

РАЗВИТИЕ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У КРЫС
OXYS СОПРОВОЖДАЕТСЯ СНИЖЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ
ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА
(CDNF) И НЕ КОМПЕНСИРУЕТСЯ ЕГО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ

© 2024 г. Я. П. Каминская¹, Т. В. Ильчибаева¹, Т. А. Козлова¹, Н. Г. Колосова¹,
В. С. Науменко¹, А. С. Цыбко¹, *

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*E-mail: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2024 г.
После доработки 14.07.2024 г.
Принята к публикации 18.07.2024 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, приводящее к сенильной деменции. Известно, что процессы нейродегенерации тесно связаны с нейротрофическим обеспечением. В этой работе, проведенной на модели БА – линии быстростраеющих крыс OXYS, впервые был выявлен дефицит CDNF в гиппокампе, а также предпринята попытка его компенсации путем индукции сверхэкспрессии с помощью адеоассоциированного вирусного конструкта. Конструкты были введены в область дорсального гиппокампа крыс в возрасте трёх месяцев. Через 15 месяцев после введения конструкта нами была показана сверхэкспрессия CDNF в целевой структуре, но не было выявлено ее эффекта на обучение и память животных в водном лабиринте Морриса, а также на накопление А β и Тау-белка и экспрессию генов, вовлеченных в реакцию несвернутых белков (UPR).

Ключевые слова: нейротрофические факторы, дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF), крысы OXYS, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S1027813324040085, **EDN:** EGPQEI

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, приводящее к сенильной деменции. Отличительными чертами БА является формирование внеклеточных бляшек из белка β -амилоида (А β), гиперфосфорилирование и агрегация связанного с микротрубочками Тау-белка [1]. Оба процесса в конечном счете приводят к нейровоспалению, синаптическим повреждениям и гибели нейронов.

БА обладает сложным патогенезом и одним из ключевых звеньев вероятно является дисбаланс нейротрофических факторов (НТФ). Еще в 1981 году Appel выдвинул универсальную теорию для нейродегенеративных заболеваний – каждое из нарушений обусловлено отсутствием специфического нейротрофического фактора [2]; со временем она была модифицирована, однако звание “перспективных мишеней” за НТФ закрепилось [3]. В контексте БА наиболее изученными являются

фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) и нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Так, для NGF было показано нарушение процесса созревания и увеличение деградации его зрелой формы [4, 5]; а относительно BDNF данные периферической крови, спинномозговой жидкости и post-mortem исследования образцов головного мозга последовательно указывают на снижение экспрессии BDNF при БА [6, 7]. Были предприняты попытки использовать эти НТФ для лечения БА, однако исследования были остановлены из-за ряда причин: 1) НТФ не способны преодолеть гематоэнцефалический барьер; 2) BDNF при интракраниальном введении обладает коротким периодом полувыведения и низким распределением; 3) инъекция NGF в желудочки головного мозга сопровождалась тяжелыми побочными эффектами [8, 9]. NGF был опробован в трех клинических испытаниях, результаты которых оказались неоднозначными [10]. В первом использовались аутологичные фибробlastы,

модифицированные для синтеза NGF, однако, изменений со стороны когнитивных функций и метаболической активности нейронов зафиксировано не было [11]. Во втором исследовании в качестве вектора использовались эпителиальные клетки сетчатки и только у двух пациентов имели место положительные изменения в когнитивных тестах [12]. Для третьего клинического исследования на общей выборке в 49 человек в качестве способа доставки был выбран аденоассоциированный вирусный вектор, однако различий в когнитивных результатах не наблюдалось, что было связано с плохим распространением NGF и неэффективным выбором координат [13].

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor, CDNF) достаточно сильно отличается от "классических" НТФ. Для него не было найдено специфических рецепторов на плазматической мемbrane клеток и не обнаружено формы-предшественника, кроме того, CDNF может как находиться в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР), так и секретироваться клетками [14]. Именно локализацией в ЭПР и участием в реакции несвернутых белков (unfolded protein response, UPR) объясняют его нейропротекторные и нейровосстановительные свойства [15]. CDNF исследовался главным образом в качестве потенциального терапевтического агента при болезни Паркинсона (БП) и уже успешно прошел первую стадию клинических испытаний [16]. Несмотря на растущее количество доказательств участия стресса ЭПР в патогенезе БА, данные о применении CDNF на животных моделях БА ограничиваются лишь одной публикацией [17]. В указанной работе было показано, что как вирус-опосредованная сверхэкспрессия CDNF, так и инъекция рекомбинантного белка CDNF улучшает долговременную память на мышах линии APP/PS1 [17]. Кроме того на первичной культуре клеток гиппокампа крыс было показано, что обработка белком CDNF уменьшает синаптотоксичность β -амилоида, а также смягчает стресс ЭПР за счет снижения Bip (binding immunoglobulin protein – белок, связывающий иммуноглобулины, известный также как глюкозо-регулируемый белок – GRP78) и pEIF2 (eukaryotic initiation factor 2 – эукариотический фактор инициации 2) [18].

В данной работе мы оценили межлинейное различие экспрессии CDNF у крыс Вистар и крыс линии OXYS – спорадической модели БА [19]. Эти животные демонстрируют фенотип раннего старения и характеризуются той же последовательностью патогенетических событий, что и у пациентов с БА: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование Тау-белка, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня

белка-предшественника амилоида (Amyloid-beta precursor protein, APP) и усиленного накопления А β [20]. Примечательно, что для крыс OXYS ранее было показано, что проявлениям признаков БА предшествуют изменения баланса системы НТФ [21, 22].

Далее мы предприняли попытку скомпенсировать выявленный дефицит CDNF с помощью индукции его сверхэкспрессии в гиппокампе и оценили ее влияние на экспрессию ключевых в контексте БА генов, генов UPR, а также когнитивные способности животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Эксперимент проводился в два этапа. Первый этап: оценка межлинейных различий и возрастной динамики (20 дней/3.5 месяца/18 месяцев) экспрессии *Cdnf* в гиппокампе крыс линии OXYS и крыс Вистар ($n = 6$). Гиппокамп – структура мозга, которая поражается при БА одной из первых [23], кроме того, для крыс OXYS ранее была показана возраст-зависимая потеря нейронов и накопление А β в этой структуре [19]. Второй этап: введение вирусного вектора, кодирующего целевой белок или флуоресцентную метку крысам линии OXYS, с последующим тестированием животных для оценки пространственного обучения и памяти (рис. 1).

