

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ MEK1/2–ERK1/2-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В СЕТЧАТКЕ КРЫС С ВОЗРАСТОМ И ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

© 2023 Н.А. Муралёва*, Н.Г. Колосова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН),
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: myraleva@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.12.2022

После доработки 09.01.2023

Принята к публикации 09.01.2023

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – сложное нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной необратимого нарушения зрения в развитых странах. Возраст является основным фактором риска ВМД, молекулярные механизмы развития которой до конца не известны. Всё больше данных указывает на то, что развитию ВМД и других нейродегенеративных заболеваний способствуют изменения с возрастом в регуляции путей митоген-активируемых протеинкиназ, однако информация о них противоречива. В их числе – ERK1 и ERK2, которые активируются внеклеточными стимулами, в том числе факторами роста, цитокинами, гормонами и различными видами клеточного стресса, включая окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума. Целью настоящего исследования явилась оценка вклада изменения активности сигнального пути (SP) ERK1/2 в развитие ВМД. Проведено сравнение её изменений с возрастом в сетчатке крыс Wistar (контроль) и OXYS, у которых спонтанно развивается ретинопатия, аналогичная ВМД у людей. Было показано, что активность ERK1/2-SP увеличивается во время физиологического старения в сетчатке крыс Wistar. Манифестация и активная прогрессия ВМД-подобной патологии у крыс OXYS сопровождается гиперфосфорилированием ERK1/2 и MEK1/2 – ключевых киназ ERK1/2-SP в сетчатке. При прогрессии признаков ВМД в сетчатке крыс OXYS также происходит усиление ERK1/2-зависимого фосфорилирования тау-белка и альфа-В-кристаллина в положении Ser45.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, возрастная макулярная дегенерация, ERK1/2-сигнальный путь, альфа-В-кристаллин, тау-белок, фосфорилирование, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972523020070, **EDN:** QGTGWG

ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – сложное нейродегенеративное заболевание, которое становится основной причиной необратимой потери зрения у людей старше 60 лет. Согласно анализу метаданных, 8,7% населения мира страдают от ВМД, и их число будет увеличиваться с ростом продолжительности жизни. В основе патогенеза ВМД лежат структурно-функциональные изменения сетчатки, характерные для старения, тогда как молекулярно-генетические предпосылки и механиз-

мы их перехода в патологический процесс остаются неясными, с чем связано отсутствие эффективных методов профилактики и лечения заболевания [1]. Окислительный стресс, воспаление, нарушение протеостаза и апоптоз играют важную роль в патогенезе ВМД. Регуляция этих процессов тесно связана с сигнальными путями (SP) митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK). MAPK представляют собой семейство эволюционно консервативных протеинкиназ, которые критически важны для таких клеточных процессов, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз и

Принятые сокращения: Аβ – бета-амилоид; БА – болезнь Альцгеймера; ВМД – возрастная макулярная дегенерация; ДЭГ – гены с дифференциальной экспрессией; CryaB – альфа-В-кристаллин; ERK1 – внеклеточная сигнал-регулируемая протеинкиназа 1; ERK2 – внеклеточная сигнал-регулируемая протеинкиназа 2; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; SP – сигнальный путь, Тау – тау-белок.

* Адресат для корреспонденции.

выживание. MAPK-SP подразделяются на четыре отдельные группы: пути внеклеточных сигналов-регулируемых протеинкиназ 1 и 2 (ERK1 и 2), JNK1-3, p38 и ERK5 [2], которые активируются внеклеточными стимулами, включая факторы роста, цитокины, гормоны и различные виды клеточного стресса, включая окислительный стресс, ультрафиолетовое излучение и гипоксию. В результате активации трёхуровневого сигнального каскада MAPK фосфорилируют белки и активируют факторы транскрипции, расположенные в цитоплазме и ядре, что приводит к экспрессии генов-мишеней и формированию биологического ответа.

