.

313. Schauwecker P.E. Congenic strains provide evidence that a mapped locus on chromosome 15 influences excitotoxic cell death // *Genes Brain Behav.* – 2011. – V. 10(1). – P. 100-110.

314. Scheel I., Aldrin M., Glad I.K., Sørum R., Lyng H., Frigessi A. The influence of missing value imputation on detection of differentially expressed genes from microarray data // *Bioinformatics*. – 2005. – V. 21(23). – P. 4272-4279.
315. Schmitz-Valckenberg S., Fleckenstein M., Scholl H.P., Holz F.G. Fundus autofluorescence and progression of age-related macular degeneration // *Surv Ophthalmol*. – 2009. – V. 54 (1). – P. 96–117.
316. Scholl H.P., Fleckenstein M., Charbel Issa P., Keilhauer C., Holz F.G., Weber B.H. An update on the genetics of age-related macular degeneration // *Mol Vis*. – 2007. – N.13. – P. 196-205.
317. Schütt F., Davies S., Kopitz J., Holz F.G., Boulton M.E. Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2000. – V. 41(8). – P. 2303-2308.
318. Sebastiani P., Yu Y.H., Ramoni M.F. Bayesian machine learning and its potential applications to the genomic study of oral oncology // *Adv Dent Res*. – 2003. – V. 17. – P. 104-108.
319. Sergeeva S., Bagryanskaya E., Korbolina E. et al. Development of behavioural dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism // *Experimental gerontology*. – 2006. – N. 41. – P. 141-150.
320. Shelton D.N., Chang E., Whittier P.S., Choi D., Funk W.D. Microarray analysis of replicative senescence // *Curr Biol*. – 1999. – V. 9(17). – P. 939-945.
321. Shenoy A.R., Wellington D.A., Kumar P., Kassa H., Booth C.J., Cresswell P., MacMicking J.D. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals // *Science*. – 2012. – V. 336. – N. 6080. – P. 481-5.
322. Shioda T. Application of DNA microarray to toxicological research // *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. – 2004. – V. 23 (1). – P. 13-31.
323. Siegel D., Gustafson D.L., Dehn D.L., Han J.Y., Boonchoong P., Berliner L.J., Ross D. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger // *Mol Pharmacol*. – 2004. – V. 65(5). – P. 1238-1247.
324. Sinitsyna O., Krysanova Z., Ishchenko A., Dikalova A.E., Stolyarov S., Kolosova N., Vasunina E., Nevinsky G. Age-associated changes in oxidative damage and the activity of antioxidant enzymes in rats with inherited overgeneration of free radicals // *J Cell Mol Med*. – 2006. – V. 10(1). – P. 206–215.
325. Sivak J.M. The aging eye: common degenerative mechanisms between the Alzheimer's brain and retinal disease // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2013. – V. 4(1). – P. 871-80.
326. Sivaprasad S., Bailey T.A., Chong V.N.H. Bruch's membrane and the vascular intima: is there a common basis for age-related changes and disease? // *Clinical & experimental ophthalmology*. – 2005. – N. 33. – P. 518–523.
327. Song B., Davis K., Liu X.S., Lee H.G., Smith M., Liu X. Inhibition of Polo-like kinase 1 reduces beta-amyloid-induced neuronal cell death in Alzheimer's disease // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – V. 3(9). – P.846-51.
328. Sparrow J.R., Cai B. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2 // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2001. – N. 42 (6). – P. 1356–1362.
329. Sparrow J.R., Wu Y., Nagasaki T., Yoon K.D., Yamamoto K., Zhou J. Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina // *Photochem Photobiol Sci*. – 2010. – V. 9 (11). – P. 1480–1489.

330. Sparrow J.R., Boulton M. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology // *Exp Eye Res.* – 2005. – V. 80(5). – P.595-606.
331. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // *Ann N Y Acad Sci.* – 2008. – N. 1147. – P.37-52.
332. Stefanova N.A., Fursova A., Kolosova N.G. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats // *J Alzheimers Dis.* – 2010. – V. 21. – P. 479-491.
333. Stefanova N.A., Fursova A.Z., Sarsenbaev K.N., Kolosova N.G. Effects of *Cistanche deserticola* on behavior and signs of cataract and retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // *J Ethnopharmacol.* – 2011. – N. 138. – P. 624–632.
334. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Alzheimer's Disease-Like Pathology in Senescence-Accelerated OXYS Rats can be Partially Retarded with Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 // *J Alzheimers Dis.* – 2013. [Epub ahead of print]
335. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // *Physiol rev.* – 2005. – N. 85. – P. 845-881.
336. Sultan M., Schulz M.H., Richard H., Magen A., Klingenhoff A., Scherf M., Seifert M., Borodina T. et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome // *Science.* – 2008. – V. 321. – N. 5891. – P. 956-960.
337. Swaroop A., Chew E.Y., Rickman C.B., Abecasis G.R. Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2009. – N. 10. – P.19-43.
338. Synowiec E., Sliwinski T., Danisz K. et al. Association between polymorphism of the NQO1, NOS3 and NFE2L2 genes and AMD // *Front Biosci.* – 2013. – N. 18. – P. 80–90.
339. 't Hoen P.A., Friedländer M.R., Almlöf J., Sammeth M., Pulyakhina I., Anvar S.Y., Laros J.F., Buermans H.P. et al. Reproducibility of high-throughput mRNA and small RNA sequencing across laboratories // *Nat Biotechnol.* – 2013. doi: 10.1038/nbt.2702.
340. Takeda T., Hosokawa M., Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence // *Exp Gerontol.* – 1997. – N. 32(1-2). – P. 105-109.
341. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation // *Cell.* – 2010. – V. 140 (6). – P. 805–820.
342. Tarallo V., Hirano Y., Gelfand B.D. et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88 // *Cell.* – 2012. – V. 149 (4). – P. 847–859.
343. Thompson C.L., Jun G., Klein B.E., Klein R., Capriotti J., Lee K.E., Iyengar S.K. Genetics of pigment changes and geographic atrophy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2007. – N. 48(7). – P. 3005-313.
344. Totan Y., Yağci R., Bardak Y., Ozyurt H., Kendir F., Yilmaz G., Sahin S., Sahin Tiğ U. Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration // *Curr Eye Res.* – 2009. – N. 34(12). – P. 1089-1093.
345. Trapnell C., Pachter L., Salzberg S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq // *Bioinformatics.* – 2009. – N. 25(9). – P. 1105–11.

