

РЕПРЕССИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К ГЛУТАМАТУ  
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *Dffb* В МОЗГЕ КРЫС  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2012 г. В. В. Колобов<sup>1\*</sup>, Т. В. Давыдова<sup>2</sup>, И. А. Захарова<sup>2</sup>, В. Ю. Горбатов<sup>2</sup>, В. Г. Фомина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, Москва 125367

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии  
Российской академии медицинских наук, Москва 125315

Поступила в редакцию 13.11.2011 г.

Принята к печати 10.02.2012 г.

На экспериментальной модели болезни Альцгеймера у крыс, которая развивается при введении нейротоксического фрагмента  $\beta$ -амилоидного белка  $A\beta_{25-35}$  в базальные ганглии Мейнерта, исследовано влияние антител к глутамату (в дозе 300 мкг/кг через час после повреждения, введенных интраназально) на уровень экспрессии мРНК гена *Dffb*, кодирующего каспазоактивируемую ДНКазу, которая участвует во внутринуклеосомной фрагментации геномной ДНК при апоптозе. На третьи сутки после введения  $A\beta_{25-35}$  происходит достоверное снижение уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* в префронтальной коре (на 37%) и в гиппокампе (на 62%) в группе экспериментальных животных по сравнению с интактным контролем. В гипоталамусе таких отличий при сравнении опытных и контрольных животных не обнаружено. По-видимому, репрессивное действие антител к глутамату на экспрессию мРНК гена *Dffb* отражает стабилизацию протекающих в клетках мозга процессов при экспериментальной болезни Альцгеймера, при этом снижается интенсивность апоптотической гибели нейронов и глии.

**Ключевые слова:** уровень экспрессии, *Dffb*, антитела к глутамату, экспериментальная болезнь Альцгеймера, префронтальная кора, гиппокамп, гипоталамус, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

REPRESSIONAL EFFECTS OF THE GLUTAMATE ANTIBODIES ON EXPRESSION OF *Dffb* GENE IN THE BRAIN OF RATS WITH EXPERIMENTAL ALZHEIMER'S DISEASE, by V. V. Kolobov<sup>1\*</sup>, T. V. Davydova<sup>2</sup>, I. A. Zakharova<sup>2</sup>, V. Yu. Gorbatov<sup>2</sup>, V. G. Fomina<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125367 Russia, \*e-mail: f.neurochemistry@gmail.com; <sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia). The intranasal administration of glutamate antibodies in the dose of 300  $\mu$ g/kg one hour after damage on the level of mRNA expression of *Dffb* gene which codes caspase-activated DNase which participates in intranucleosome fragmentation of genome DNA in apoptosis was investigated in experimental Alzheimer's disease induced by injection of neurotoxic fragment of  $\beta$ -amyloid protein  $A\beta_{25-35}$  in Meynert basal magnocellular nuclei on rats. On the Day 3 after  $A\beta_{25-35}$  injection is observed significant decrease of the level of mRNA expression of *Dffb* gene in prefrontal cortex in 37%, and in hippocampus in 62% in the experiment group versus the control group. These differences were not found in the hypothalamus when comparing the experimental and control animals. It was suggested that repressive effect of glutamate antibodies on the level of mRNA expression of *Dffb* gene reflects stabilization of processes taking place in brain cells in experimental Alzheimer's disease, and in its turn the intensiveness of nerve and glial cells apoptotic death is decreased.

**Keywords:** expression levels, *Dffb*, glutamate antibodies, experimental Alzheimer's disease, prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus, real-time polymerase chain reaction.

Болезнь Альцгеймера (БА) — хроническое, медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание людей пожилого и старческого

возраста, которое приводит к развитию слабоумия, — в настоящее время широко распространено в экономически развитых странах. Нейробиологические и патофизиологические механизмы развития БА связывают с некоторыми мутациями в определенных генах [1, 2], а также с отложением фибриллярного  $\beta$ -амилоидного белка в виде сенильных бляшек, с перерождением нейрофиб-

Принятые сокращения: АТ-Глу — антитела к глутамату; БА — болезнь Альцгеймера; БСА — бычий сывороточный альбумин; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

\* Эл. почта: f.neurochemistry@gmail.com

рилл, образованием нейрофибрилярных клубков и развитием оксидативного стресса, что ведет к нарушению холинергической нейротрансмиссии и связанного с этим когнитивного дефицита [3]. Однако в последнее время получены убедительные доказательства, свидетельствующие о вовлечении в нейродегенеративный процесс, лежащий в основе БА, не только холинергической системы, но и глутаматергической [4, 5]. Нейротоксическое действие  $\beta$ -амилоида и его фрагментов реализуется и через усиление эксайтотоксических свойств глутамата [6]. Под эксайтотоксичностью понимают чрезмерную активацию ионотропных глутаматных рецепторов (преимущественно глутаматом, N-метил-D-аспартатом и 2-амино-3-(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)-пропионатом), что оказывает нейротоксическое действие, обуславливая — вследствие длительного притока кальция — гибель кортикальных и субкортикальных нейронов. Это ведет к усилению перекисного окисления липидов и последующему развитию окислительного стресса и апоптоза. Ряд авторов отмечают совместную локализацию глутаматергических нейронов и патологических изменений, обнаруживаемых при посмертном исследовании головного мозга больных БА [7].