Нарушения MAPK-SP выявляются при ряде нейродегенеративных заболеваний, в том числе при болезни Альцгеймера (БА). Показана зависимость накопления патологических агрегатов бета-амилоида (Аβ) и гиперфосфорилированного тау-белка (Тау), степени нейровоспаления и окислительного стресса, а также других проявлений БА от активности MAPK [3, 4]. Вклад нарушений активности MAPK-SP в патогенез БА подтверждён результатами многочисленных исследований, и эти нарушения рассматриваются как потенциальная мишень для терапевтических воздействий. В то же время информация о влиянии нарушения регуляции MAPK-SP на развитие ВМД крайне ограничена и основана главным образом на результатах, полученных при исследовании культур клеток ретинального пигментного эпителия сетчатки (РПЭ). При этом ещё 10 лет назад Dridi et al. выявили повышенные уровни фосфорилирования ERK1/2 в первичных клеточных культурах РПЭ из глаз пациентов с поздними стадиями ВМД [5]. Более того, были выявлены ассоциации ВМД с однонуклеотидными полиморфизмами в генах, кодирующих элементы активируемых стрессом MAPK-SP [6]. Среди них ERK1/2, участвующие в поддержании протеостаза посредством регуляции агрегации белков, индуцированной стрессом эндоплазматического ретикулаума и другими стрессопосредованными ответами в клетке [7–9].

Становится всё более очевидным, что посттрансляционные модификации сигнальных белков, включая фосфорилирование, являются основным механизмом, контролирующим протеостаз [10], и зависят от белков-субстратов. Одним из них является Тау, гиперфосфорилирование которого вызывает образование патологических агрегатов в головном мозге и сетчатке больных БА, в том числе – у продормальных больных с лёгкими когнитивными нарушениями [11, 12] и в сетчатке пациентов с ВМД [13]. ERK1/2-SP обеспечивает актива-

цию белков-шаперонов, осуществляющих контроль качества белков. Один из них – альфа-В-кристаллин (CryaB), который снижает нейротоксичность белковых агрегатов [14] и становится основным белковым компонентом патологических комплексов в головном мозге пациентов с БА и друз, ассоциированных с ВМД [15].

Несмотря на ограниченность данных о влиянии активности MAPK на развитие ВМД, фармакологическое ингибирование этих SP обсуждается как альтернативный путь профилактики и лечения ВМД и других нейродегенеративных заболеваний [16]. Трудности в исследовании механизмов развития ВМД связаны с дефицитом адекватных моделей. Нами получены убедительные доказательства того, что линия преждевременно стареющих крыс OXYS соответствует критериям как модели БА [17, 18], так и модели ВМД [19]. На основании офтальмоскопических осмотров установлено, что первые клинические проявления ретинопатии, аналогичной ВМД, выявляются у ~20% крыс OXYS в возрасте 5–6 недель, а в возрасте 3–4 месяцев признаки ретинопатии регистрируются у всех животных. Патологические изменения прогрессируют и достигают выраженных стадий, предполагающих потерю или значительное ухудшение остроты зрения, к возрасту 14–18 месяцев. Ретинопатия крыс OXYS соответствует «сухой» форме ВМД и проявляется такими признаками этого заболевания, как дистрофические изменения и истончение сетчатки, нарушение микроциркуляции, изменение нейротрофического обеспечения, накопление липофусцина и Аβ, структурные изменения сетчатки [19–21].

Ранее мы показали, что БА-подобная патология у крыс OXYS развивается и прогрессирует на фоне изменения активности p38–MAPK и ERK1/2-SP в головном мозге [22–24]. Их активность в сетчатке ранее не исследовалась. Целью настоящей работы явилось сравнение изменений активности ERK1/2-SP в сетчатке при физиологическом старении крыс Wistar и при развитии признаков ВМД у крыс OXYS [25–27].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Самцы преждевременно стареющих крыс OXYS ($n = 24$) и контрольные крысы Wistar ($n = 24$) в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев были получены из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН. В возрасте 4 недель детёнышей

отнимали от груди, помещали в группы по пять животных в клетке ($57 \times 36 \times 20$ см) и содержали в стандартных лабораторных условиях (22 ± 2 °C и 12-часовой световой цикл/12-часовой цикл темноты). Животные имели доступ к стандартному корму для грызунов (ПК-120-1; ООО «Лабораторснаб», Москва, Россия) и воде *ad libitum*.