Плазмида. С помощью праймеров (F5'-tag ctGGATCCccaccatgcgggtgcaccagtccg – 3' и R5'-tagctACCGGTtcagagctctgtttgggggc – 3'), содержащих сайты распознавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и AgeI, мы синтезировали ген *Cdnf* крысы, используя кДНК крыс Вистар в качестве матрицы. Полученную последовательность обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и AgeI (New England Biolabs, США), и лигировали в вектор pAAV-Syn-EGFP для экспрессии под контролем синапсивного промотора. Ген *Cdnf* содержал стоп-кодон, для получения функциональной формы CDNF без зелёного флуоресцентного белка (EGFP) на С-конце. Данный стоп-кодон, тем не менее, позволяет экспрессироваться EGFP в количестве достаточном для контроля эффективности экспрессии плазмида в нейронах млекопитающих. В качестве контроля использовали плазмиду, несущую только ген EGFP. Все этапы клонирования были проверены секвенированием по Сэнгеру, которое было проведено на базе ЦКП "Геномика" СО РАН.

Клеточная культура и трансфекция. Клетки НЕК 293FT # РТА-5077 ("ATCC", США) использовали для получения векторов рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Линию клеток поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS ("Sigma-Aldrich", США) и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина ("Sigma-Aldrich"), при 37°C

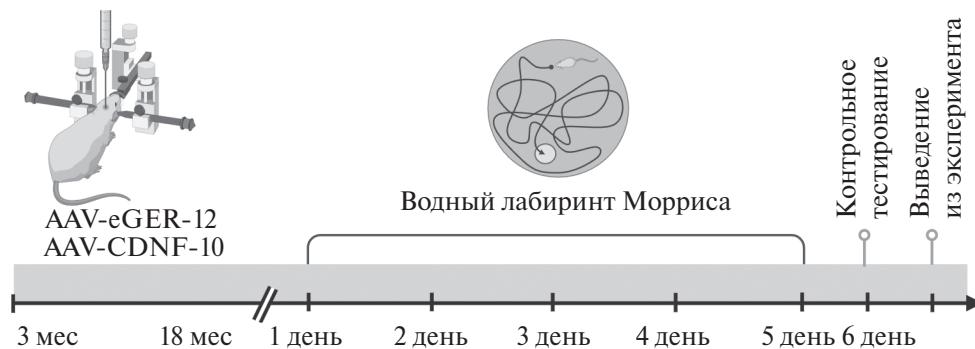


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

в атмосфере 5% CO₂. Клетки пассировали при конфлюентности не менее 70%, и культуральную среду обновляли каждые 2–3 дня.

Упаковку AAV-Syn-CDNF-EGFP и AAV-Syn-EGFP в капсиды AAV проводили путём котрансфекции с плазмидами AAV-DJ и pHelper (“Cell Biolabs Inc”, США) в HEK-клетки. Вирусные частицы собирали через 48 ч согласно протоколу, описанному Гриммом и соавторами [24]. Количество полученных вирусных частиц определяли методом количественной ПЦР (кПЦР) как было описано ранее [25].

Экспериментальные животные. Исследования проводились на самцах аутбредных крыс Вистар и крыс линии OXYS, полученных из лаборатории молекулярных механизмов старения Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия). Животных содержали в стандартных условиях при искусственном 12-часовом освещении и свободном доступе к сбалансированному корму и воде. Начиная с четырехнедельного возраста животных содержали группами по 4–5 особей в клетках размерами 50×33×20 см.

В возрасте 3 мес. животным осуществляли инъекцию аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), кодирующего CDNF (AAV-CDNF, n = 10) или зелёный флуоресцентный белок (EGFP) (AAV-EGFP, n = 12). В возрасте 18 месяцев (что соответствует стадии прогрессии признаков БА) тестировали животных в водном лабиринте Морриса (рис. 1).

Крысы были декапитированы через 24 ч после окончания поведенческих тестов. Мозг был извлечён на льду, образцы гиппокампа были выделены, заморожены в жидким азоте и хранились при температуре –80 °С до процедур выделения РНК или белка.

Стереотаксическое введение в гиппокамп. Перед проведением процедуры животных наркотизировали смесью 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутина; после помещали в стереотаксическую установку (“TSE Systems”, Германия). Далее череп

билатерально просверливали, согласно координатам AP: –2.6 мм; ML: 1.5 мм; DV: 3.0 мм (<https://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/?ml=%2B1.5&ap=-2.6&dv=3>). Вирусные частицы (1 мкл), разведённые в 1× PBS до концентрации 10⁹ вирусных частиц в мкл, медленно вводили микрошприцем в гиппокамп со скоростью 0.1 мкл/мин в течение 10 мин. После инъекции иглу оставляли в месте инъекции ещё на 2 мин, чтобы минимизировать утечку вирусной супензии при извлечении иглы.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью ExtractRNA (“ЕвроГен”, Россия), обрабатывали ДНКазой без РНКазой активности (RNase free DNase, 1000 о.е./мл; “Promega”, США) в соответствии с протоколами производителей. РНК разводили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при –80 °С. На основе полученной общей РНК синтезировали кДНК. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System (“Roche”, Швейцария). кДНК (1 мкл) смешивали с 19 мкл смеси Master mix, содержащей краситель SYBR Green I (“Синтол”, Россия), приготовленной согласно инструкции производителя. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов, представлены в табл. 1. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл была амплифицирована одновременно и была использована как внешний стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 (“Roche Applied Science”). Для контроля специфичности амплификации использовался анализ кривой плавления для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессию генов представляли как отношение количества копий кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена *rPol2a*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [26–28]. Для сплайсированной (sXbp1) и несплайсированной (uXbp1) форм Xbp1 расчёт производился по методу $\Delta\Delta Ct$ с помощью программного обеспечения амплификатора.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики используемых праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, пн
<i>rPol2a</i>	F 5'- ttgtcgccagcagaacgtg -3' R 5'- caatgagaccttcgtcctccc -3'	62	186
<i>Cdnf</i>	F 5'- gaagaaaattggacttggaaatctg -3' R 5'- ccagttcttaatgagggtcac -3'	61	137
<i>Atf6</i>	F 5'- accatagcaaggactgtcca -3' R 5'- aggacttageccgcattgtg -3'	60	175
<i>Grp78</i>	F 5'- cgcctgacccctgaagaaat -3' R 5'- gagacagcttaccccccagc -3'	60	169
<i>Perk</i>	F 5'- cagtgaactcagaggacgcag -3' R 5'- tggacgcattatcacagcc -3'	60	200
<i>Ire1a</i>	F 5'- tggagacagtgaatctgggg -3' R 5'- cgtagggtctccacagcaac -3'	60	129
<i>sXbp1</i>	F 5'- gctgagtcgcgcagcagg -3' R 5'- cagggtccaaacttgcagaat -3'	60	130
<i>uXbp1</i>	F 5'- cagactacgtgcacccctgc -3' R 5'- cagggtccaaacttgcagaat -3'	60	139
<i>Mapt</i>	F 5'- gttctgctccgggtctc -3' R 5'- ggaatgtgaactcaggggca -3'	66	184
<i>Cdk5</i>	F 5'- cctgtgaagtgtaaacccagtgc -3' R 5'- ctgggaggaggcttaataggtc -3'	65	141
<i>App</i>	F 5'- agcagaactactccgcacgc -3' R 5'- gctgaattcgccattcacgg -3'	60	137