346. Trapnell C., Williams B.A., Pertea G. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // *Nat biotechnol.* – 2010. – N. 28(5). – P.511–515.
347. Trichonas G., Murakami Y., Thanos A. et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V.107 (50). – P. 21695–21700.
348. Troyanskaya O., Cantor M., Sherlock G., Brown P., Hastie T., Tibshirani R., Botstein D., Altman R.B. Missing value estimation methods for DNA microarrays // *Bioinformatics.* – 2001. – N. 17(6). – P. 520–525.
349. Tuo J., Grob S., Zhang K., Chan C.C. Genetics of immunological and inflammatory components in age-related macular degeneration // *Ocul Immunol Inflamm.* – 2012. – N. 20(1). – P.27–36.
350. Ufret-Vincenty R.L., Aredo B., Liu X., McMahon A., Chen P.W., Sun H., Nieder Korn J.Y., Kedzierski W. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – V. 51(11). – P.5878–87.
351. Uhrig M., Brechlin P., Jahn O., Knyazev Y., Weninger A., Busia L., Honarnejad K., Otto M., Hartmann T. Upregulation of CRABP1 in human neuroblastoma cells overproducing the Alzheimer-typical A β 42 reduces their differentiation potential // *BMC Medicine.* – 2008. 6:38
352. Van Berkum N.L., Holstege F.C. DNA microarrays: raising the profile // *Current opinion in biotechnology.* – 2001. – N.12. – P.48–52.
353. van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., de Jong P.T. Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study // *Br J Ophthalmol.* – 1993. – N. 77(10). – P.657–661.
354. van Wijngaarden P., Qureshi S.H. Inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the management of neovascular age-related macular degeneration: a review of current practice // *Clin Exp Optom.* – 2008. – N. 91(5). – P.427–437.
355. Venza I., Visalli M., Cucinotta M., Teti D., Venza M. Association between oxidative stress and macromolecular damage in elderly patients with age-related macular degeneration // *Aging Clin Exp Res.* – 2012. – N. 24(1). – P.21–27.
356. Wang L., Clark M.E., Crossman D.K., Kojima K., Messinger J.D., Mobley J.A., Curcio C.A. Abundant lipid and protein components of drusen // *PLoS One.* – 2010. – N.5(4):e10329.
357. Wang L., Xi Y., Yu J., Dong L., Yen L., Li W. A statistical method for the detection of alternative splicing using RNA-seq // *PLoS One.* – 2010. – N. 5(1):e8529.
358. Wang Y., Barbacioru C., Hyland F., Xiao W., Hunkapiller K.L., Blake J., Chan F., Gonzalez C., Zhang L., Samaha R.R. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays // *BMC Genomics.* – 2006. – N. 7:59.
359. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics // *Nat Rev Genet.* – 2009. – N. 10(1). – P.57–63.
360. Webber A.L., Hodor P., Thut C.J., Vogt T.F., Zhang T., Holder D.J., Petrukhin K. Dual role of Nr2e3 in photoreceptor development and maintenance // *Exp Eye Res.* – 2008. – N. 87(1). – P.35–48.

361. Weiss K.M., Terwilliger J.D. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? // *Nat. Genet.* – 2000. – V. 26. – N. 2. – P.151-157.
362. Wilhelm B.T., Landry J.R. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing // *Methods.* – 2009. – N. 48(3). – P.249-257.
363. Willenbrock H., Salomon J., Søkilde R., Barken K.B., Hansen T.N., Nielsen F.C., Møller S., Litman T. Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing // *RNA.* – 2009. – N. 15(11). – P.2028-2034.
364. Xi J., Farjo R., Yoshida S., Kern T.S., Swaroop A., Andley U.P. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina // *Mol Vis.* – 2003. – N. 9. – P.410-419.
365. Xu H., Chen M., Forrester J.V. Para-inflammation in the aging retina // *Prog Retin Eye Res.* – 2009. – N. 28(5). – P.348-368.
366. Yang X., Hu J., Zhang J., Guan H. Polymorphisms in CFH, HTRA1 and CX3CR1 confer risk to exudative age-related macular degeneration in Han Chinese // *Br J Ophthalmol.* – 2010. – N. 94(9). – P.1211-1214.
367. Yang Y.H., Buckley M.J., Speed T.P. Analysis of cDNA microarray images // *Brief Bioinform.* – 2001. – N. 2(4). – P.341-349.
368. Yang Z., Camp N.J., Sun H., Tong Z., Gibbs D., Cameron D.J., Chen H., Zhao Y., Pearson E. et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration // *Science.* – 2006. – V. 314. – N. 5801. – P.992-993.
369. Yaung J., Jin M., Barron E. et al. alpha-Crystallin distribution in retinal pigment epithelium and effect of gene knockouts on sensitivity to oxidative stress // *Mol Vis.* – 2007. – N. 13. – P.566-577.
370. Yaung J., Kannan R., Wawrousek E.F., Spee C., Sreekumar P.G., Hinton D.R. Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an in vivo model of chemically induced hypoxia // *Exp Eye Res.* – 2008. – N. 86(2). – P.355-365.
371. Yazawa H., Yu Z.X., Takeda et al. Beta amyloid peptide (Abeta42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages // *FASEB J.* – 2001. – N. 15. – P.2454-2462.
372. Yelinova V., Glazachev Y., Khramtsov V., Kudryashova L., Rykova V., Salganik R. Studies of human and rat blood under oxidative stress: changes in plasma thiol level, antioxidant enzyme activity, protein carbonyl content, and fluidity of erythrocyte membrane // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1996. – N. 221(2). – P.300-303.
373. Yin Y.I., Bassit B., Zhu L., Yang X., Wang C., Li Y.M. {gamma}-Secretase Substrate Concentration Modulates the Abeta42/Abeta40 Ratio: Implications For Alzheimer Disease // *J Biol Chem.* – 2007. – N. 282(32). – P. 23639-23644.
374. Yoshida S., Yashar B.M., Hiriyan S., Swaroop A. Microarray analysis of gene expression in the aging human retina // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – N.43. – P. 2554-2560.
375. Yoshida T., Ohno-Matsui K., Ichinose S. et al. The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration // *J Clin Invest.* – 2005. – N. 115. – P.2793-2800.
376. Yoshihara E., Chen Z., Matsuo Y., Masutani H., Yodoi J. Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling // *Methods Enzymol.* – 2010. – N. 474. – P.67-82.