Вестерн-блот анализ. Сетчатку крыс OXYS и Wistar в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев ($n = 5$) гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз («Sigma-Aldrich», США) и ингибиторов фосфатаз. Концентрацию белка определяли с помощью бикарбонной кислоты (BCA) («Thermo Fisher Scientific», США). Белки в экстрактах разделяли электрофорезом и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США), которую затем блокировали 1%-ным (m/v) BCA в течение 1 ч, а затем инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами к ERK1/2, ERK1/2 (phospho T202, T185) («Thermo Fisher Scientific», разведение 1 : 1000), MEK1/2, MEK1/2 (phospho S218, S222), Tau, Tau (phospho T181), CryaB, антиphospho-S45 CryaB или GAPDH («Abcam», США; разведение 1 : 1000) и в течение 1 ч с вторичными антителами («Abcam», 1 : 5000). Полосы белков обнаруживали с помощью системы визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad»). Интенсивность хемилюминесцентных сигналов полос определяли количественно с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

Анализ экспрессии генов. Сетчатку крыс OXYS и Wistar в возрасте 20 дней, 3 и 18 месяцев ($n = 3$) использовали для анализа RNA-Seq и обрабатывали, как описано ранее [19]. Данные секвенирования были предварительно обработаны с помощью инструмента Cutadapt для удаления адаптеров и низкокачественных последовательностей. Полученные прочтения были сопоставлены с эталонной сборкой ге-

нома Rnor_6.0 в программном обеспечении TopHat2 и далее были преобразованы в таблицы количества генов с помощью данных аннотаций генов ENSEMBL и RefSeq. Полученные таблицы подвергали анализу дифференциальной экспрессии генов в программе DESeq. Гены с $p < 0,05$ отбирали как дифференциально экспрессируемые (ДЭГ). В анализ были включены гены, ассоциированные с ERK1/2-SP, согласно базе данных Rat Genome Database (<https://rgd.mcw.edu/>) и Киотской энциклопедии генов и геномов (<http://www.genome.jp/kegg>).

Статистический анализ. Все статистические расчёты производили с помощью программного пакета Statistica 10.0 («Statsoft», США). Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с *post hoc* сравнением групповых средних (Newman–Keul test). Как независимые факторы рассматривали генотип (Wistar, OXYS) и возраст (20 дней, 3 и 18 месяцев). Данные представлены в виде медианы (q_1 – q_3). Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ изменения экспрессии генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, в сетчатке крыс OXYS и Wistar с возрастом. Согласно анализу транскриптома сетчаток, среди 54 генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, экспрессия 19 генов изменялась в сетчатке крыс Wistar с возраста 20 дней до 3 месяцев (рис. 1, а). Среди них увеличился уровень мРНК семи генов (*Kras*, *Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc*, *Spred2* и *Spp1*), а 12 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Cryba1*, *Glpr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b*, *Map3k1* и *Rps6ka2*) – уменьшился.

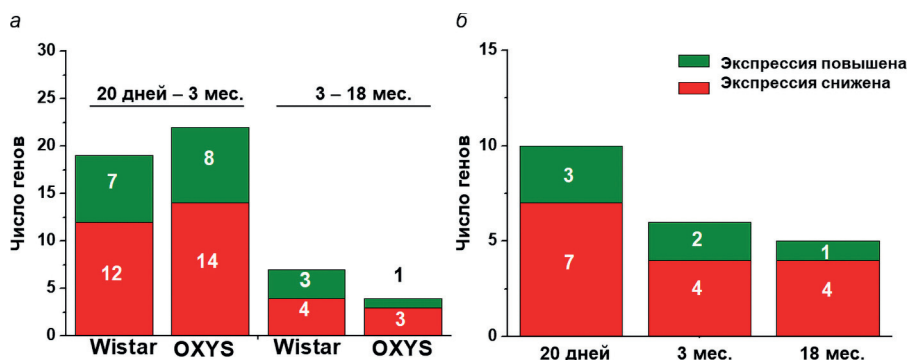


Рис. 1. Возрастные изменения экспрессии генов MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке крыс Wistar и OXYS. Количество ДЭГ в зависимости от возраста у крыс Wistar и OXYS (а). Количество ДЭГ у 20-дневных, 3- и 18-месячных крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar того же возраста (б). $p < 0,05$

С возраста 3 до 18 месяцев выявлено семь ДЭГ. Среди них уровень мРНК трёх генов (*Rps6ka6*, *Hcrtr1* и *Cryba1*) повышался, а генов *Mknk2*, *Rps6ka1*, *Iqgap3* и *Ptk2b* – снижался.

Максимальное количество ДЭГ (22) в сетчатке крыс OXYS выявлено в период манифестации признаков ретинопатии, аналогичной ВМД у людей (в возрасте от 20 дней до 3 месяцев). Среди них увеличился уровень мРНК восьми генов (*Braf*, *Map2k2*, *Tsc2*, *Dstyky*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc* и *Spred2*), а 14 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Ace2*, *Glipr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Prkcd*, *Ptk2b*, *Slpr1*, *Map3k1* и *Spp1*) – снизился (рис. 1, а). В период активного прогрессирования признаков ВМД с 3 до 18 месяцев у крыс OXYS выявлено 4 ДЭГ: *Ace2* – с повышенной экспрессией, а гены *Map2k1*, *Nqo2* и *Rps6ka2* – с пониженной.