Вестерн-блот-анализ. Для определения уровня общего белка образцы ткани гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl (pH 8.4), 300 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 0.2% (w/v) Triton X-100; 1 мМ NaVO₄, 2 мМ PMSF, 1 мМ смеси ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich”). Гомогенат инкубировали на льду 60 мин и центрифугировали (12 000 g, 15 мин) с последующим отбором супернатанта. Количество общего белка было измерено по методу BCA с использованием коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit (“Thermo Fisher Scientific Inc.”). Пробы разводились до концентрации 1500 мкг/мл с помощью 2-кратного буфера Лэммли и хранились при температуре –20°C. Проводили термическую обработку проб для денатурации белка (5 мин, 95°C). Экстракты белка (15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного разделяющего SDS-PAGE. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США) с помощью системы для полусухого электроблоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System (“Bio-Rad”).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведённым в буфере TBS-T (Tris Bufferd Saline, “Bio-Rad Laboratories Inc.”, США) с добавлением 0.05% (v/v) Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи (табл. 2).

После первичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T и инкубировали со вторичными поликлональными антителами (табл. 1), конъюгированными с пероксидазой хрина, при комнатной температуре в течение часа. Затем мембрану снова отмывали 5 раз по 5 мин буфером TBS-T.

Связанные антитела визуализировались с помощью Clarity Western ECL (“Bio-Rad”), в соответствии с инструкцией производителя, и сканера C-Digit Blot Scanner (“Li-Cor”, США), с последующей количественной оценкой при помощи программы Image Studio Lite 5.2.

Для каждой мембраны проводилось измерение конститутивного белка GAPDH в качестве

Таблица 2. Характеристики используемых в работе антител

Белок	Первичные антитела:		Вторичные антитела: разведение, шифр производителя
	разведение	шифр производителя	
CDNF	1 : 500	Pag458Mu01 (CloudClone, США)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 (Invitrogen, США)
TAU	1 : 2000	AHB0042 (Invitrogen, США)	Против мыши 1: 30 000 Ab 6728 (Abcam, Великобритания)
phospho-TAU Ser202/Thr205	1 : 1000	MN1020 (Invitrogen, США)	
CDK5	1 : 500	AF6371 (Affinity Biosciences, Австралия)	
phospho-CDK5 Tyr15	1 : 500	AF3371 (Affinity Biosciences, Австралия)	Против кролика 1 : 3 000 G-21234 (Invitrogen, США)
phospho-CDK5 Ser159	1 : 1000	AF8366 (Affinity Biosciences, Австралия)	
APP	1 : 200	AF6084 (Affinity Biosciences, Австралия)	Против кролика 1 : 7 000 G-21234 (Invitrogen, США)
GAPDH	1 : 7000	Ab 8245 (Abcam, Великобритания)	Против мыши 1:30 000 ab6728 (Abcam, Великобритания)

внутреннего стандарта для дальнейшей нормировки. Экспрессия белка выражалась в относительных единицах.

Иммунофлуоресцентный анализ. Животные (n = 2) транскардиально последовательно перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4%-ным раствором параформальдегида. Мозг извлекали и постфиксировали 4%-ным параформальдегидом на 6 ч, затем погружали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS на 2 дня. Последовательные срезы толщиной 14 мкм делали в криостате (“Thermo Scientific”, США). Пермеабилизацию проводили погружением в 0.3%-ный раствор Triton X-100 (T8787, “Sigma-Aldrich”) на 30 мин. Неспецифическое связывание блокировали 5%-ной нормальной осмоляной сывороткой (“Sigma-Aldrich”) и 0.1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Инкубацию с антителами anti-Calreticulin [FMC 75] (1 : 1000, ab22683, “Abcam”) и anti-CDNF (1 : 1000; “Icosagen AS”, Эстония), разведённым в PBS, проводили в течение ночи при 4 °C. После промывания в PBS наносили вторичные антитела с флуоресцентными метками на 1 ч при комнатной температуре (1 : 400, #711-545-152 Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG и 1 : 200 #A-21203 Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594). Ядра клеток окрашивали раствором

бис-бензимида (краситель Hoechst 33258 (5 мкг/мл в PBS); “Sigma-Aldrich”). Срезы помещали в монтирующую среду (Fluoromount G; “Associates Biotechnology Southern”, США) с последующим микроскопическим анализом с использованием конфокального микроскопа Olympus IX83P2ZF (“Olympus Corp.”, Япония).

Водный лабиринт Морриса. Установка для теста представляла собой круглый бассейн диаметром 200 см. Бассейн заполняли водой (температура – 25 °C) и добавляли сухое молоко для непрозрачности. Стеклянная платформа диаметром 170 см² помещалась в геометрический центр нижнего правого сектора так, что она оказывалась на 0.5 см ниже уровня воды, становясь невидимой для животных. На ближайшую к платформе стену бассейна клеили чёрный прямоугольник, который служил визуальным ориентиром.

Обучение животных проводилось в течение 5 дней, по 3 тестирования каждый раз. При обучении животное помещали в центр одного из секторов, кроме целевого, и в течение 60 секунд оно искало платформу. Вне зависимости от того, была найдена платформа или нет, в конце каждого тестирования крысу помещали на платформу и удерживали (если требовалось) там в течение 15 секунд. Все раунды тестирования фиксировались при помощи веб-камеры для последующего анализа

латентного времени нахождения платформы (с). На шестой день проводили контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти у животных. Для этого платформу убирали, животное помещали в центр бассейна и фиксировали его перемещение в течение 60 с. Оценивали время нахождения в целевом секторе (%), затем считали среднее по трём тестированием. Статистически значимое превышение времени нахождения в целевом секторе над случаем (25%) свидетельствовало о том, что крыса помнит расположение платформы.

Статистическая обработка результатов. Для выявления и исключения выбросов из выборки использовался метод ROUT ($Q = 0.05$). Распределение данных контролировали на нормальность с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Данные первого этапа (межлинейные различия и возрастная динамика) анализировались с помощью двухфакторного анализа ANOVA с последующим апостериорным анализом по Фишеру, результаты молекулярных методик второго этапа исследования обрабатывались с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни, в зависимости от распределения. В отношении динамических показателей поведения произошелся анализ повторных измерений с помощью

смешанной линейной модели с последующим апостериорным анализом по Фишеру. Все значения представлены как $m \pm SEM$. Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism 9.1.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Межлинейные различия в экспрессии CDNF.