377. Yuan X., Gu X., Crabb J.S. et al. Quantitative proteomics: comparison of the macular Bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes // *Mol Cell Proteomics*. – 2010. – N. 9(6). – P.1031–1046.
378. Zahn J.M., Poosala S., Owen A.B. et al. AGEMAP: a gene expression database for aging in mice // *PLoS Genet*. – 2007. – N. 3(11):e201.
379. Zarepari S., Buraczynska M., Branham K.E., Shah S., Eng D., Li M., Pawar H., Yashar B.M. et al. Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration // *Hum Mol Genet*. – 2005. – N. 14(11). – P.1449-1455.
380. Zhang S.N., Sun H.H., Jin Y.M., Piao L.Z., Jin D.H., Lin Z.H., Shen X.H. Identification of differentially expressed genes in gastric cancer by high density cDNA microarray // *Cancer Genet*. – 2012. – N. 205(4). – P.147-155.
381. Zhou J., Kim S.R., Westlund B.S., Sparrow J.R. Complement activation by bisretinoid constituents of RPE lipofuscin // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2009. – N. 50(3). – P. 1392–1399.
382. Zhu H., Jia Z., Mahaney J.E., Ross D., Misra H.P., Trush M.A., Li Y. The highly expressed and inducible endogenous NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in cardiovascular cells acts as a potential superoxide scavenger // *Cardiovasc Toxicol*. – 2007. – N. 7(3). – P.202-211.
383. Zien A., Aigner T., Zimmer R., Lengauer T. Centralization: a new method for the normalization of gene expression data // *Bioinformatics*. – 2001. – N.17. Suppl 1:S323-31.

Приложение 1. Последовательности олигонуклеотидных зондов на ДНК-микрочипе.

| Ген | Gene Bank, accession number | Олигонуклеотидный зонд на 3'-конец мРНК гена |
|---------|-----------------------------|--|
| Acan | NM_022190 | ccaacacctacaagcacaggctacagaagcggacgatgagacccacacggaggag |
| Aen | NM_001108487 | agtgtactgtgagaaatcagctgtttgtgcttcagaggagtaagggaataagtgcacac |
| Ak3 | NM_013218 | tttcctaagacttctctgaaaattatgatttaagtcctaattggccttgccaatagtgca |
| Apba1 | NM_031779 | ataaccactggcaggtactgtcctaactgtacttcacaggcgcttatgtgtaacacacac |
| Apba2 | NM_031780 | atgtataatgatgaccttatccacttctcaaaactcggagaactgcaaggagctgcagctg |
| Apbb1 | NM_080478 | tgttgagggtggagcaggaggaactggccaagccaggccccatcctcaaggcccaata |
| Aqp11 | NM_173105 | ttgtcttttgagtgtgtgtaaatgctgctggaaggctcattcattaaacctctgt |
| Arnt2 | NM_012781 | tgaatgttctgtatgactaacagggtattaagtctactggttatatgtataactaatgtaac |
| Arntl | NM_024362 | attctccttgtaagaatcctttactataaaatagggttaagataatgtattagacag |
| Arrdc4 | NM_001047853 | aattccgggttcagcctccgctctttatcagagtcacatgctcagttgttttg |
| Bad | NM_022698 | tggtaaaccgagactgggtgctgtcctatcatcctagctggaggccccaggtcaagaac |
| Bax | NM_017059 | ccatctttgtggctggagtctcaccgcctcgctcaccatctggaagaagatgggctga |
| Bbs1 | NM_001107569 | taaggatgagatgagtctatgaacacatacctatgtagtcatctggaatagactattta |
| Bcl2 | NM_016993 | cacacacacacacattcaggcaaatggtaaatcagctatttactgccaaagggga |
| Bdnf | NM_012513.3 | tggatagcaaaaagagaattggctggcgggtcataaggatagacacttctgtgtatgta |
| Best1 | NM_001011940 | tgtctgaacacacctgtcttctactatcttccccaaactagcgagttaataaatattc |
| Capn1 | NM_019152 | agatccctctgcaaaccaagtacacctctctgcccgtgtgccaccagggaactctctg |
| Casp9 | NM_031632 | tggactgcgtctcatcaaaagttccagaagggttaattcttcttgagcacagtatttat |
| Cd36 | NM_031561 | tggcaacaacaaggccaggtatcacagatattttcttttactttctaacacagagc |
| Cd81 | NM_013087 | acctggggggcatggcctgtgtatatactatttctgtattactctgctacacttagcct |
| Cdc37l1 | NM_001011941 | agttcagctgtcaaatctgctattcatccattaaagcaataaatcagagtgggtgactac |
| Cfh | NM_130409 | ctctgattcacagtgagtggagatgtattgtctcagttttcaattagattattgtcac |
| Chrna7 | NM_012832 | agaaaaatgactgatcctgaactgtcctggacttgacactttcgtgctattgtagcagc |
| Chsy1 | NM_001106268 | caacttacagatccaatgtgccttaataattgttttcatttagagttcagacagttgat |
| Cntf | NM_013166 | aaagactgaataaacaattgggaagtcctagactatcttcattcaactaccgaataaa |
| Coq7 | NM_012785 | gcagccatacttatcagaaaggttttaagtagcactactgagccatctcaagaaaag |
| Cox8a | NM_134345 | atatattgggtctgcttgatgggggtcccccttgtaacaataaagctatttaaaccttg |
| Crx | NM_021855 | acaatcccatggaccctctggactacaaagatcagagtgcctggagtttcagatcttgt |
| Ctsd | NM_134334 | cctgggctagtcagatgggagccaaagtgatatacaataaagttgtttgggcctctt |
| Cyb5r2 | NM_001014244 | gaggctgggaagggaagccactttctccatggcttagtggaataaactagactacttgca |
| Cyp26a1 | NM_130408 | tgtggacaattctctgcaagattcaccacttcaggaggatattctgacagctatttca |
| Dlg2 | NM_022282 | gcagtcaatgtgaatccttatgaatgtacaacacaaactgtgtgaagccatgaagaaca |
| Drd4 | NM_012944 | cgctggcgggttcgtcgtctgattaaatgaagcttttctaaccatttatcaacgctg |
| Efemp2 | NM_001005907 | tctttgtgggagcctatacttctgaagaagaccctcagggaagggtcatgttgg |
| Egln3 | NM_019371 | tgatccatgcagcatgttcccagcctaagctaacatacagtaagcaacgggtaccacaa |
| Epas1 | NM_023090.1 | cgagccttacctgctgccggaactgaccagatatgactgtgaggtgaacgtgcccagacc |
| Fas | NM_139194 | tatctgcattagaattttataccaggagctgggaggttaactcagtagtaaatcattca |