Сравнение возрастной динамики ДЭГ показало, что в возрасте от 20 дней до 3 месяцев у крыс Wistar и OXYS сходным образом изменялась экспрессия мРНК 15 генов. Среди них уровень мРНК 10 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Glipr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b* и *Map3k1*) снижался, а генов *Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc* и *Spred2* – увеличивался. Кроме того, у крыс Wistar была подавлена экспрессия *Cryba1* и *Rps6ka2*, а экспрессия *Kras* и *Spp1* возрастала, в то время как у крыс OXYS выявлено снижение уровня мРНК генов *Ace2*, *Prkcd*, *Slpr1* и *Spp1* и повышение экспрессии *Braf*, *Map2k2* и *Dstyky* (рис. 1, а). Согласно анализу транскриптома сетчатки в возрасте от 3 до 18 месяцев, у крыс Wistar и OXYS не было общих ДЭГ, проявляющих однонаправленные изменения экспрессии.

Анализ межлинейных различий показал, что в возрасте 20 дней у крыс OXYS выявлено 10 ДЭГ по сравнению с контрольными крысами (Wistar) (рис. 1, б). Уровни мРНК генов *Map2k2*, *Phlpp1* и *Sirt3* повысились, а семи генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Eif3a*, *Prkcd*, *Map3k1* и *Spp1*) – уменьшились.

Проявление ВМД-подобной патологии у 3-месячных крыс OXYS происходило одновременно с изменением экспрессии шести генов, вовлечённых в MEK1/2–ERK1/2–SP: увеличивался уровень мРНК генов *Raf1* и *Ace2*, а у четырёх генов (*Nqo2*, *Cryba1*, *Rps6ka2* и *Spp1*) – снижался.

Активное прогрессирование ретинопатии у 18-месячных крыс OXYS было связано с пятью ДЭГ, участвующими в MEK1/2–ERK1/2–SP. При этом уровень мРНК гена *Dstyky* оказался повышенным, а экспрессия генов *Mknk2*, *Rps6ka1*, *Ptk2b* и *Spp1* была подавленной (рис. 1, б).

С 20-дневного до 3-месячного возраста у крыс OXYS и Wistar выявлены общие тенденции изменения ДЭГ: повышался уровень мРНК пяти генов (*Tsc2*, *Phlpp1*, *Necab2*, *Dcc*, *Spred2*), а уровень мРНК 10 генов (*Map2k1*, *Rps6ka3*, *Rps6ka6*, *Nqo2*, *Glipr2*, *Kars*, *Sirt3*, *Araf*, *Ptk2b* и *Map3k1*) в этом возрасте снижался. От 3 до 18 месяцев общих ДЭГ между крысами OXYS и Wistar не было.

Изменение содержания ERK1/2 и его фосфорилированной формы (p-ERK1/2) в сетчатке крыс с возрастом. Далее мы сравнили содержание белка ERK1/2 и степень его фосфорилирования в сетчатке крыс Wistar и OXYS. По данным ANOVA, содержание ERK1/2 в сетчатке зависело от генотипа животных ($F_{1,24} = 4,4$; $p < 0,045$) и не менялось с возрастом ($F_{2,24} = 0,069$; $p = 0,93$, рис. 2, а, б). Уровень фосфорилирования ERK1/2 зависел от генотипа крыс ($F_{1,24} = 18,5$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 45,7$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 9,3$; $p < 0,001$). Сравнение групповых средних показало, что уровень p-ERK1/2 в возрасте 20 дней не различался между линиями крыс ($p > 0,05$); однако к 3-месячному возрасту у крыс OXYS его уровень увеличился ($p < 0,002$) и стал выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,008$, рис. 2, в). К 18-месячному возрасту содержание p-ERK1/2 увеличивалось у крыс обеих линий, но у крыс OXYS оно оставалось выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,002$). Анализ соотношения p-ERK1/2 к ERK1/2 выявил зависимость от генотипа ($F_{1,24} = 4,5$; $p < 0,044$) и роста с возрастом ($F_{2,24} = 35,0$; $p < 0,001$) у крыс Wistar и OXYS. Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{2,24} = 3,8$; $p < 0,037$). Сравнение групповых средних показало, что соотношение p-ERK1/2 / ERK1/2 в сетчатке выше у крыс OXYS, чем у крыс Wistar в возрасте 3 и 18 месяцев ($p < 0,002$ и $p < 0,012$ соответственно, рис. 2, в).