Одной из экспериментальных моделей, наиболее близкой по механизмам развития заболевания и достаточно полно воспроизводящей симптомы нарушения памяти при БА, служит модель, в которой крысам вводится нейротоксический ундекапептид  $A\beta_{25-35}$  в базальные ганглии и кортикальные ядра Мейнерта [8, 9]. В этом случае развиваются обширные дегенеративные изменения нейронов во фронтальной коре и гиппокампе, что проявляется в особых формах когнитивных нарушений [9]. Введение фрагментов  $A\beta_{25-35}$  приводит к токсическим последствиям: нарушается пространственная память [10] и способности к обучению (уменьшается степень запоминания при выполнении условного рефлекса пассивного избегания), а также отмечается снижение горизонтальной двигательной активности [11]. Патоморфологические исследования подтвердили развитие морфологических признаков БА при использовании  $A\beta_{25-35}$ . Так, на фронтальных гистологических срезах мозга крыс обнаружено большое число хроматофильных и ацидофильных нейронов в неокортексе, гиппокампе, коре и базальных ядрах переднего мозга, а также значительное снижение числа нейронов и возрастание числа поврежденных нейронов в коре и гиппокампе [10, 12].

В последние годы установлено, что при БА образуются аутоантитела к глутамату и изучены особенности их образования у больных с разными ее формами [13, 14]. Интраназальное введение антител к глутамату (АТ-Глу) улучшает процессы памяти у животных с экспериментальной БА, вы-

званной введением нейротоксического фрагмента  $A\beta_{25-35}$  в базальные ядра Мейнерта [11]. Однако механизмы защитного антиамнестического эффекта АТ-Глу при экспериментальной БА не ясны. На модели ишемического повреждения префронтальной коры головного мозга показано, что при введении АТ-Глу снижается содержание глутамата в префронтальной коре и гиппокампе [15]. Нами показано, что активность каспазы-3 в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга у крыс с экспериментальной БА снижается при введении АТ-Глу [16]. В связи с этим интересно изучить влияние АТ-Глу на процессы апоптоза при БА.

Один из основных биохимических маркеров апоптоза — явление фрагментации геномной ДНК [17]. Активный ДНК-фрагментирующий фактор (субъединица В) вызывает внутринуклеосомную фрагментацию ДНК [18–21]. Инактивированный ДНК-фрагментирующий фактор состоит из двух субъединиц, А и В. При участии каспазы-3  $\beta$ -полипептид ДНК-фрагментирующего фактора (субъединица В) выходит из его гетеродимерного комплекса с ингибитором (субъединица А) путем отщепления последнего от указанной эндонуклеазы, поскольку имеет два сайта, узнающих каспазу-3 [20, 22–24]. Тем не менее, до сих пор работы по изучению экспрессии *Dffb* как в норме, так и при патологических состояниях крайне мало: остается открытым вопрос о механизмах регуляции транскрипции гена *Dffb*, о его эпигенетических особенностях и посттрансляционных модификациях.

Для внутринуклеосомной фрагментации при апоптозе  $\beta$ -полипептид ДНК-фрагментирующего фактора должен быть перемещен из цитоплазмы клетки в ядро. Именно это и было ранее показано на экспериментальной модели травмы головного мозга [25]. На С-конце  $\beta$ -полипептида ДНК-фрагментирующего фактора обнаружена типичная последовательность, свидетельствующая о его ядерной локализации [19]. Как показано *in vitro*, белковый продукт гена *Dffb* может взаимодействовать с хроматином как через хроматиновые белки (гистоновый белок H1 и HMGb1), так и напрямую с ДНК [26].

Цель нашего исследования — определить влияние АТ-Глу на уровень экспрессии гена *Dffb* в префронтальной коре, гипоталамусе и гиппокампе взрослых крыс при экспериментальной БА.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Опыты ставили на 35 крысах-самцах линии Вистар (280–300 г), выращенных в виварии НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН. Животных содержали в стандартных условиях при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. При работе с крысами соблю-**

дались требования, сформулированные в Директивах совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС о правилах использования животных в экспериментальных исследованиях.

Крыс разделяли на 7 групп (по 5 в каждой): 1-я – ложнооперированные; 2-я – крысы с двусторонним введением нейротоксического фрагмента  $\beta$ -амилоидного белка  $A\beta_{25-35}$ , которым через 1 ч после операции вводили интраназально по 10 мкл дистиллированной воды ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ); 3-я – животные, которым по той же схеме интраназально вводили водный раствор АТ-Глу от иммунизированных кроликов в дозе 300 мкг/кг ( $A\beta_{25-35} + АТ-Глу$ ); 4-я – животные, которым по той же схеме интраназально вводили водный раствор кроличьего  $\gamma$ -глобулина от интактных кроликов в дозе 300 мкг/кг ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин); 5-я – интактные животные; 6-я – интактные животные, которым в 1-е сутки эксперимента интраназально вводили 10 мкл дистиллированной воды; 7-я – интактные животные, которым в 1 сут эксперимента интраназально вводили водный раствор АТ-Глу (300 мкг/кг) от иммунизированных кроликов.

Антитела к глутамату входят в состав  $\gamma$ -глобулиновой фракции из сыворотки кроликов, иммунизированных конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином (глутамат-БСА). В качестве контроля использовали интактных крыс и крыс, которым вводили  $\gamma$ -глобулиновую фракцию неиммунизированного кролика.

**Конъюгат глутамат-БСА получали модифицированным методом** с помощью бифункционального реагента глутаральдегида [27]. Титр АТ-Глу, определяемый методом иммуноферментного анализа, составил 1 : 1000.  $\gamma$ -Глобулиновые фракции из сывороток иммунизированных и интактных кроликов выделяли методом осаждения сульфатом аммония. АТ-Глу очищали от бычьего сывороточного альбумина методом аффинной хроматографии. Полученные препараты лиофилизировали и хранили при 4°C. Для интраназального введения животным готовили водный раствор АТ-Глу непосредственно перед началом опыта.