| | | |
|--------|--------------|---|
| Fgf15 | NM_130753 | cctggagagcgacagcatggatccgttcagaatgggtggaggatgtggaccacctagtga |
| Fgf3 | NM_130817 | gagccccaggtgatcatggcaaatggagcattgccaccaaggccactacaagcgccca |
| Fgf4 | NM_053809 | taagaacggcgccgaccaagaaggggaaccgagtttccgacatgaaggtaaccactt |
| Fgfbp3 | NM_001109165 | gtggttttaaaaatattgttaacaatcgtcttaataaaaaataaggtcgtaaaacga |
| Fgfr2 | NM_001109896 | catgtgacaggagtgacagactacactgattttatgtgtttgaaattggagaaagtattt |
| Flt1 | NM_019306 | agatagagccacgtgaggaaaacactattgttcaatcctcctgtgactccacgttagaga |
| Fth1 | NM_012848 | gttgacacaaaacatctgcttaaaagtctttaattgtaccatttctcaataaagaa |
| Fxn | NM_001191952 | atgtctggtttccatacctgcttccgaagataatcacactgtgtgcaacaactctgtga |
| Fzd4 | NM_022623 | tccatttctcattttgaaggaaaggatgcagtgaatctcagttgaacaaactagaaa |
| Gabra5 | NM_017295 | agcccatagtgtcttagattagtagcaataattcccaaggaaagaaatcaactga |
| Gabrb3 | NM_017065 | aagggacaagtatctaaatattatgcctcaagaatgagggcgagaaacacagtcacca |
| Gabrg3 | NM_024370 | tggttttcttccatcatccccagacaagtagtgaccaacaaaaagtagcagggaagga |
| Gas2 | NM_001127504 | ttgtataccaggacagggctgtattgtatcaatgaacagcaagattgtccacactga |
| Gja1 | NM_012567 | acctagccccatccattcatgtgctcgggagagtgttttatcaataaagttttaattt |
| Grm5 | NM_017012 | aaatcatcgtccgctgccagcagatccagcagcctagtcacactgtggaagagga |
| Gucy2d | NM_130737 | gtctgcctgccacatgagtggatgaggagctgctgtcttccctagtgtactctg |
| Hif1a | NM_024359 | cccttgctctttgtagttgggtctaactaactgtactgtttgttatatacaataaac |
| Hif1an | NM_001113749 | cccgaccttccctcattgccccctgaagtcctgcaattagtgtgtggagtcacagcttt |
| Hpse2 | NM_001135762 | gtccatgggctttatgtgtgcaagaatgtcaatgctttggcttgcgttatcgataa |
| Hs3st2 | NM_181370 | attaaatttatgaaactgttgggcaggactccgggtgggagtgagctccagggtacaa |
| Hspa4 | NM_153629 | tccaggttgcaatatccaaattggtttgttaaaaacttaggtcacatttctactaag |
| Htra1 | NM_031721 | cagcactcagaggaaattgatgcctgagaccacaggtgggtgacctggcttctgagat |
| Igf1r | NM_052807 | caaattgacttaattggctgcctggggctcctcatcacacctgctgacacataggctt |
| Igf2 | NM_001190163 | cctggcctccatgcctagtgtggcctccatctgtttgtcttctcctactgtcttc |
| Kcnv2 | NM_001106370 | tggcagcttcttggcatgacctaagattatgtggtgttaatttctctcaact |
| Lrp5 | NM_001106321 | cagaggatagctgtccacctctcctgtcactgagagaagctactgccaccttctccac |
| Mmp2 | NM_031054 | ggtgtccactcttctggttcttcaacatctatgaccttttattggcttcagcactctca |
| Mmp9 | NM_031055 | accagtggcctacgtgacctatgacctctgcagtgccttgaaactaaggtcctcttt |
| Mpp4 | NM_021265 | atcttaaagatccagactaacagctgccattgagagcacgacaactgcaactacgaagg |
| Mta2 | NM_001100740 | tgctactcttcttccctcccttctcctctgccttttatatgccaattctcagaat |
| Myo7a | NM_153473 | tacatcagccagatgctcactgccatgagcaaacagaggaaactccaggagcggga |
| Ndufv1 | NM_001006972 | cctgccaatttatcatcccttgggaagctggacaataaacaagtgtgccactctcca |
| Nipa1 | NM_001107519 | acatctgcttctgtttcaggcagattgtgtccattcagaagaaataaactatttaact |
| Nipa2 | NM_001107518 | ggatacttgcttgggccatactgggtgtagtcacagtcacaaaatgtgtaaaactg |
| Nos1 | NM_052799 | atcgcttcatcgaagagagcaaaaaagacgcagatgaggttttcagctcctaactggat |
| Nos2 | NM_012611 | tcacatcatctccctcctctacccctaccaagtagtattgtactattgtggactactgaat |
| Nos3 | NM_021838 | ggacctgccaacgtggagatcactgagctctgtattcaacatggctggacccagggaaa |
| Nox4 | NM_053524 | attcaagaactctctaattgaggagctgaactcactcactgaagctgatagccacagcc |
| Ntrk3 | NM_019248 | ctttgaccgaaacgaacatcttcatataaactcaagtgcctgtcacacatacaactga |
| Oat | NM_022521 | tttaccctctatgactggcatttcatccctattgagatcactgggtgtgttcaggctt |
| P4ha3 | NM_198775 | cttcagtgtgcctgtggttaagaatgctgcactgttttggtggaactgcacaggagtg |