Изменение содержания MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс с возрастом. Белки MEK1 и MEK2 регулируют активность ERK1 и ERK2 посредством фосфорилирования. На рис. 2, а, д, е представлены результаты вестерн-блот анализа содержания белков MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS. По данным ANOVA-анализа, экспрессия белка MEK1/2 в сетчатке крыс не зависела от генотипа животных ($F_{1,24} = 0,7$; $p = 0,40$) и не изменялась с возрастом ($F_{2,24} = 0,17$; $p = 0,85$). В то же время уровень фосфорилирования MEK1/2 в сетчатке крыс зависел от генотипа животных ($F_{1,24} = 24,4$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 27,6$; $p < 0,001$). Факторы «генотип»

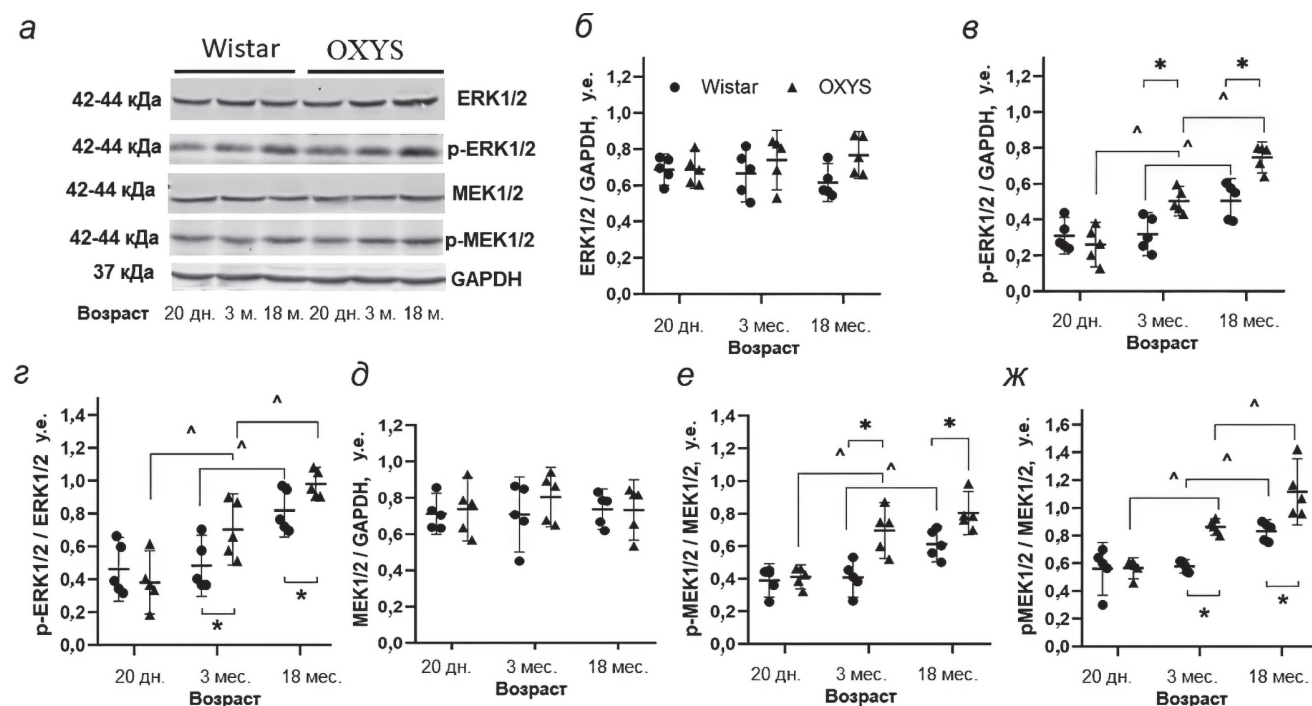


Рис. 2. Изменение содержания ERK1/2, p-ERK1/2, MEK1/2 и p-MEK1/2 в сетчатке крыс Wistar с возрастом и OXYS — при развитии ВМД-подобной патологии. Репрезентативные изображения блотов (а), содержание ERK1/2 (б), p-ERK1/2 (в), соотношение p-ERK1/2 и ERK1/2 (г), содержание MEK1/2 (д), p-MEK1/2 (е) и соотношение p-MEK1/2 и MEK1/2 (ж) в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом. В качестве контроля использовали GAPDH. ^ — достоверные изменения с возрастом у крыс одной линии ($p < 0,05$); * — достоверные различия между крысами OXYS и Wistar одного возраста