При сравнении крыс Вистар и OXYS в трёх временных точках отмечается влияние на экспрессию *Cdnf* как возраста, так и линии ($F_{(2, 29)} = 7.383$; $p = 0.0026$ и $F_{(1, 29)} = 20.36$; $p < 0.0001$, соответственно; рис. 2a), в то же время взаимодействия этих факторов достоверно не выявлено ($F_{(2, 29)} = 3.173$; $p = 0.06$). При апостериорном анализе нами было выявлено снижение уровня транскриптов *Cdnf* у крыс OXYS по сравнению с Вистар начиная с 3.5-месячного возраста ($p = 0.03$) и сохраняющееся в возрасте 18 месяцев ($p < 0.0001$).

На уровень белка CDNF повлияла принадлежность к линии ($F_{(1, 28)} = 15.89$; $p = 0.0004$; рис. 2б), но не возраст ($F_{(2, 28)} = 2.017$; $p > 0.05$). При апостериорном анализе нами было выявлено снижение уровня CDNF у крыс OXYS по сравнению с Вистар во всех возрастных точках ($p = 0.0492$; $p = 0.0317$;

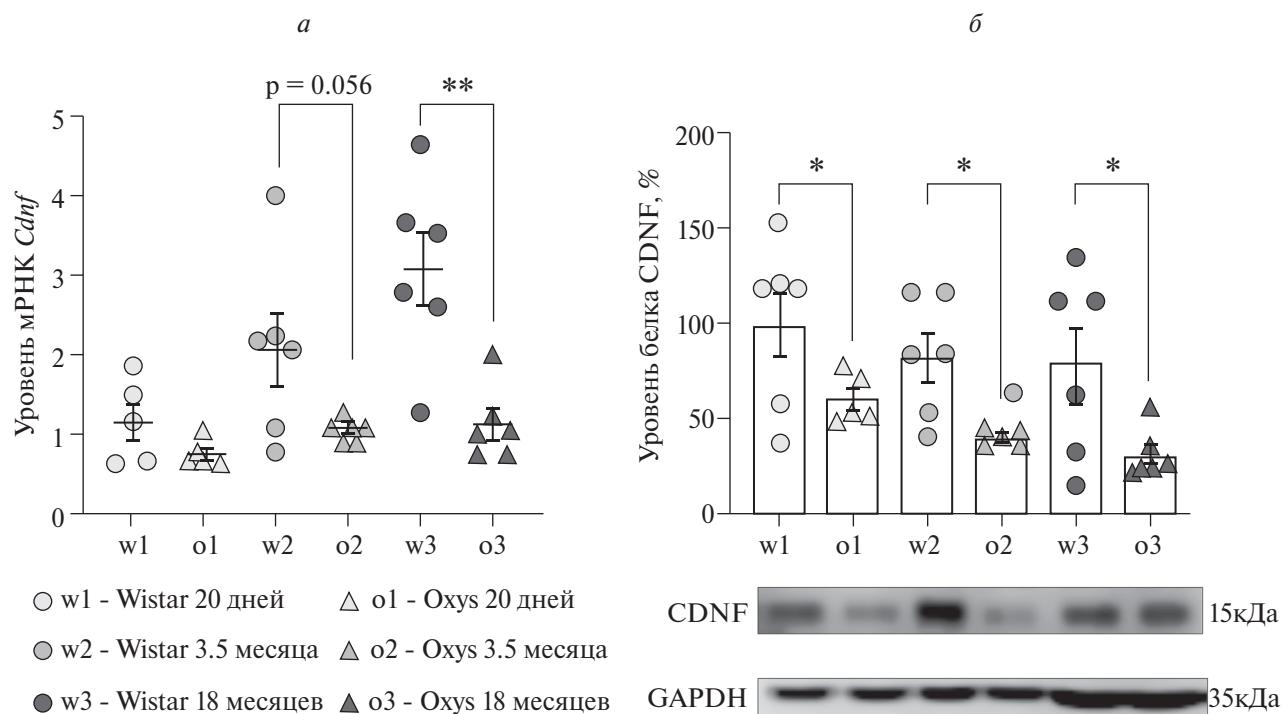


Рис. 2. Экспрессия CDNF в гиппокампе крыс линии OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 3.5 месяца и 18 месяцев: *a* – уровень мРНК гена *Cdnf*; *б* – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF и результат иммуноблота на мемbrane. Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2a*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – по сравнению с контролем.

$p = 0.0146$). Взаимодействия факторов линия \times возраст не выявлено ($F_{(2, 28)} = 0.048$; $p > 0.05$).

Сверхэкспрессия CDNF. Так как на уровне мРНК дефицит регистрировался в возрасте 3.5 месяцев, нами была выбрана эта возрастная точка для индукции сверхэкспрессии. Спустя 15 месяцев было установлено, что интрагиппокампальная инъекция AAV-CDNF вызвала повышение уровня мРНК *Cdnf* более чем в двенадцать раз ($t = 4.571$; $df = 17$; $p < 0.001$; рис. 3б).

Вестерн-блот-анализ также показал, что уровень белка CDNF в гиппокампе экспериментальных животных значительно вырос ($t = 2.59$; $df = 14$; $p = 0.0215$; рис. 3в). Таким образом, была достигнута сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе

экспериментальных животных, что также было подтверждено данными микроскопии. По результатам иммуногистохимического окрашивания с кальретикулином, проведённому на срезах гиппокампа, было обнаружено, что экспрессируемый CDNF преимущественно локализуется в ЭПР (рис. 3а).

Влияние сверхэкспрессии CDNF на память и пространственное обучение. Тестирование в водном лабиринте Морриса показало, что на латентное время нахождения платформы не повлиял день тестирования ($F(4, 56) = 1.55$; $p > 0.05$), но повлияла принадлежность животного к опытной или контрольной группе ($F_{(1, 15)} = 12.7$; $p < 0.001$; рис. 4а). При апостериорном сравнении выявлено достоверное различие между группами AAV-EGFP и AAV-CDNF в первый и пятый дни тестирования ($p = 0.026$