| | | |
|---------|--------------|---|
| Pax2 | NM_001106361 | accgcctacaatgaggcttgagattcagcaacccgccttactaagtcccttattat |
| Pde6c | NM_001108522 | ggaaagcaggaagaagttacctcagatggaaaagctgccacagatttaggaagcagcaca |
| Picalm | NM_053554 | caggtggcgactccttacttcagcaaaatccaaactgctgtctctaaactcttctcc |
| Pitpnm1 | NM_001008369 | aggagggagtgggctagggctccagcagctttccaatgtgtgaacctataaaattaaact |
| Polg | NM_053528 | taccagataattgaactcacaaaggctccttggaacgaagccagcctggaccctag |
| Ppp2r2c | NM_057116 | ggcaccagcgggagaacatcattgccattgcagccaccaacaacctgtacatcttcagg |
| Prdx5 | NM_053610 | caccagctctgggccaaggcccagctacctcttacctgagggccactggaatggaacc |
| Rbp4 | NM_013162 | ttccccgagagacgtttgaggcttgggattccaaactgatttattaacgtatagtac |
| Rlbp1 | NM_001106274 | ctagtggcatctcatccaaaccgacctagaggacagtgaggcacaggcatgtct |
| Rom1 | NM_001009690 | acagccaacggactgaagactcttctagtattcagactctacaataaagtgttgacag |
| Rtn3 | NM_001009953 | tacgtgtctgtgcgtgcaacataaaacagtagtaccagaagctctttgtccctgta |
| Sept3 | NM_019375 | cctgctcgcagactctgcatcaggactcacctcaggacctcaagaagtaacacaaa |
| Sfrp5 | NM_001107591 | cttctggctgggctctccgtccctgtatccaacaatgataaattattgctactgct |
| Sgms1 | NM_181386 | ctgctatctctcaagttaccttgactgaacccattgagttatctgctcagcactgtgac |
| Sirt3 | NM_001106313 | agctgatacgtaggctaattctagcatgttggtcggtaaagtggcatcttaactgaaa |
| Slc1a1 | NM_013032 | cgagaaggacacaaagaatcaactgtacatttagtttgataaacagacctccagattatt |
| Spon1 | NM_172067 | tgtttattaccgcttcatccaatacattttgggtcaagatcgacacagtgtatgaat |
| Stx3 | NM_031124 | ctctgtctccagatgggaacaaagattaaatggccttctgagaatgaggggtactgtt |
| Stx5 | NM_031704 | ctgagccctacagttgcacaaacctgactttggctactggtgactctcaatctgccaaac |
| Sv2b | NM_057207 | tccccatgacagtattcttaattgggataatagacctcagtggtgcagttaccactcaag |
| Syt12 | NM_138835 | cctgaggtctggggaacagtgaggatctctcagataaggagcttcaatttgaggggttg |
| Syt17 | NM_138849 | gtatctttccacagcgtattgtcctctgtgatggggagtattctgtgttgaaataaa |
| Syt7 | NM_021659 | gaggggagggccccgagggccaaggcctggctccccatcacgccctaccatttatgcacaa |
| Syt8 | NM_053325 | ggcctatgtgaaggtccagcttatattaaccagagaaagtgaagaagaacaaacatc |
| Syt9 | NM_053324 | cactggcactctctgctggagaacgatgattgtgataggaagactgcttttgccaagg |
| Th | NM_012740 | ccctccatgctctatactacctgattattctctcaataaagggaaggaaagaatctaacc |
| Timp3 | NM_012886 | ggaccgacatgctctccaatttcgggtaccctggctatcagtccaacactacgectgca |
| Tll2 | NM_001191898 | agaaaggctttcacgcccatacaccagcaccaagttccaagatgccttgcatagagga |
| Tph1 | NM_001100634 | tctcgtctcgtgtactgtggtgtatacatgtataatttaaacgtttgtattccactg |
| Ucp2 | NM_019354 | tgcttctctccctcgttgggatcctggaacgtagtaattgttgcacctatgagcagc |
| Ucp3 | NM_013167 | tctcgaaaattgtcctctgacctccatacagcggcctagacaggtgcatatactgtat |
| Vdac1 | NM_031353 | agtttaattgggtacattatagagtcttccattttgtgtggaattagctcctccctcaa |
| Vegfb | NM_053549 | ctgtaactccagctctcaggaggcagaggcaggaggtacgattttgagaacaagctg |
| Vldlr | NM_013155 | taaaacttttcaatggttgggacaatggcaataggataaaacgggttactaagatgaaat |

Приложение 2.

Дифференциально экспрессирующиеся гены в сетчатке крыс OXYS в возрасте 3 месяцев, определяемые методами Deseq и Cufflinks с уровнем значимости $p < 0,05$ с поправкой на множественные сравнения. ***- <0.00001 , **- <0.001 , *- <0.05