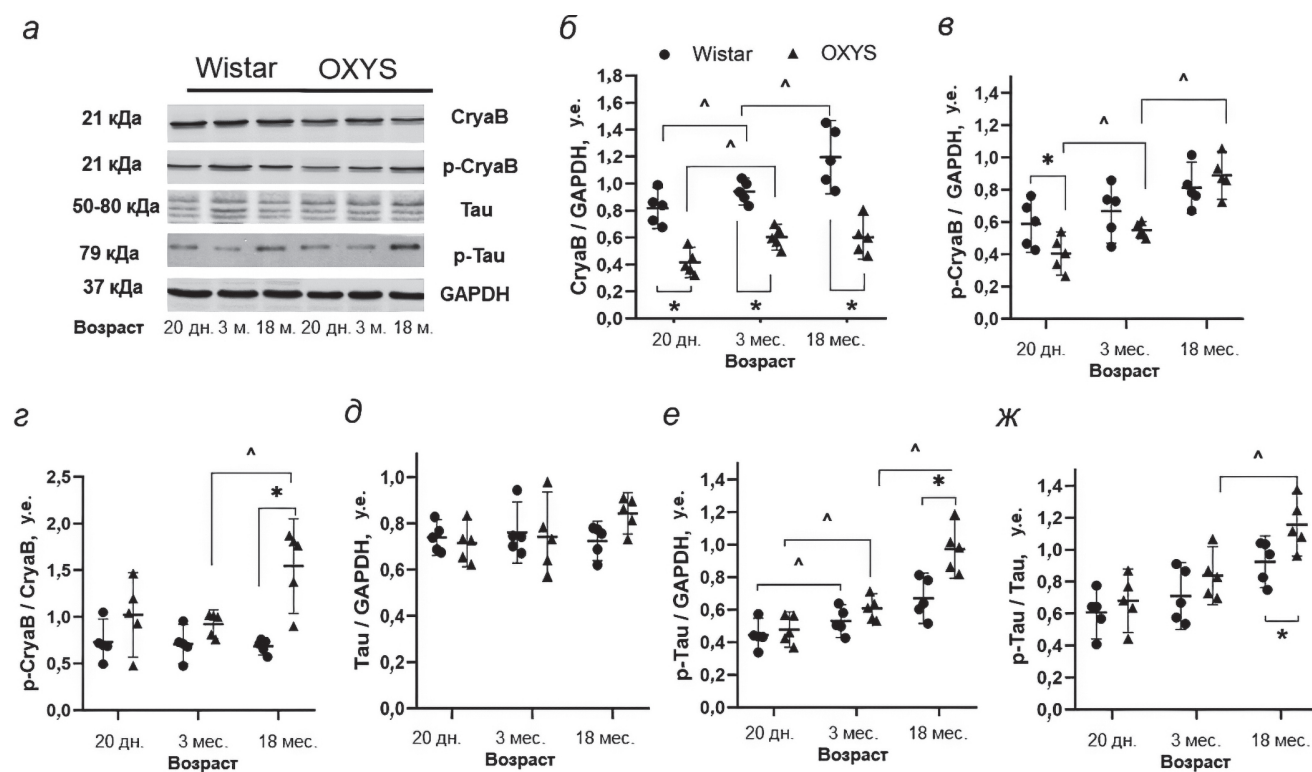


Рис. 3. Изменение содержания CryaB, p-CryaB, Tau и p-Tau в сетчатке крыс Wistar с возрастом и OXYS — при развитии ВМД-подобной патологии. Репрезентативные изображения блотов (а) и содержание CryaB (б), p-CryaB (в), соотношение p-CryaB и CryaB (г), содержание Tau (д), p-Tau (е) и соотношение p-Tau и Tau (ж) в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом. В качестве контроля использовали GAPDH. ^ — достоверные изменения с возрастом у крыс одной линии ($p < 0,05$); * — достоверные различия между крысами OXYS и Wistar одного возраста

и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 5,3$; $p < 0,013$). В 20-дневном возрасте содержание р-MEK1/2 у крыс обеих линий не различалось ($p > 0,05$); однако к 3-месячному возрасту у крыс OXYS его уровень увеличился ($p < 0,001$) и стал выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,001$). К 18-месячному возрасту у крыс обеих линий отношение возрастало, но у крыс OXYS оставалось выше, чем у крыс Wistar ($p < 0,015$).