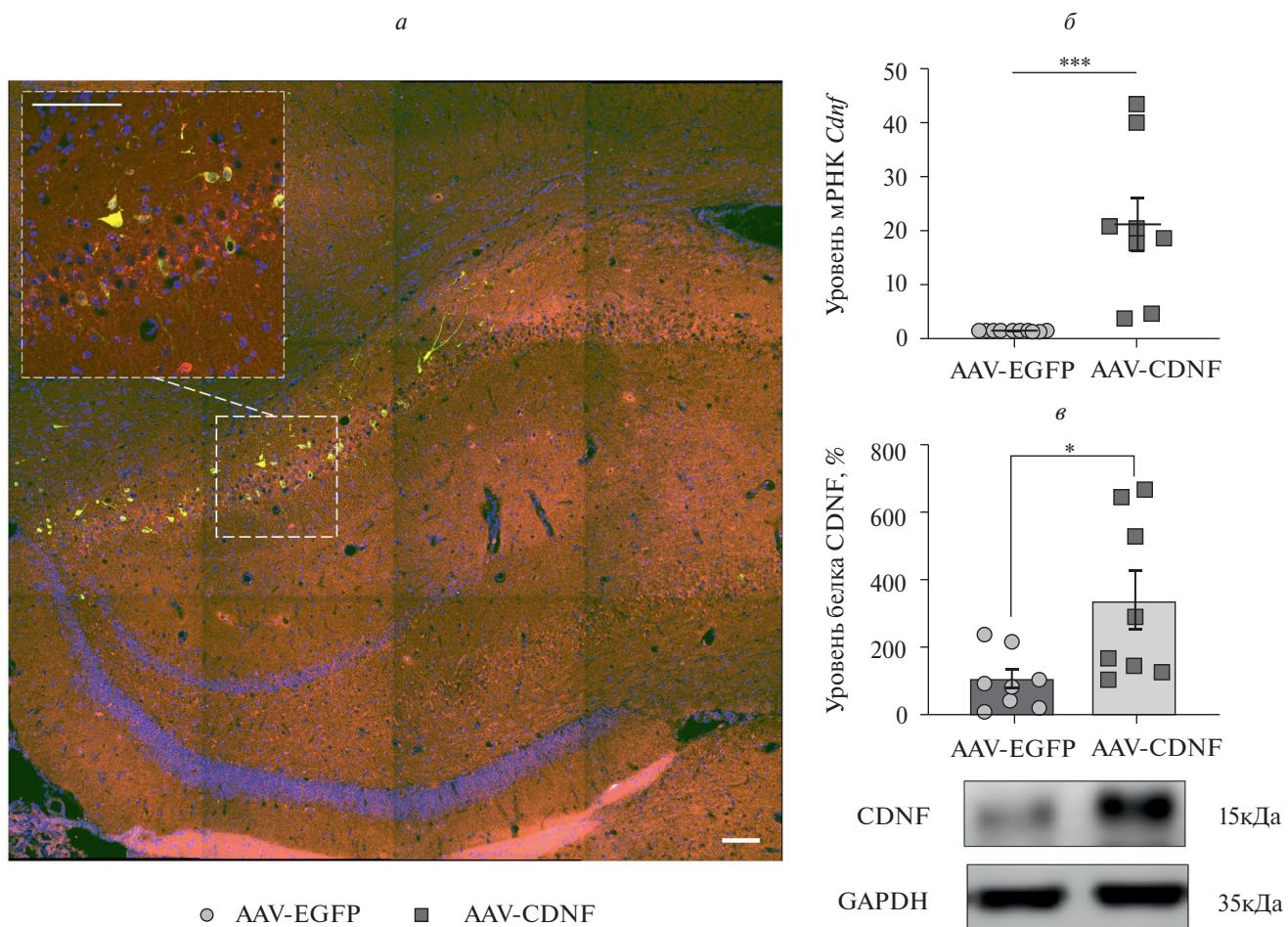


Рис. 3. Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе крыс OXYS. *а* – совместная локализация кальретикулина и трансдуплированного CDNF в CA1-области гиппокампа (масштабная линейка – 100 мкм). Срезы гиппокампа подвергали иммуногистохимическому окрашиванию для обнаружения CDNF (зелёный) и кальретикулина (красный) с последующей конфокальной микроскопией. Ядра показаны синим цветом. Колокализация показана жёлтым цветом. *б* – уровень мРНК гена *Cdnf*; *в* – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка CDNF и результат иммуноблота на мемbrane. Число копий кДНК гена отнесено на 100 копий кДНК *rPol2a*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ – по сравнению с контролем.

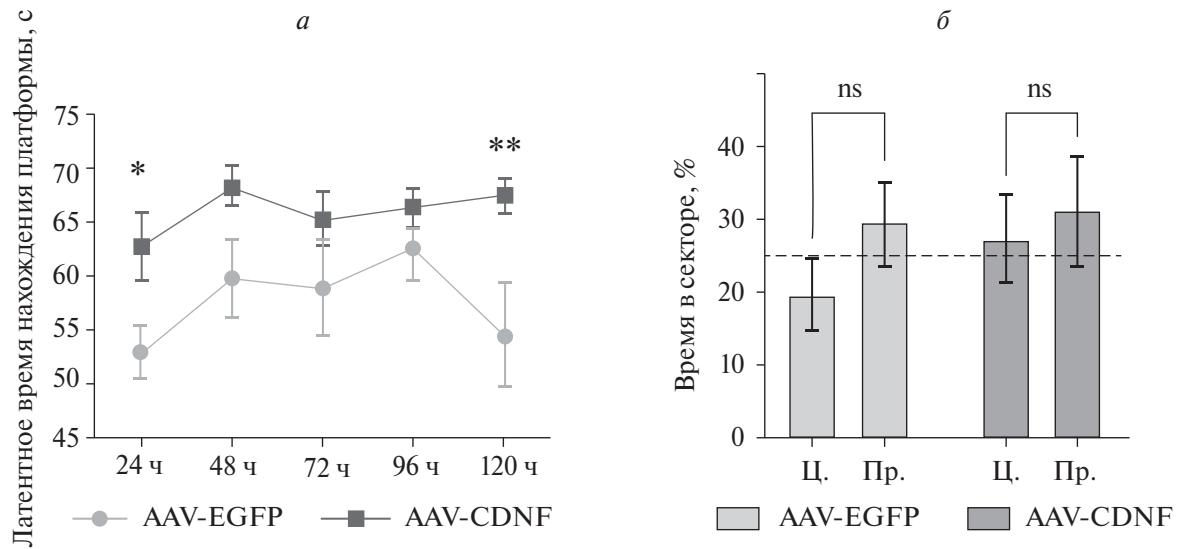


Рис. 4. *а* – Латентное время нахождения платформы в тесте “водный лабиринт Морриса” для животных со сверхэкспрессией CDNF и животных контрольной группы; *б* – Контрольное тестирование для проверки качества формирования пространственной памяти. Время (%), проведённое в целевом секторе (Ц.): по сравнению с противоположным сектором (Пр.) и по сравнению с 25%-ной вероятностью случайного нахождения в целевом секторе (обозначено пунктирной линией). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ – для группы AAV-CDNF по сравнению с AAV-EGFP.

и $p = 0.0066$ соответственно). Взаимодействия факторов не наблюдалось ($F_{(4, 56)} = 0.69$; $p > 0.05$).