**Двустороннее введение в базальные ганглии Мейнерта нейротоксического фрагмента  $\beta$ -амилоидного белка  $A\beta_{25-35}$**  (“Sigma-Aldrich”, США) в объеме 2 мкл  $0.4 \times 10^{-9}$  М раствора осуществляли на стандартной стереотаксической установке для крыс, в качестве наркоза применяли хлоралгидрат в дозировке 300 мг/кг, внутривенно. Ложнооперированному животному в том же объеме вводили физиологический раствор. Раствор  $A\beta_{25-35}$  в мозг вводили с помощью канюли и шприца Гамильтона [28]. Координаты ядра Мейнерта (АР, -1.4; ОЛ, 2.7; Н, 8.7) для проведения операции определяли по атласу [29].

**Образцы префронтальной коры, гипоталамуса и гиппокампа извлекали** на холоде (4°C) на третьи сутки после введения  $A\beta_{25-35}$ , структуры помещали в жидкий азот и хранили при -80°C до гомогенизации. Тотальную фракцию РНК выделяли с помощью раствора TRIzol (“Invitrogen”, США) в соответствии с протоколом производителя и с использованием гомогенизатора (Heidolph D1AX 100, Германия) в режиме 5000 об/мин в течение 15 с.

**Полученные препараты РНК очищали** от примесей геномной ДНК, обрабатывая ДНКазой I (RQ1 RNase-Free DNase, “Promega”, США) в течение 30 мин при 37°C в реакционном буфере (40 мМ буфер Трис-НСl, рН 8.0, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>), а затем добавляли стоп-раствор (2 мМ этиленгликоль-тетрауксусная кислота, рН 8.0) и прогревали 10 мин при 65°C.

Концентрацию РНК определяли на флуориметре Qubit с использованием набора Qubit RNA Assay Kit (“Invitrogen”) согласно рекомендациям производителя.

**Матрицу для обратной транскрипции готовили**, инкубируя 0.05 мкг тотальной РНК с олиго-(dT)<sub>15</sub> (10 мкМ) и 0.5 ед. ингибитора РНКазы (RNasin, “Promega”) в течение 2 мин при 70°C, после чего сразу помещали на лед. Обратную транскрипцию проводили в объеме 30 мкл в среде, содержащей 10 мМ буфер Трис-НСl, рН 8.3, 25 мМ KCl, 0.6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреитол, с добавлением 200 ед. ревертазы М-MLV (“Promega”) и 4 мкл dNTP (10 мМ) и с последующей инкубацией в течение 1 ч 45 мин при 37°C. Фермент затем инактивировали нагреванием до 95°C в течение 5 мин. кДНК разводили деионизированной водой в 10 раз и хранили при -80°C. Для отрицательного контроля вместо РНК использовали деионизированную воду.

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили** на амплификаторе “ДТ-322” (“ДНК-Технология”, Россия) в объеме 25 мкл с использованием 1 мкл разведенной кДНК, прямого и обратного праймеров в концентрации 0.2 мкМ и готовой смеси qPCR-mix-HS SYBR (“Евроген”, Россия), однократный состав которой включает интеркалирующий краситель SYBR Green I, Taq-полимеразу с “горячим” стартом, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0.2 мМ каждого dNTP. Праймеры, фланкирующие соседние экзоны, подобраны с помощью программы “Primer3” [<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>] и приведены в табл. 1. Программа амплификации: 94°C – 1.5 мин, 50 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров (температура указана в табл. 1) – 15 с, элонгация при 72°C – 30 с. Отрицательные контроли – деионизированная вода и отрицательный контроль обратной транскрипции вместо кДНК. Амплификации в отрицательных контролях не

**Таблица 1.** Праймеры, используемые в работе

Обозначение гена, номер в GenBank	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига праймеров	Локализация праймера	Длина продукта, п.н.
<i>Dffb</i> , NM_053362	Dffb F	5'-GTT-GTA-TCC-GCT-TCC-AGC-TC-3'	58°C	Экзон 1/2	309
	Dffb R	5'-CCC-GGG-TCT-CTG-CAG-TAA-TA-3'		Экзон 3	
<i>Actb</i> , NM_031144	Actb F	5'-GAA-GAT-CCT-GAC-CGA-GCG-TG-3'	60°C	Экзон 3	327
	Actb R	5'-AGC-ACT-GTG-TTG-GCA-TAG-AG-3'		Экзон 4	

наблюдала. Специфичность ПЦР-продуктов подтверждали, проводя электрофорез в 1.5%-ном агарозном геле, окрашенном бромидом этидия, по наличию полосы только ожидаемой длины. Маркер длин фрагментов – GeneRuler 50 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

В качестве референс-гена использовали ген  $\beta$ -актина. Уровень экспрессии его мРНК оставался постоянным во всех группах, что свидетельствует о корректности проведенных затем расчетов относительного уровня экспрессии мРНК гена  $\beta$ -полипептида ДНК-фрагментирующего фактора по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [30].