| Ensemble Gene ID | Ген | Название гена | Хромо-сома | Соотношение экспрессии мРНК гена | | | |
|-------------------|---------------------|--|------------|----------------------------------|------------|-----------|---------|
| | | | | Deseq | BH p-value | Cufflinks | q-value |
| ENSRNOG0000010344 | <i>B4galnt3</i> | beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 3 | 4 | 7.06 | *** | 6.84 | *** |
| ENSRNOG0000028576 | <i>Calml5</i> | calmodulin 4; <i>Ca2+</i> гомеостаз | 17 | -3.39 | * | -3.46 | *** |
| ENSRNOG0000012932 | <i>Ccdc146</i> | coiled-coil domain containing 146 | 4 | -3.95 | ** | -3.91 | * |
| ENSRNOG0000004743 | <i>Cdcp1</i> | CUB domain containing protein 1; <i>клеточная адгезия</i> | 8 | -6.90 | *** | -7.05 | *** |
| ENSRNOG0000023633 | <i>Crabp1</i> | cellular retinoic acid binding protein 1; <i>регуляция уровня ретиноевой кислоты</i> | 8 | -3.17 | *** | -3.14 | ** |
| ENSRNOG0000000901 | <i>Crp</i> | calcitonin gene-related peptide-receptor component protein; <i>регуляция уровня cAMP</i> | 12 | -2.25 | *** | -2.18 | * |
| ENSRNOG0000002792 | <i>Cxcl2</i> | chemokine (C-X-C motif) ligand 2; <i>иммунный ответ</i> | 14 | -12.34 | * | -11.68 | * |
| ENSRNOG0000025019 | <i>Dio1</i> | deiodinase, iodothyronine, type I; <i>регуляция уровня тиреоидных гормонов</i> | 5 | 7.60 | *** | 7.67 | *** |
| ENSRNOG0000017805 | <i>Diouxa2</i> | dual oxidase maturation factor 2; <i>регуляция уровня тиреоидных гормонов</i> | 3 | снижено | *** | снижено | * |
| ENSRNOG0000009390 | <i>Edn2</i> | endothelin 2; <i>сосудистый тонус</i> | 5 | -11.46 | * | -11.34 | ** |
| ENSRNOG0000015667 | <i>Epcam</i> | epithelial cell adhesion molecule; <i>клеточная адгезия</i> | 6 | -2.88 | * | -2.92 | * |
| ENSRNOG0000018336 | <i>Eps8l2</i> | EPS8-like 2; <i>организация актинового цитоскелета</i> | 1: QTL2 | -2.33 | * | -2.39 | * |
| ENSRNOG0000010791 | <i>Fam65c</i> | family with sequence similarity 65, member C | 3 | -2.66 | *** | -2.82 | * |
| ENSRNOG0000032240 | <i>Gbp5</i> | guanylate binding protein 5; <i>активация воспаления</i> | 2 | -4.91 | * | -5.02 | *** |
| ENSRNOG0000011086 | <i>Gcnt3</i> | glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type; <i>гликозилирование</i> | 8 | -6.27 | *** | -6.35 | ** |
| ENSRNOG0000036604 | <i>Ifit2</i> | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2; <i>иммунный ответ</i> | 1: QTL2 | -4.08 | ** | -3.81 | *** |
| ENSRNOG0000022839 | <i>Ifit3</i> | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; <i>иммунный ответ</i> | 1: QTL2 | -5.49 | * | -5.50 | *** |
| ENSRNOG0000004273 | <i>Ifitm1</i> | interferon induced transmembrane protein 1; <i>иммунный ответ</i> | 1: QTL2 | -3.53 | *** | -3.40 | ** |
| ENSRNOG0000004575 | <i>Il1a</i> | interleukin 1 alpha; <i>иммунный ответ</i> | 3 | -8.38 | * | -6.80 | * |
| ENSRNOG0000009144 | <i>Lad1</i> | ladinin 1; <i>клеточная адгезия</i> | 13 | -2.74 | ** | -2.78 | * |
| ENSRNOG0000006025 | <i>Lamb3</i> | laminin, beta 3; <i>клеточная адгезия</i> | 13 | 3.46 | *** | 3.40 | *** |
| ENSRNOG0000014605 | <i>Lig4</i> | ligase IV, DNA, ATP-dependent; <i>репарация ДНК</i> | 16 | -3.82 | *** | -3.80 | *** |
| ENSRNOG0000033517 | <i>LOC100360791</i> | tumor protein, translationally-controlled 1 | 1: QTL2 | -91.51 | * | -2.78 | * |
| ENSRNOG0000014407 | <i>Ddx60</i> | DEXD/H box helicase; <i>антивирусная геликаза</i> | 16 | -3.35 | * | -3.92 | * |
| ENSRNOG0000023397 | <i>Ly6c</i> | ly6-C antigen | 7 | -8.80 | *** | -8.50 | *** |
| ENSRNOG0000019999 | <i>Lypd3</i> | ly6/Plaur domain containing 3; <i>клеточная адгезия</i> | 1 | -4.55 | * | -4.76 | *** |
| ENSRNOG0000011023 | <i>Nos2</i> | nitric oxide synthase 2, inducible; <i>иммунный ответ</i> | 10 | -4.64 | ** | -4.65 | ** |
| ENSRNOG0000001369 | <i>Oas1a</i> | 2'-5' oligoadenylate synthetase 1A; <i>иммунный</i> | 12 | -3.31 | * | -3.58 | * |

| | | <i>ответ</i> | | | | | |
|---------------------|-------------------|---|---------|---------|-----|---------|-----|
| ENSRNOG00000001187 | <i>Oasl</i> | 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like; <i>иммунный ответ</i> | 12 | -2.56 | *** | -2.59 | * |
| ENSRNOG00000006874 | <i>Opn1sw</i> | opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive; <i>зрение</i> | 4 | 2.51 | * | 2.66 | * |
| ENSRNOG00000031452 | <i>Otop3</i> | otopettrin 3; <i>Ca2+ гомеостаз</i> | 10 | 12.34 | *** | 12.17 | *** |
| ENSRNOG00000002217 | <i>Plac8</i> | placenta-specific 8; <i>функция неизвестна</i> | 14 | -3.00 | * | -2.93 | ** |
| ENSRNOG00000039698 | <i>Prss22</i> | protease, serine 22; <i>протеаза</i> | 10 | -3.92 | *** | -4.01 | ** |
| ENSRNOG00000005336 | <i>Prss27</i> | protease, serine 27; <i>протеаза</i> | 10 | -3.96 | * | -4.04 | *** |
| ENSRNOG00000023640 | <i>Rab25</i> | member RAS oncogene family; <i>внутриклеточный сигналинг</i> | 2 | -4.46 | * | -4.58 | * |
| ENSRNOG00000012744 | <i>RGD1309350</i> | similar to transthyretin (4L369), mitochondrion; hydroxyisourate hydrolase | 1: QTL2 | -3.56 | ** | -3.76 | * |
| ENSRNOG00000043325 | <i>RGD1562234</i> | similar to S100 calcium-binding protein, ventral prostate; <i>Ca2+ гомеостаз</i> | 2 | 20.12 | *** | 24.46 | ** |
| ENSRNOG00000007539 | <i>Rsad2</i> | radical S-adenosyl methionine domain containing 2; <i>иммунный ответ</i> | 6 | -5.03 | *** | -5.00 | *** |
| ENSRNOG00000000777 | <i>RT1-S3</i> | histocompatibility 2, T region locus 23; <i>иммунный ответ</i> | 20 | -3.55 | *** | -3.65 | *** |
| ENSRNOG00000002583 | <i>Serpinb11</i> | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11; <i>ингибитор протеаз</i> | 13 | -5.69 | * | -5.76 | * |
| ENSRNOG00000002640 | <i>Serpinb5</i> | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5; <i>ингибитор протеаз, регуляция фагоцитоза, фибринолиза и коагуляции</i> | 13 | -4.54 | * | -4.64 | *** |
| ENSRNOG00000005903 | <i>St14</i> | suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma), serine protease; <i>протеаза</i> | 8 | -2.54 | * | -2.53 | * |
| ENSRNOG000000038831 | <i>Stfa2</i> | stefin A2, cysteine protease inhibitor; <i>ингибитор протеаз</i> | 11 | снижено | ** | снижено | * |
| ENSRNOG000000029964 | <i>Tmprss11g</i> | transmembrane protease, serine 11G; <i>протеаза</i> | 14 | -4.38 | ** | -4.52 | ** |
| ENSRNOG000000026650 | <i>Tmprss4</i> | transmembrane protease, serine 4; <i>протеаза</i> | 8 | -3.34 | * | -3.35 | * |
| ENSRNOG000000023320 | <i>Tspan1</i> | tetraspanin 1; <i>сигнальная трансдукция</i> | 5 | -2.61 | * | -2.62 | * |
| ENSRNOG000000028765 | <i>Ttc24</i> | tetratricopeptide repeat domain 24 | 2 | 7.02 | * | 6.67 | * |
| ENSRNOG000000020923 | <i>Tuft1</i> | tuftelin 1; <i>минерализация</i> | 2 | -4.67 | *** | -4.67 | * |
| ENSRNOG00000012081 | <i>Txn1</i> | thioredoxin 1; <i>редокс-сигналинг</i> | 5 | -2.48 | * | -2.39 | * |
| ENSRNOG000000027380 | <i>Upklb</i> | uroplakin 1B; tetraspanin; <i>сигнальная трансдукция</i> | 11 | -3.94 | * | -4.08 | *** |
| ENSRNOG00000006314 | <i>Zbp1</i> | Z-DNA binding protein 1; <i>иммунный ответ</i> | 3 | -3.82 | * | -3.97 | * |
| ENSRNOG00000009131 | <i>Zc3h12a</i> | zinc finger CCCH type containing 12A; <i>РНКазная активность, иммунный ответ</i> | 5 | -3.28 | * | -3.21 | * |
| ENSRNOG00000007398 | <i>Znf691</i> | zinc finger protein 691; <i>регуляция транскрипции</i> | 5 | 4.25 | *** | 4.20 | * |