В контрольный день тестирования (без платформы) не было выявлено статистически значимого нахождения в целевом секторе по сравнению с противоположным ($F_{(1, 30)} = 1.177$; $p > 0.05$) ни для

животных из группы AAV-CDNF, ни для животных из группы AAV-EGFP ($F_{(1, 30)} = 0.57$; $p > 0.05$; рис. 4б).

При сравнении времени, проведенного в целевом секторе со случайной вероятностью нахождения в секторе (25%) достоверных отличий

Таблица 3. Профиль экспрессии генов UPR в гиппокампе для животных со сверхэкспрессией CDNF (AAV-CDNF) и животных контрольной группы (AAV-EGFP)

Ген	$m \pm SEM$		p-value	Характеристика гена
	AAV-EGFP	AAV-CDNF		
<i>Atf6</i>	20.78 ± 0.54	22.93 ± 0.76	0.0298	Activating Transcription Factor 6 – фактор транскрипции, который активирует гены-мишени UPR
<i>Grp78</i>	185.7 ± 6.94	184.0 ± 9.47	0.8815	Белок теплового шока, репрессор UPR
<i>Perk</i>	26.28 ± 0.9	26.44 ± 1.18	0.9107	Ингибитор инициации трансляции, активируемый UPR
<i>Ire1α</i>	8.93 ± 0.24	8.91 ± 0.42	0.9625	Инозитол-требующая киназа 1 – сенсор UPR
<i>sXbp1</i>	0.058 ± 0.003	0.056 ± 0.002	0.5593	X-box binding protein 1 – транскрипционный фактор (активная сплайсированная форма)
<i>uXbp1</i>	1.45 ± 0.05	1.4 ± 0.06	0.5705	X-box binding protein 1 – транскрипционный фактор (несплайсированная форма)
<i>sXbp1/uXbp1</i>	0.039 ± 0.0004	0.04 ± 0.001	0.2282	Соотношение сплайсированной и несплайсированной форм Xbp

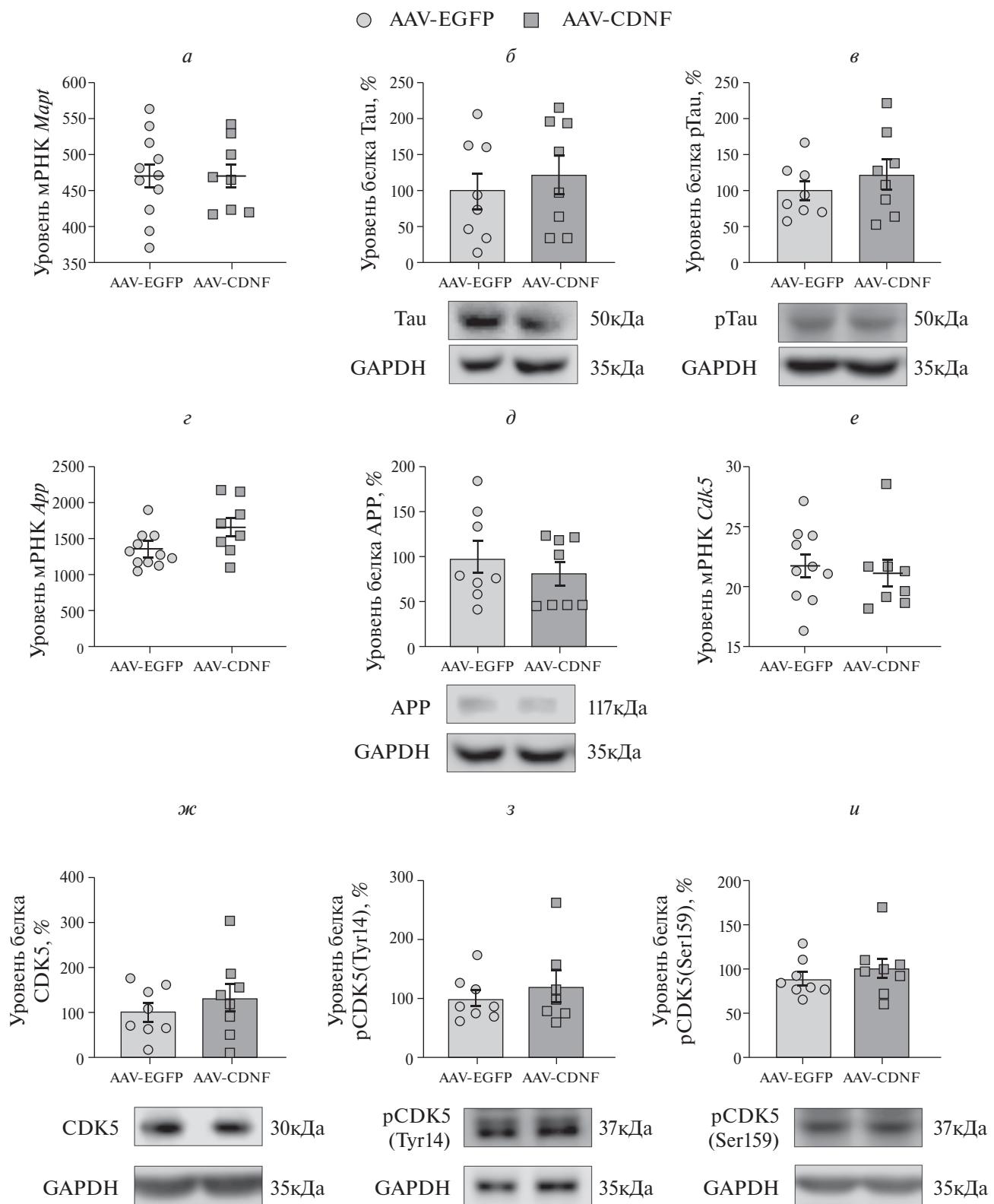


Рис. 5. Экспрессия генов *Mapt* (a), *App* (c), *Cdk5* (e). Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесённое на 100 копий *rPol2*. Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала для белка, а также результаты иммуноблота на мембранах для TAU (b), pTAU (f), APP (d), CDK5 (j), pCDK5 (Tyr15) (z), pCDK5(Ser159) (u). Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH.

выявлено не было ($F_{(1,30)} = 0.1974$; $p > 0.05$ и $F_{(1,30)} = 0.9157$; $p > 0.05$), что означает нарушение формирования пространственной памяти у всех экспериментальных животных.

Таким образом, сверхэкспрессия CDNF не оказалась положительного эффекта ни на динамику пространственного обучения, ни на память животных.

Эффекты сверхэкспрессии CDNF на экспрессию генов UPR. Так как предположительно положительные эффекты CDNF связаны с его локализацией в ЭПР и участием в реакции UPR, мы проверили уровень экспрессии ключевых генов, вовлеченных в этот процесс (табл. 3).