Проводили ПЦР в реальном времени каждого образца в двух повторах, среднее значение их пороговых циклов использовали для расчета относительного уровня экспрессии и непараметрической статистики с помощью программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, США). Использовали Н-критерий Крускала-Уоллиса для определения различий в уровнях экспрессии разных экспериментальных групп в пределах одной структуры головного мозга; далее рассчитывали U-критерий Манна-Уитни для обнаружения отличий в группах по сравнению с контролем и по сравнению с группой животных, получавшей АТ-Глу (достоверными считали отличия при  $p < 0.01$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уровень экспрессии гена *Dffb* сравнивали в шести экспериментальных группах и в группе интактного контроля (манипуляции в которой не проводили) в различных структурах мозга, имеющих афферентные и эфферентные связи между собой, а именно в префронтальной коре, гипоталамусе и гиппокампе.

В образцах префронтальной коры значения относительного уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* в группе ложнооперированного контроля, группе с введением раствора  $A\beta_{25-35}$  и группе с введением ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулина) приблизительно оставались на уровне интактных животных, принятом за единицу (медианы в группах равны 1.06, 1.02 и 0.92 соответственно). Однако стоит

отметить, что в группе крыс, которым вводили  $A\beta_{25-35}$ , в 20% случаев наблюдалась активация гена *Dffb*, что свидетельствует об активации апоптоза в коре, спровоцированной нейротоксическим фрагментом  $\beta$ -амилоидного белка  $A\beta_{25-35}$ .

В образцах гиппокампа значения относительного уровня экспрессии гена *Dffb* достоверно не различались в группе ложнооперированного контроля, в группе с введением раствора  $A\beta_{25-35}$  и группе с введением ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулина) – по сравнению с интактным контролем (медианы в группах соответственно равны 1.25, 1.05 и 0.91).

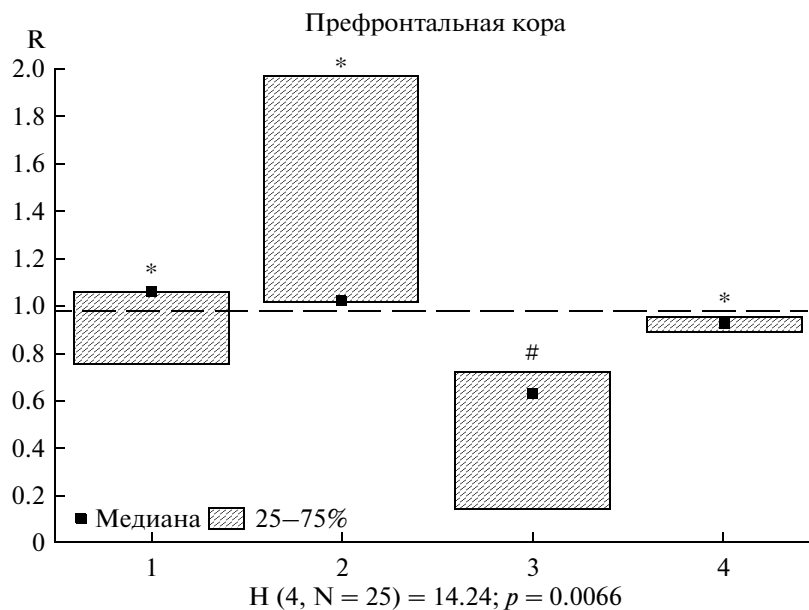
На третьи сутки после введения в базальные гигантоклеточные ядра Мейнерта нейротоксического фрагмента  $\beta$ -амилоидного белка  $A\beta_{25-35}$  в образцах префронтальной коры и гиппокампа у крыс, которым через час после операции интраназально вводили АТ-Глу, зафиксировано существенное понижение уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* (на 37 и 62% по сравнению с уровнем у интактных животных соответственно), что показано на рис. 1 и 2. Отметим также, что наблюдаемое снижение экспрессии мРНК гена *Dffb* в префронтальной коре и гиппокампе в группе ( $A\beta_{25-35} + АТ-Глу$ ) достоверно по отношению не только к интактному контролю, но и к остальным трем группам животных ( $p < 0.01$ ).

В гипоталамусе существенных изменений относительного уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* в группах не отмечено (рис. 3).

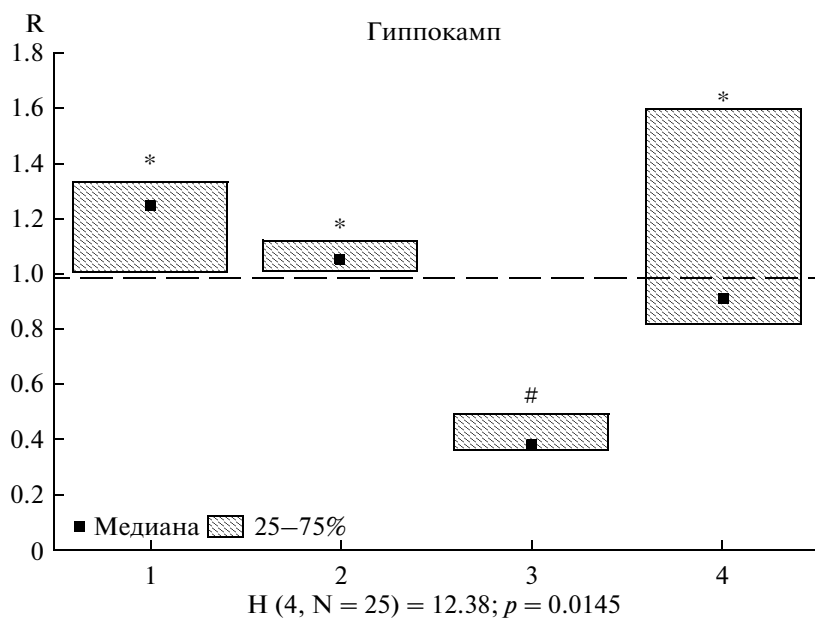
Интраназальное введение  $\gamma$ -глобулина крысам через час после введения  $A\beta_{25-35}$  не влияет на экспрессию мРНК *Dffb* у крыс, что свидетельствует о специфичности обнаруженных эффектов АТ-Глу. В группах интактных крыс, интраназально получавших воду или водный раствор АТ-Глу, изменений в относительном уровне экспрессии мРНК гена *Dffb* в исследуемых структурах мозга крыс на третьи сутки не обнаружено (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Антитела к нейромедиаторам в настоящее время становятся объектом исследований при изуче-