Дифференциально экспрессирующиеся гены в сетчатке крыс OXYS в 18 месяцев, определяемые методами DESeq и Cufflinks с уровнем значимости $p < 0,05$ с поправкой на множественные сравнения. ***- <0.00001 , **- <0.001 , *- <0.05

| Ensemble Gene ID | Ген | Название гена | Хромо-сома | Соотношение экспрессии мРНК гена | | | |
|--------------------|--------------|---|------------|----------------------------------|------------|-----------|---------|
| | | | | Deseq | BH p-value | Cufflinks | q-value |
| ENSRNOG00000009845 | <i>Acadm</i> | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain; <i>бета-окисление жирных кислот в митохондриях</i> | 2 | 1.96 | ** | 2.03 | ** |

| | | | | | | | |
|--------------------|---------------------|---|---------|---------|-----|--------|-----|
| ENSRNOG00000032959 | <i>Adh7</i> | alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide; <i>синтез ретиноевой кислоты</i> | 2 | -5.09 | ** | -4.98 | *** |
| ENSRNOG00000020202 | <i>Asrg1l</i> | asparaginase like 1 | 1: QTL2 | -2.00 | * | -1.95 | * |
| ENSRNOG00000006470 | <i>Camk1g</i> | calcium/calmodulin-dependent protein kinase IG | 13 | 2.47 | ** | 2.51 | * |
| ENSRNOG00000027410 | <i>Ccdc125</i> | coiled-coil domain containing 125 | 2 | -4.14 | ** | -3.82 | ** |
| ENSRNOG00000036571 | <i>Ces2c</i> | carboxylesterase 2 (intestine, liver); <i>метаболизм жирных кислот</i> | 1 | -3.43 | * | -3.33 | * |
| ENSRNOG00000023633 | <i>Crabp1</i> | cellular retinoic acid binding protein 1; <i>регуляция уровня ретиноевой кислоты</i> | 8 | -3.14 | *** | -3.04 | *** |
| ENSRNOG00000010903 | <i>Crb1</i> | crumbs homolog 1 (Drosophila); <i>полярность фоторецепторов</i> | 13 | 1.73 | * | 1.73 | * |
| ENSRNOG00000000901 | <i>Crcp</i> | calcitonin gene-related peptide-receptor component protein; <i>регуляция уровня cAMP</i> | 12 | -1.81 | * | -1.74 | * |
| ENSRNOG00000023953 | <i>Csta</i> | cystatin A (stefin A); <i>ингибитор протеаз</i> | 11 | -4.31 | ** | -4.36 | * |
| ENSRNOG00000025019 | <i>Dio1</i> | deiodinase, iodothyronine, type I; <i>регуляция уровня тиреоидных гормонов</i> | 5 | 30.87 | *** | 30.97 | *** |
| ENSRNOG00000018336 | <i>Eps8l2</i> | EPS8-like 2; <i>организация актинового цитоскелета</i> | 1: QTL2 | -2.53 | * | -2.44 | *** |
| ENSRNOG00000010805 | <i>Fabp4</i> | fatty acid binding protein 4; <i>транспорт жирных кислот и ретиноевой кислоты</i> | 2 | -16.93 | *** | -16.21 | ** |
| ENSRNOG00000001962 | <i>Fam3b</i> | family with sequence similarity 3, member B | 11 | -5.12 | ** | -5.12 | * |
| ENSRNOG00000010791 | <i>Fam65c</i> | family with sequence similarity 65, member C | 3 | -3.70 | *** | -3.78 | *** |
| ENSRNOG00000021020 | <i>Gpha2</i> | glycoprotein hormone alpha 2; <i>тиростимулин, регуляция функций щитовидной железы</i> | 1: QTL2 | -4.63 | ** | -4.64 | * |
| ENSRNOG00000012535 | <i>Gpr115</i> | G protein-coupled receptor 115; <i>орфанный рецептор</i> | 9 | -3.29 | * | -3.20 | * |
| ENSRNOG00000038455 | <i>Gpx2</i> | glutathione peroxidase 2; <i>метаболизм глутатиона</i> | 6 | -3.09 | * | -3.43 | * |
| ENSRNOG00000004273 | <i>Ifitm1</i> | interferon induced transmembrane protein 1 | 1: QTL2 | -3.18 | *** | -3.15 | *** |
| ENSRNOG00000009848 | <i>Il18</i> | interleukin 18 | 8 | -3.15 | * | -3.06 | * |
| ENSRNOG00000018516 | <i>Impa2</i> | inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 | 18 | -3.03 | ** | -2.79 | * |
| ENSRNOG00000006025 | <i>Lamb3</i> | laminin, beta 3 | 13 | 2.59 | * | 2.52 | ** |
| ENSRNOG00000014605 | <i>Lig4</i> | ligase IV, DNA, ATP-dependent | 16 | -5.61 | *** | -5.52 | *** |
| ENSRNOG00000033517 | <i>LOC100360791</i> | tumor protein, translationally-controlled 1 | 1: QTL2 | -281.48 | ** | -5.03 | *** |
| ENSRNOG00000022144 | <i>LOC100361993</i> | transmembrane protein 14C | 13 | 20.12 | *** | 6.77 | * |
| ENSRNOG00000032825 | <i>LOC100365668</i> | unknown | 10 | 5.13 | * | 1.83 | * |
| ENSRNOG00000029668 | <i>LOC360228</i> | WDNM1 homolog | 10 | -2.81 | * | -2.83 | * |
| ENSRNOG00000015285 | <i>Lrp4</i> | low density lipoprotein receptor-related protein 4 | 3 | -2.15 | ** | -2.10 | * |
| ENSRNOG00000023397 | <i>Ly6c</i> | Ly6-C antigen | 7 | -6.28 | *** | -6.32 | *** |
| ENSRNOG00000012772 | <i>Nqo1</i> | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | 19 | -4.36 | * | -4.16 | *** |
| ENSRNOG00000031452 | <i>Otop3</i> | otopetrin 3 | 10 | 22.04 | *** | 24.33 | ** |
| ENSRNOG00000009971 | <i>Plekha8</i> | pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 8 | 4 | 2.05 | ** | 2.10 | * |
| ENSRNOG00000015072 | <i>Ptgr1</i> | prostaglandin reductase 1 | 5 | -2.62 | * | -2.55 | *** |