Анализ соотношения р-MEK1/2 / MEK1/2 показал, что оно зависело от генотипа ($F_{1,24} = 33,7$; $p < 0,001$) и возраста ($F_{2,24} = 52,9$; $p < 0,001$), а факторы взаимодействовали между собой ($F_{1,24} = 8,08$; $p < 0,002$). Сравнение групповых средних показало, что соотношение р-MEK1/2 / MEK1/2 в возрасте 20 дней у двух линий не различалось ($p > 0,05$). Увеличение этого отношения к 3-месячному возрасту привело к достоверному увеличению этого показателя у крыс OXYS относительно крыс Wistar ($p < 0,001$, рис. 2, ж). К 18-месячному возрасту соотношение р-MEK1/2 / MEK1/2 увеличивалось и у крыс Wistar ($p < 0,001$), и у OXYS ($p < 0,020$), причём у крыс OXYS этот показатель превышал таковой у одновозрастных крыс Wistar ($p < 0,004$).

Изменение содержания CryaB и p-CryaB в сетчатке крыс с возрастом. Мы исследовали экспрессию малого шаперона CryaB как целевого белка для MEK1/2–ERK1/2-SP, а также уровень его фосфорилирования в позиции Ser45. По данным ANOVA-анализа, концентрация CryaB в сетчатке крыс Wistar и OXYS зависит от генотипа животных ($F_{1,24} = 104,5$; $p < 0,001$) и изменяется с возрастом ($F_{2,24} = 14,0$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» не взаимодействовали ($F_{1,24} = 3,1$; $p = 0,06$). Во всех возрастных группах уровень CryaB был ниже у крыс OXYS, чем у крыс Wistar того же возраста ($p < 0,001$ для всех случаев, рис. 3, а, б).

Уровень фосфорилирования CryaB не зависел от генотипа животных ($F_{2,24} = 3,7$; $p = 0,066$), но менялся с возрастом ($F_{2,24} = 28,0$; $p < 0,033$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 4,0$; $p < 0,010$). Сравнение групповых средних показало, что содержание р-CryaB у 20-дневных крыс OXYS было ниже, чем у крыс Wistar ($p < 0,001$, рис. 3, в). К 3-месячному возрасту уровень р-CryaB в сетчатке крыс OXYS достигал значений, наблюдаемых у крыс Wistar, а также достоверно не отличался в возрасте 18 месяцев. Анализ соотношения р-CryaB/CryaB показал, что оно зависело от генотипа ($F_{1,24} = 23,8$; $p < 0,001$) и возраста ($F_{2,24} = 3,9$; $p < 0,035$), при этом факторы взаимодействовали ($F_{1,24} = 4,8$; $p < 0,018$). Сравнение групповых средних показало, что

отношение р-CryaB/CryaB в возрасте 20 дней у двух линий не различалось ($p > 0,05$). В возрасте 3 месяцев у крыс OXYS была выявлена тенденция к увеличению отношения р-CryaB/CryaB относительно крыс Wistar ($p < 0,056$), к возрасту 18 месяцев этот показатель у крыс OXYS достоверно превышал значения контрольных крыс Wistar ($p < 0,001$) (рис. 3, г).

Изменение содержания Тау и p-TauT181 в сетчатке крыс с возрастом. По данным ANOVA, содержание белка Тау в сетчатке крыс Wistar и OXYS не зависело от генотипа животных ($F_{1,24} = 0,56$; $p = 0,46$) и достоверно не менялось с возрастом ($F_{2,24} = 0,93$; $p = 0,41$). Однако в возрасте 18 месяцев уровень Тау в сетчатке крыс OXYS был выше, чем у крыс Wistar того же возраста ($p < 0,028$, рис. 3, а, д–ж).