**Рис. 1.** Относительные уровни экспрессии гена *Dffb* в префронтальной коре крыс (медиана  $\pm$  25–75% квантили). По оси абсцисс обозначены группы крыс: 1 – группа ложнооперированных крыс; 2 – группа ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ); 3 – группа ( $A\beta_{25-35} + AT-Glu$ ); 4 – группа ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин). Под осью абсцисс представлены значения *H*-критерия Крускала-Уоллиса для каждой из структур мозга с указанием вероятности ошибки. По оси ординат – относительный уровень экспрессии гена *Dffb*. За единицу принят уровень экспрессии этого гена в контрольной группе интактных крыс (пунктирная линия). Указаны уровни достоверности различий: # –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем, \* –  $p < 0.01$  по сравнению с группой ( $A\beta_{25-35} + AT-Glu$ ).



**Рис. 2.** Относительные уровни экспрессии гена *Dffb* в гиппокампе крыс. Примечание и обозначения как на рис. 1.

нии проблемы нарушения регуляции нейроиммунных взаимодействий [31], составляющих основу различных нейропсихических нарушений при таких патологических процессах, как БА,

ишемические повреждения головного мозга, психоэмоциональный стресс. Особое значение в этих процессах приобретает роль глутамата, исследуемая с помощью антител к нему.

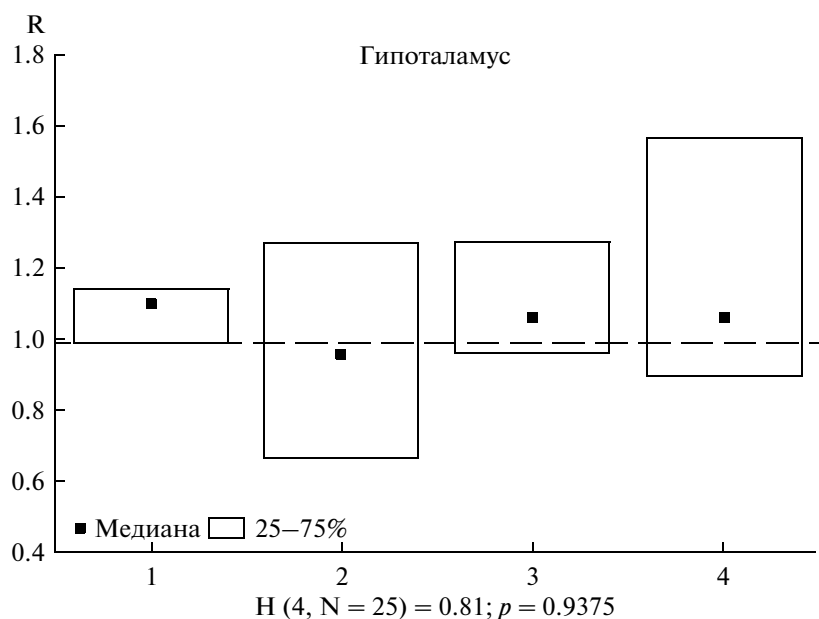


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии гена *Dffb* в гипоталамусе крыс. Примечание и обозначения как на рис. 1.

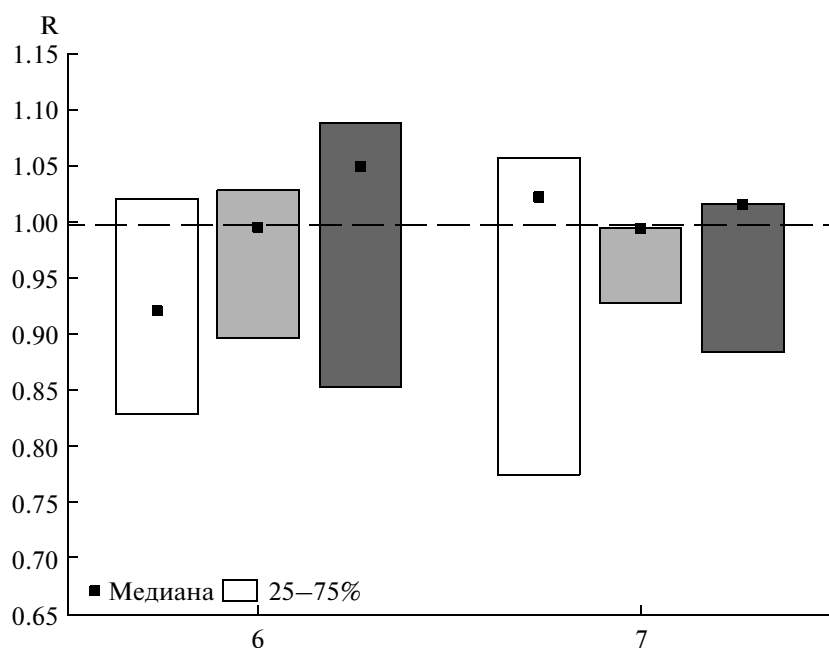


Рис. 4. Относительные уровни экспрессии гена *Dffb* в группах интактного контроля (медиана  $\pm$  25–75% квантили). По оси абсцисс обозначены группы крыс: 6 – группа крыс (И + H<sub>2</sub>O); 7 – группа (И + АТ-Глу). За единицу принят уровень экспрессии гена *Dffb* в контрольной группе интактных крыс (пунктирная линия). По оси ординат представлены относительные уровни экспрессии гена *Dffb* в префронтальной коре (белый бокс), гипоталамусе (светло-серый бокс) и гиппокампе (темно-серый бокс).