| | | | | | | | |
|--------------------|-------------------|--|----|----------|-----|----------|-----|
| ENSRNOG00000014090 | <i>Retsat</i> | retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase) | 4 | -1.96 | * | -1.96 | * |
| ENSRNOG00000043325 | <i>RGD1562234</i> | similar to S100 calcium-binding protein, ventral prostate | 2 | повышено | *** | повышено | *** |
| ENSRNOG00000007539 | <i>Rsad2</i> | radical S-adenosyl methionine domain containing 2 | 6 | -2.67 | * | -2.67 | * |
| ENSRNOG00000038999 | <i>RT1-A1</i> | RT1 class Ia, locus A1 | 20 | 2.94 | *** | 2.61 | *** |
| ENSRNOG00000000777 | <i>RT1-S3</i> | histocompatibility 2, T region locus 23 | 20 | -2.69 | ** | -2.65 | ** |
| ENSRNOG00000002640 | <i>Serpinb5</i> | serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5 | 13 | -3.74 | * | -3.71 | *** |
| ENSRNOG00000030539 | <i>Slpi</i> | secretory leukocyte peptidase inhibitor | 3 | -4.17 | ** | -4.05 | * |
| ENSRNOG00000022595 | <i>Snurf</i> | similar to small nuclear ribonucleoparticle-associated protein | 17 | снижено | *** | -2.82 | * |
| ENSRNOG00000001275 | <i>Tmem184a</i> | transmembrane protein 184A | 12 | -4.28 | * | -4.25 | * |
| ENSRNOG00000020923 | <i>Tuft1</i> | tuftelin 1 | 2 | -5.84 | *** | -5.71 | *** |
| ENSRNOG00000027380 | <i>Upk1b</i> | uropod protein 1B | 11 | -4.18 | ** | -4.10 | *** |
| ENSRNOG00000019673 | <i>Zfp36</i> | zinc finger protein 36 | 1 | -2.49 | * | -2.52 | * |
| ENSRNOG00000030410 | <i>Zinki</i> | zinc finger protein 958 | 12 | -2.76 | * | -2.70 | ** |

Приложение 3. Дифференциально экспрессирующиеся гены в 3 и 18 месяцев из локусов QTL.

| ДЭ гены из QTL в 3 месяца | | ДЭ гены из QTL в 18 месяцев | |
|---------------------------|---|-----------------------------|---|
| Acadsb | acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain | Asrgl1 | asparaginase like 1 |
| Ak3 | adenylate kinase 3 | Capn1 | calpain 1 |
| Anxa1 | annexin A1 | Capn5 | calpain 5 |
| Asrgl1 | asparaginase like 1 | Cd19 | CD19 molecule |
| Calcb | calcitonin-related polypeptide, beta | Cox8b | cytochrome c oxidase, subunit 8B |
| Capn5 | calpain 5 | Cpt1a | carnitine palmitoyltransferase 1a, liver |
| Cars | cysteinyl-tRNA synthetase | Cst6 | cystatin E/M |
| Eps8l2 | EPS8-like 2 | Drd4 | dopamine receptor D4 |
| Gpha2 | glycoprotein hormone alpha 2 | Eps8l2 | EPS8-like 2 |
| Ifit1 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 | Gda | guanine deaminase |
| Ifit2 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 | Gdpd3 | glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 |
| Ifit3 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 | Gpha2 | glycoprotein hormone alpha 2 |
| Ifitm1 | interferon induced transmembrane protein 1 | Hps1 | Hermansky-Pudlak syndrome 1 homolog (human) |
| Ifitm3 | interferon induced transmembrane protein 3 | Ifitm1 | interferon induced transmembrane protein 1 |
| Irf7 | interferon regulatory factor 7 | Iqgap1 | IQ motif containing GTPase activating protein 1 |
| Isg20 | interferon stimulated exonuclease 20 | LOC499306 | hypothetical gene supported by BC078985 |
| Kif11 | kinesin family member 11 | LOC689064 | beta globin minor gene |
| Lipa | lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase | Mctp2 | multiple C2 domains, transmembrane 2 |
| Mki67 | antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 | Mki67 | antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 |
| Mpeg1 | macrophage expressed gene 1 | Nlrp6 | NLR family, pyrin domain containing 6 |
| Mvp | major vault protein | Oosp1 | oocyte secreted protein 1 |
| Npas4 | neuronal PAS domain protein 4 | Pdilt | protein disulfide isomerase-like protein of the testis |
| P2ry2 | purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2 | Pdlim1 | PDZ and LIM domain 1 |
| Pde8a | phosphodiesterase 8A | Ppp1r3c | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C |
| Pdilt | protein disulfide isomerase-like protein of the testis | Pyroxd2 | pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2 |

| | | | |
|------------|--|------------|---|
| Pkp3 | plakophilin 3 | Rassf7 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 7 |
| Ppp1r3c | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C | RGD1309350 | similar to transthyretin (4L369) |
| Pyroxd2 | pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2 | RGD1310016 | - |
| RGD1309350 | similar to transthyretin (4L369) | Snurf | SNRPN upstream reading frame |
| RGD1359158 | similar to RIKEN cDNA 1110059E24 | Syt17 | synaptotagmin XVII |
| Snurf | SNRPN upstream reading frame | Syt12 | synaptotagmin-like 2 |
| Stx3 | syntaxin 3 | Tmc5 | transmembrane channel-like 5 |
| Tmem138 | transmembrane protein 138 | Tsga10ip | testis specific 10 interacting protein |
| Tsga10ip | testis specific 10 interacting protein | | |
| Zfp143 | zinc finger protein 143 | | |