Достоверное изменение зафиксировано только для *Atf6* ($t = 2.371$, $df = 17$; $p = 0.0298$), его экспрессия была выше в группе AAV-CDNF.

Влияние сверхэкспрессии CDNF на белки-маркеры БА. Также мы оценили экспрессию генов и уровень белка для основных маркерных белков БА. Сверхэкспрессия CDNF не оказала эффекта на экспрессию и уровень Тау-белка (рис. 5 a , b) и APP (рис. 5 g , d). Для Тау-белка был также оценен уровень фосфорилированной формы (рис. 5 e), так как эта модификация, вероятно, является более информативным предиктором агрегации Тау-белка [29].

Кроме того мы измерили экспрессию и уровень белка циклин-зависимой киназы 5 (CDK5; рис. 5 e , $ж$). Её активация (фосфорилирование) вызывает aberrантное гиперфосфорилирование различных субстратов, в том числе APP и Тау, поэтому мы также оценили уровень белка CDK5, фосфорилированного по Tyr15 и Ser159 (рис. 5 z , $и$). Однако, сверхэкспрессия CDNF не оказала влияния на фосфорилирование CDK5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами впервые показан дефицит CDNF в гиппокампе у крыс OXYS, что позволяет говорить о более существенных нарушениях баланса НТФ, чем считалось прежде, более того ранее не было показано, что нативный дефицит CDNF связан с каким-либо патологическим фенотипом. На данный момент имеются только косвенные данные, позволяющие предположить, что дефицит CDNF может быть связан с БА: у пациентов с предполагаемым диагнозом БА было показано снижение CDNF в тромбоцитах периферической крови [30]. Однако, значимое снижение CDNF было зафиксировано только для пациентов мужского пола, исследование проводилось на небольшой выборке пациентов, не учитывался прием лекарственных средств, которые могли изменить экспрессию CDNF, в целом нет доказательств, что уровень экспрессии CDNF в тромбоцитах соотносится с его экспрессией в головном мозге. Таким

образом, мы впервые убедительно показали, что дефицит CDNF в головном мозге может сопровождать развитие признаков БА.

Для крыс линии OXYS было показано, что уже в возрасте 3 месяцев наблюдаются накопление белка Аβ и Тау-белка, ухудшение долговременной потенциации, демиелинизация, потеря нейронов гиппокампа и, как результат, выраженные когнитивные нарушения [19]. В период ранней манифестации признаков БА показаны изменения и со стороны нейротрофических факторов. Известно, что в префронтальной коре на раннем этапе развития признаков БА у крыс OXYS нарушается соотношение экспрессии proBDNF/BDNF в направлении незрелой формы белка и снижение фосфорилирования TrkB рецептора, а на более позднем этапе – экспрессия BDNF снижается, но увеличивается как количество, так и частота колокализации proBDNF и p75NTR рецептора, что указывает на активацию процессов апоптоза [21, 22]. CDNF, в свою очередь, является модулятором путей апоптоза [31], и, как мы показали, его экспрессия существенно снижена начиная с возраста 3 месяцев, а низкий уровень белка наблюдается даже на 20 день постнатального развития. Таким образом, выявленные изменения в уровне белка и мРНК CDNF совпадают с началом манифестации признаков БА у крыс линии OXYS. Именно по этой причине мы решили начать компенсацию дефицита CDNF у трёхмесячных животных с возможностью наблюдения эффектов у старых крыс. Вместе с тем, поскольку CDNF является неклассическим нейротрофическим фактором и существует преимущественно как резидентный белок ЭПР, заманчиво предположить, что его дефицит в ранний период развития может быть одним из предикторов усиления клеточного стресса у крыс OXYS. Однако, данное предположение требует дальнейших исследований.

На сегодняшний день накоплено большое количество данных об участии UPR в патогенезе БА, предполагается, что ослабление адаптивного UPR приводит к пролонгированному стрессу ЭПР, что в свою очередь усиливает каскады, направленные на гибель клеток [32]. В частности, при мутациях в пресенилине 1(PS1), характерных для семейных случаев БА, подавлялось расщепление ATF6 [33]. Известно, что CDNF оказывает своё влияние преимущественно находясь в ЭПР через регуляцию UPR. При сверхэкспрессии CDNF также локализуется в ЭПР, что было подтверждено нашими результатами иммуногистохимического окрашивания и согласуется с данными литературы [34, 35]. Полученные нами данные демонстрируют, что сверхэкспрессия CDNF не оказала существенного влияния на экспрессию генов UPR: достоверное повышение отмечалось только для *Atf6*. Ранее нами было показано, что при сверхэкспрессии CDNF

в гиппокампе мышей с депрессивно-подобным поведением имеет место активация *Ire1-Xbp1*-пути – одного из каскадов UPR [34]. Наиболее вероятное объяснение отсутствию эффектов CDNF на экспрессию генов UPR в мозге крыс линии OXYS – временной разрыв между инъекцией вирусного конструкта в возрасте 3 месяцев и забором материала в 18 месяцев. Таким образом, ответ генов UPR мог быть скомпенсирован. Ранее для CDNF было показано уменьшение синаптотоксического действия, вызванного обработкой $\text{A}\beta$ нейронов гиппокампа, которое исследователи связывали с ослаблением амилоид-индуцированного стресса ЭПР [18]. В том числе, в вышеупомянутой работе отмечалось изменение экспрессии *Grp78*, чего в нашем эксперименте зафиксировано не было.

Сверхэкспрессия CDNF не оказала эффекта на процессы накопления $\text{A}\beta$ и Tau-белка. Эти данные согласуются с исследованием на мышах линии APP/PS1, также являющейся моделью БА, где было показано отсутствие эффекта на амилоидную нагрузку как от рекомбинантного CDNF, так и от AAV-CDNF [17]. Однако, стоит отметить, что в указанном исследовании CDNF экспрессировался под CMV промотором, т.е. во всех типах клеток, что могло значительно повлиять на результат поведенческих тестов. Однако нами недавно показано, что сверхэкспрессия CDNF в нейронах также улучшает динамику пространственного обучения на мышах с депрессивно-подобным поведением [34]. Таким образом, можно заключить, что эффекты CDNF могут зависеть как от клеточной локализации его экспрессии, так и от модели заболевания.