Основной симптоматический комплекс, развивающейся при БА, характеризуется когнитивными нарушениями, в частности, — памяти. Функциональной основой нейронных ансамблей

гиппокампа в обеспечении когнитивных функций является глутаматергическая нейромедиация [32], дисбаланс которой приводит к развитию каскада эксайтотоксичности, в ходе чего наблю-

**Таблица 2.** Функциональные категории гена *Dffb* у крысы *Rattus norvegicus*

Категории GO	Общее число вовлеченных генов
GO:0006915, апоптоз	1497
GO:0030263, конденсация хроматина при апоптозе	5
GO:0006309, фрагментация ДНК при апоптотических изменениях в ядре	21
GO:006917, индукция апоптоза	325
GO:0004536, дезоксирибонуклеазная активность	37
GO:0003677, ДНК-связывание	2437
GO:0019899, связывание ферментов	1276
GO:0016787, гидролазная активность	3565
GO:0004516, никотин-фосфорибозилтрансферазная активность	4
GO:0005515, связывание белков	5832

дается гибель нейронов и уменьшение размеров гиппокампа при БА [33, 34]. По-видимому, полученные нами данные о том, что именно в гиппокампе АТ-Глу вызывают наибольшее снижение относительного уровня экспрессии гена *Dffb*, подтверждают ведущую роль гиппокампа при развитии БА.

Выявленные в ходе опыта изменения экспрессии мРНК гена *Dffb* в образцах префронтальной коры и гиппокампа животных, получавших АТ-Глу на фоне введения А $\beta_{25-35}$ , согласуются с литературными данными, в которых основные маркеры БА обнаруживаются именно в этих структурах. Так, сенильные бляшки, образующиеся близ дегенерирующих аксонов и дендритов, выявляются преимущественно в коре, фронтальных областях неокортекса и особенно в гиппокампе, а другой общеизвестный маркер БА — нейрофибрилярные сплетения — образуется в результате цитоплазматического поражения преимущественно пирамидных клеток гиппокампа и фронтальной области коры [35, 36]. Известно также, что распространенные дегенеративные изменения при введении А $\beta_{25-35}$  в ядра Мейнерта затрагивают нейроны фронтальной коры и гиппокампа и проявляются в нарушениях памяти у животных [28, 37]. Необходимо отметить и тот факт, что гиппокамп имеет прямую эфферентную связь с префронтальной корой [38, 39], нарушение которой сопровождается снижением памяти [40].

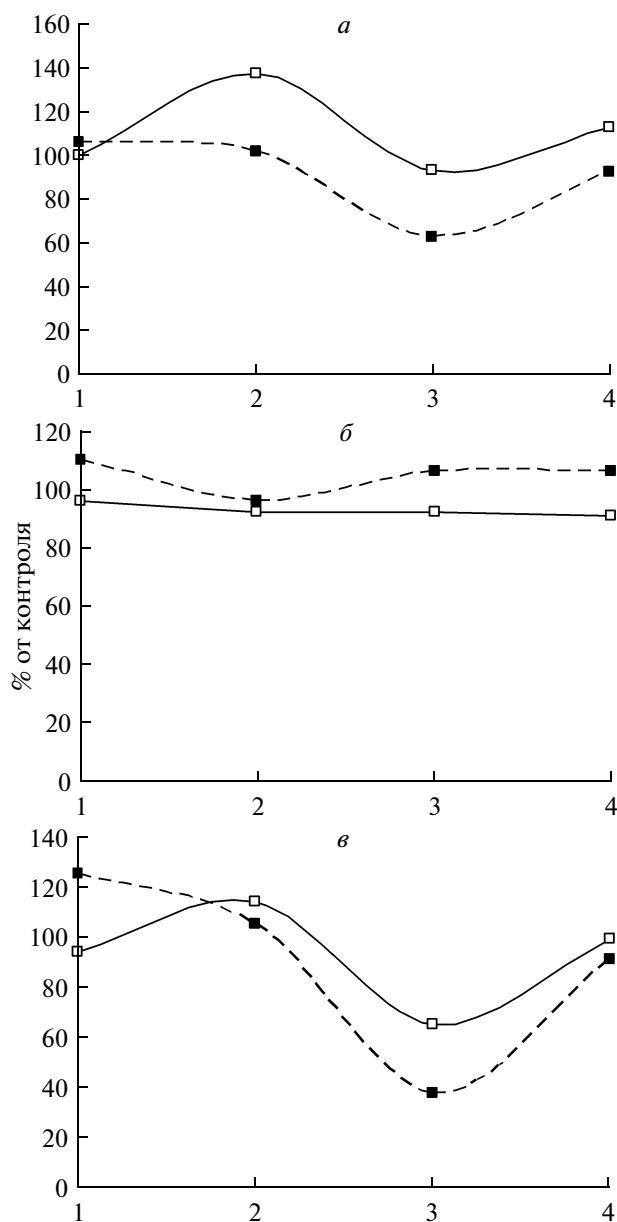
Интраназальное введение АТ-Глу в дозе 300 мкг/кг intactным крысам не вызывает изменений относительного уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* в исследуемых структурах мозга крыс по сравнению с intactными животными (рис. 4). Ранее также показано, что интраназальное введение АТ-Глу в той же дозе не влияет на выработку условного рефлекса пассивного избегания у intactных крыс [11].

В эксперименте не обнаружено сколько-нибудь значительной индукции экспрессии мРНК гена *Dffb* в исследуемых структурах мозга крыс при введении А $\beta_{25-35}$ , что, вероятно, можно объяснить тем, что наблюдения проводились на ранних сроках — через 3 сут, в течение которого весь каскад нейробиохимических событий при БА не успевает еще развернуться полностью.

В последнее время, благодаря информации из базы данных “Rat Genome Databases (RGD)” [http://www.rgd.mcg.edu], появились сведения о вовлечении не менее 104 генов в развитие БА у крыс. Спектр функционального влияния, с которым ассоциирован ген *Dffb*, позволяет предположить, что он является одним из важных участников гибели нейронов путем апоптоза. Из табл. 2, составленной на основе базы данных “Gene Ontology (GO)” [http://www.geneontology.org] и обозначающей процессы, в которых участвует  $\beta$ -полипептид ДНК-фрагментирующего фактора, видно, что ведущее место отведено апоптозу.

К завершению трех суток опыта изменения относительного уровня экспрессии мРНК гена *Dffb* в префронтальной коре, гипоталамусе и гиппокампе сходны с изменениями ферментативной активности ключевой эффекторной каспазы апоптоза — каспазы-3 [16]. Параллельное увеличение активности каспазы-3 и экспрессии гена, кодирующего  $\beta$ -полипептид ДНК-фрагментирующего фактора, наблюдаемое в префронтальной коре и гиппокампе в группе крыс с введением А $\beta_{25-35}$ , вероятно, является отражением развития апоптотических явлений в тканях мозга. Интраназальное введение АТ-Глу способствует снижению негативных последствий от введения нейротоксического фрагмента А $\beta_{25-35}$ , снижая и активность каспазы-3, и относительный уровень мРНК *Dffb* (рис. 5).

Обнаруженные нами изменения в уровне экспрессии мРНК гена *Dffb* в префронтальной коре и



**Рис. 5.** Изменение активности каспазы-3 и относительной экспрессии гена *Dffб* в структурах мозга крыс. По оси абсцисс обозначены группы крыс: 1 – группа ложнооперированных; 2 – группа ( $A\beta_{25-35} + H_2O$ ); 3 – группа ( $A\beta_{25-35} + AT-Глу$ ); 4 – группа ( $A\beta_{25-35} + \gamma$ -глобулин). По оси ординат представлены значения активности каспазы-3 (сплошная линия) и относительного уровня экспрессии гена *Dffб* (пунктирная линия), выраженные в % от величин активности и экспрессии в интактных крысах, в префронтальной коре (а), гипоталамусе (б) и гиппокампе (в).

гиппокампе, по-видимому, свидетельствуют об избирательном репрессирующем влиянии АТ-Глу на транскрипцию гена *Dffб*. На данный момент трудно ответить, на каком этапе молекулярных событий от гена к функционально активному ДНК-фрагментирующему фактору происходит

регуляция АТ-Глу транскрипционной активности гена *Dffб*.

Полученные результаты, по-видимому, свидетельствуют о защитном эффекте АТ-Глу в генной регуляции одного из ключевых участников внутриядерной фрагментации ДНК –  $\beta$ -полипептида ДНК-фрагментирующего фактора – уже на раннем этапе БА. Протективный эффект АТ-Глу, вероятно, можно напрямую связать и с их способностью нейтрализовывать избыточное количество глутамата, который триггерно воздействует на нейроны и глию в направлении апоптоза. Вследствие этого активность гена *Dffб* снижается, так как необходимость в его продукте, фрагментирующем ДНК, отсутствует. Для понимания молекулярных механизмов действия АТ-Глу требуются дальнейшие исследования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григоренко А.П., Рогаев Е.И. 2007. Молекулярные основы болезни Альцгеймера. *Молекуляр. биология.* **41**, 331–345.
2. Рогаев Е.И. 1999. Генетические факторы и полигенная модель болезней Альцгеймера. *Генетика.* **35**, 1588–1571.
3. Ingelsson M., Nyman B.T. 2007. The molecular basis of Alzheimer's disease. In: *Molecular neurology.* Ed. Waxman S.G. Elsevier Academic Press, pp. 241–256.
4. Francis P.T. 2003. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **18** (Suppl.), 15–21.
5. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **45**, 583–595.
6. Harkany T., Abrahám I., Timmerman W., Laskay G., Tóth B., Sasvári M., Kónya C., Sebens J.B., Korf J., Nyakas C., Zarándi M., Soós K., Penke B., Luiten P.G. 2000. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2735–2745.
7. Braak H., Braak E. 1994. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol. Aging.* **15**, 355–380.
8. van Hoesen G.W. 1998. Cortical feedforward and cortical feedback neural systems in Alzheimer's disease. In: *Connections, Cognition and Alzheimer's Disease. Research and Perspectives in Alzheimer's disease.* Eds Hyman B.T., Duyckaerts C., Christen Y. Springer-Verlag, Berlin: Springer-Verlag, pp. 17–31.
9. Островская Р.У., Бельник А.П., Сторожева З.И. 2008. Эффективность препарата “Ноопепт” при экспериментальной модели болезни Альцгеймера (когнитивный дефицит, вызванный введением  $\beta$ -амилоида $_{25-35}$  в базальные ядра Мейнерта крыс). *Бюл. экпер. биол.* **146**, 84–88.
10. Stepanichev M.Yu., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Onufriev M.V., Gulyaeva N.V. 2004. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol. Behav.* **80**, 647–655.