Прогнозировать эффект от сверхэкспрессированного CDNF достаточно сложно, однако возможно, что его позитивное влияние может быть интенсифицировано при условии секреции во внеклеточную среду.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе нами показан дефицит CDNF в гиппокампе крыс OXYS и предпринята попытка его компенсации. Сверхэкспрессия CDNF не улучшила пространственное обучение и память в возрасте прогрессии признаков БА. При этом не выявлено эффектов CDNF на процессы накопления $\text{A}\beta$ и Tau-белка, как и существенного влияния CDNF на экспрессию ключевых генов UPR: сверхэкспрессия CDNF увеличила только экспрессию *ATF6* – регулятора одного из путей UPR.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения

Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта: RFMEFI62119X0023).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011). Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the Eighth Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2020 National Academy of Sciences (USA)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Knopman D.S., Amieva H., Petersen R.C., Chételat G., Holtzman D.M., Hyman B.T. et al.* // *Nature Reviews Disease Primers.* 2021. V. 7. № 1. P. 33.
2. *Appel S.H.* // *Annals of Neurology*, John Wiley & Sons. 1981. V. 10. № 6. P. 499–505.
3. *J. Allen S., J. Watson J., Dawbarn D.* // *Curr Neuropharmacol.* 2011 V. 9. P. 559–73.
4. *Pentz R., Iulita M.F., Ducatenzeiler A., Bennett D.A., Cuello A.C.* // *Mol Psychiatry.* 2021. V. 26. № 10. P. 6023–37.
5. *Claudio Cuello A., Pentz R., Hall H.* // *Front Neurosci.* 2019. V. 13. № 2.
6. *Du Y., Wu H.T., Qin X.Y., Cao C., Liu Y., Cao Z.Z. et al.* // *Journal of Molecular Neuroscience.* 2018. V. 65. P. 289–300.
7. *Buchman A.S., Yu L., Boyle P.A., Schneider J.A., De Jager P.L., Bennett D.A.* // *Neurology.* 2016. V. 86. P. 735–41.
8. *Jiao F., Jiang D., Li Y., Mei J., Wang Q., Li X.* // *Cells.* 2022. V. 11. № 20. P. 0–16.
9. *Amadoro G., Latina V., Balzamino B.O., Squitti R., Varano M., Calissano P. et al.* // *Frontiers in Neuroscience.* 2021. V. 15. P. 1–17.
10. *Lennon M.J., Rigney G., Raymont V., Sachdev P.* // *Journal of Alzheimer's Disease.* 2021. V. 84. № 2. P. 491–504.
11. *Tuszynski M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., Sang U.H., Bakay R. et al.* // *Nat Med.* 2005. V. 11. № 5. P. 551–5.

12. Eriksdotter-Jönhagen M., Linderoth B., Lind G., Aladellie L., Almkvist O., Andreasen N. et al. // Dement Geriatr Cogn Disord. 2012. V. 33. № 1. P. 18–28.
13. Rafii M.S., Tuszynski M.H., Thomas R.G., Barba D., Brewer J.B., Rissman R.A. et al. // JAMA Neurol. 2018. V. 75. № 7. P. 834–41.
14. Pakarinen E., Lindholm P. // Front Psychiatry. 2023. V. 14.
15. Lõhelaid H., Saarma M., Airavaara M. // Pharmacol. Ther. 2024. V. 254. P. 108594.
16. Huttunen H.J., Saarma M. // Cell Transplantation. 2019. V. 28. № 4. P. 349–66.
17. Kemppainen S., Lindholm P., Galli E., Lahtinen H.-M.M., Koivisto H., Hämäläinen E. et al. // Behavioural Brain Research. 2015. V. 291. P. 1–11.
18. Zhou W., Chang L., Fang Y., Du Z., Li Y., Song Y. et al. // Neuroscience Letters. 2016. V. 633. P. 40–6.
19. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A. et al. // Cell Cycle. 2014. V. 13 № 6. P. 898–909.
20. Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А. // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 1427–43.
21. Рудницкая Е.А., Колосова Н.Г., Стефанова Н.А. // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 460–9.
22. Alsallum M., Kaminskaya Y.P., Tsybko A.S., Kolssova N.G., Naumenko V.S. // Advances in Gerontology. 2024. V. 13. № 2. P. 84–93.
23. Rao Y.L., Ganaraja B., Murlimanju B. V., Joy T., Krishnamurthy A., Agrawal A. // 3 Biotech. 2022. V. 12. № 2. P. 55.
24. Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt J.A. // Mol Ther. 2003. V. 7. № 6. P. 839–50.
25. Rodnyy A.Y., Kondaurova E.M., Bazovkina D. V., Kulikova E.A., Ilchibaeva T. V., Kovetskaya A.I. et al. // J. Neurosci. 2022. V.100. № 7. P. 1506–23.
26. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. // Journal of Neuroscience Methods. 2005. V. 141. № 1. P. 97–101.
27. Naumenko V.S., Kulikov A. V. // Molecular Biology. 2006. V. 40. № 1. P. 30–6.
28. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. // Journal of Neuroscience Methods. 2008. V. 170. № 2. P. 197–203.
29. Wegmann S., Biernat J., Mandelkow E. // Curr Opin Neurobiol. 2021. V. 69. P. 131–8.
30. Joshi H., Shah J., Abu-Hijleh F.A., Patel V., Rathbone M., Gabriele S. et al. // Alzheimer Dis Assoc Disord. 2022. V. 36. № 3. P. 269–71.
31. Eremin D.V., Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S. // Biochemistry Moscow. 2021. V. 86. № 7. P. 852–866.
32. Ajoolabady A., Lindholm D., Ren J., Pratico D. // Cell Death and Disease. 2022. V. 13. № 8. P. 1–15.
33. Katayama T., Imaizumi K., Honda A., Yoneda T., Kudo T., Takeda M. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2001. V. 276. № 46. P. 43446–43454.
34. Kaminskaya Y.P., Ilchibaeva T.V., Khotskin N.V., Naumenko V.S., Tsybko A.S. // Biochemistry Moscow. 2023. V. 88. № 8. P. 1070–91.
35. Eesmaa A., Yu L.-Y.Y., Göös H., Danilova T., Nöges K., Pakarinen E. et al. // International Journal of Molecular Sciences. 2022. V. 23. № 16. P. 9489.

The Development of Signs of Alzheimer's Disease in OXYS Rats is Accompanied by a Decrease in the Expression of Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF), and is not Compensated by Its Overexpression

Ya. P. Kaminskaya¹, T. V. Ilchibaeva¹, T. A. Kozlova¹, N. G. Kolosova¹, V. S. Naumenko¹, and A. S. Tsybko¹

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease leading to senile dementia. It is known that the processes of neurodegeneration are closely related to neurotrophic support. In this work, carried out on a model of AD - the OXYS line of rapidly aging rats, CDNF deficiency in the hippocampus was first identified, and an attempt was made to compensate for it by inducing overexpression using an adeno-associated viral construct. The constructs were introduced into the dorsal hippocampus of rats at the age of three months. 15 months after the introduction of the construct, we showed overexpression of CDNF in the target structure, but did not detect its effect on the learning and memory of animals in the Morris water maze, as well as on the accumulation of A β and Tau protein and the expression of genes involved in the unfolded protein response (UPR).

Keywords: neurotrophic factors, cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF), OXYS rats, Alzheimer's disease