11. Горбатов В.Ю., Трекова Н.А., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. 2010. Антиамнестическое действие антител к глутамату при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Бюл. exper. биол.* **150**, 28–30.
12. Степаничев М.Ю., Здобнова И.М., Зарубенко И.И., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. 2004. Исследование эффектов центрального введения  $\beta$ -амилоидного пептида (25–35): патоморфологические изменения в гиппокампе и нарушение пространственной памяти. *Журн. высш. нерв. деят.-сти.* **54**, 705–711.
13. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Горбатов В.Ю., Фомина В.Г., Доронина О.А., Максунова И.В. 2009. Особенности образования аутоантител к глутамату при деменциях альцгеймеровского типа. *Бюл. exper. биол.* **147**, 385–387.
14. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Фомина В.Г., Ветрилэ Л.А., Доронина О.А. 2007. Индукция аутоантител к глутамату у больных Альцгеймера. *Бюл. exper. биол.* **143**, 140–141.
15. Romanova G., Davydova T., Shakova F., Kvashennikova Y.N. 2011. The effect of glutamate antibodies on the memory of rats with experimental ischemic damage to the prefrontal cortex. *J. Eur. Neuropsychopharmacol.* **21** (Suppl. 2), S117.
16. Колобов В.В., Захарова И.А., Фомина В.Г., Горбатов В.Ю., Давыдова Т.В. 2012. Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Бюл. exper. биол.* В печати.
17. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **1990**, **136**, 593–608.
18. Batistatou A., Greene L.A. 1993. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J. Cell Biol.* **122**, 523–532.
19. Cao G., Pei W., Lan J., Stetler R.A., Luo Y., Nagayama T., Graham S.H., Yin X.-M., Simon R.P., Chen J. 2001. Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J. Neurosci.* **21**, 4678–4690.
20. Liu X., Zou H., Slaughter C., Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* **89**, 175–184.
21. Widłak P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochemica Polonica.* **47**, 1037–1044.
22. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* **391**, 43–50.
23. Inohara N., Koseki T., Chen S., Benedict M.A., Núñez G. 1999. Identification of regulatory and catalytic domains in the apoptosis nuclease DFF40/CAD. *J. Biol. Chem.* **274**, 270–274.
24. Liu X., Li P., Widłak P., Zou H., Luo X., Garrard W.T., Wang X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 8461–8466.
25. Zhang C., Raghupathi R., Saatman K.E., LaPlaca M.C., McIntosh T.K. 1999. Regional and temporal alterations in DNA fragmentation factor (DFF)-like proteins following experimental brain trauma in the rat. *J. Neurochem.* **73**, 1650–1659.
26. Korn C., Scholz S.R., Gimadutdinow O., Lurz R., Pingoud A., Meiss G. 2005. Interaction of DNA fragmentation factor (DFF) with DNA reveals an unprecedented mechanism for nuclease inhibition and suggests that DFF can be activated in a DNA-bound state. *J. Biol. Chem.* **280**, 6005–6015.
27. Seguela P., Geffard M., Buijs R.M., Le Moal M. 1984. Antibodies against  $\gamma$ -aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 3888–3892.
28. Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P., Soós K., Törő I., Penke B., Luiten P.G., Nyakas C., Gulya K., Leonard B.E. 1998. Beta-amyloid(Phe(SO<sub>3</sub>H)<sub>24</sub>)<sub>25-35</sub> in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav. Brain. Res.* **90**, 133–145.
29. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2007. Eds Paxinos G., Watson C. Elsevier Academic Press.
30. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methods. *Methods.* **25**, 402–408.
31. Евсеев В.А. 2007. *Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии.* М.: Издательство РАМН.
32. Freund T.F., Buzsaki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* **6**, 347–470.
33. Apostolova L.G., Dutton R.A., Dinov I.D., Hayashi K.M., Toga A.W., Cummings J.L., Thompson P.M. 2006. Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch. Neurol.* **63**, 693–699.
34. Jack C.R. Jr., Petersen R.C., Xu Y., O'Brien P.C., Smith G.E., Ivnik R.J., Boeve B.F., Tangalos E.G., Kokmen E. 2000. Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. *Neurology.* **22**, 484–489.
35. Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. 2000. *Введение в нейрогенетику.* М.: Наука.
36. Huang S.M., Mouri A., Kokubo H., et al. 2006. Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J. Biol. Chem.* **281**, 17941–17951.
37. Giovannelli L., Casamenti F., Scali C., Bartolini L., Pepeu G. 1995. Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience.* **66**, 781–792.
38. Goldman-Rakic P.S., Selemon L.D., Schwartz M.L. 1984. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neurosci.* **12**, 719–743.
39. Lee I., Kesner R.P. 2003. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J. Neurosci.* **23**, 1517–1523.
40. Weiss A.P., Zalesak M., DeWitt I., Goff D., Kunkel L., Heckers S. 2004. Impaired hippocampal function during the detection of novel words in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* **55**, 668–675.