Уровень фосфорилирования Тау зависел от генотипа животных ($F_{1,24} = 15,4$; $p < 0,001$) и изменялся с возрастом ($F_{2,24} = 36,6$; $p < 0,001$). Факторы «генотип» и «возраст» взаимодействовали ($F_{1,24} = 5,5$; $p < 0,010$). Сравнение групповых средних показало, что в возрасте 20 дней и 3 месяцев уровень р-Тау не различался между крысами двух линий ($p > 0,05$, рис. 3, е). К 18-месячному возрасту содержание р-Тау увеличивалось у крыс Wistar и OXYS, но оставалось более высоким у крыс OXYS ($p < 0,008$). ANOVA показал, что отношение р-Тау/Тау зависит от генотипа ($F_{1,24} = 7,9$; $p < 0,010$) и увеличивается с возрастом ($F_{2,24} = 20,8$; $p < 0,001$) у крыс Wistar и OXYS. Факторы «генотип» и «возраст» не взаимодействовали ($F_{1,24} = 0,8$; $p = 0,448$). Быстрый рост отношения р-Тау/Тау в сетчатке крыс OXYS к 18-месячному возрасту привёл к увеличению этого показателя у крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar ($p < 0,036$, рис. 3, ж).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растёт количество данных, свидетельствующих о том, что с нарушением регуляции MAPK-путей связаны изменения в биологических процессах, способствующих старению и развитию связанных с ним заболеваний, однако данные об изменениях активности MAPK с возрастом крайне противоречивы [28]. В настоящем исследовании впервые проведена оценка изменений активности MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке с возрастом и их возможного вклада в развитие ВМД. Мы показали, что активность MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке при физиологическом старении крыс Wistar повышается с возрастом, а манифестация и активная прогрессия у крыс OXYS признаков ретинопатии,

аналогичной ВМД у людей, происходит на фоне гиперфосфорилирования ключевых киназ этого сигнального пути — ERK1/2 и MEK1/2.

На первом этапе мы оценили изменения с возрастом уровней мРНК ключевых генов MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке крыс Wistar и крыс OXYS на основании данных транскриптомов. Сетчатка содержит более 60 видов клеток, образующих различные структуры, которые могут стареть с разной скоростью [1], что неизбежно приводит к изменению их соотношения. Наши предыдущие исследования указывают на то, что соотношение различных типов клеток сетчатки с возрастом у крыс Wistar и OXYS изменяется по-разному. Так, у крыс OXYS на фоне нейродегенеративных изменений с возрастом усиливается гибель фоторецепторов, развивается глиоз [27]. Однако в настоящем исследовании мы не выявили межлинейных различий в уровнях мРНК ключевых генов-участников MEK1/2–ERK1/2-SP. Анализ профиля экспрессии генов, ассоциированных с MEK1/2–ERK1/2-SP, также не выявил существенных изменений с возрастом уровней мРНК этих генов как у крыс Wistar, так и у крыс OXYS. В сетчатке крыс OXYS среди ДЭГ количество генов с подавленной регуляцией превышало количество генов с повышенной регуляцией в каждой возрастной группе. В их числе ген *Map2k1* (митоген-активируемая протеинкиназа-киназа 1; генный продукт: MEK1), уровень мРНК которого был снижен в сетчатке 20-дневных крыс OXYS. *Map2k1* — киназа двойной специфичности, которая участвует в активации ERK1 и ERK2. Такой результат может указывать на снижение активности SP, но мы выявили гиперэкспрессию гена *Map2k2* (митоген-активируемая протеинкиназа 2; продукт гена: MEK2), который является паралогом гена MAP2K1. ERK1/2 — это единственные субстраты MAP2K1/2. Таким образом, противоположные изменения экспрессии генов *Map2k1* и *Map2k2* не приводят к изменению экспрессии ERK1 и ERK2. Кроме того, в сетчатке крыс OXYS снижен уровень мРНК гена *Map3k1* (митоген-активируемая протеинкиназа киназы киназы киназы 1), белковый продукт которого функционирует выше по ERK-SP и активирует его посредством активации MAP2K1.

Интересно, что в сетчатке крыс OXYS снижен уровень мРНК гена *Rps6ka3* (рибосомальной протеинкиназы S6 A3). RPS6KA3 действует ниже по ERK1/2-SP и опосредует пролиферации, выживанию и дифференцировке клеток путём модулирования передачи сигналов mTOR. Эти данные согласуются с тем, что в

сетчатке крыс OXYS подавлена активность сигнального пути mTOR [29], и подтверждают связь между этими редокс-зависимыми SP. Среди генов, экспрессия которых повышена в сетчатке крыс OXYS, ген *Phlpp1* (домен PH и лейцин-богатые повторы протеинфосфатазы 1). Его продукт дефосфорилирует RAF1, тем самым ингибируя его киназную активность и действуя как негативный регулятор передачи сигналов. Среди ДЭГ, экспрессия которых снижена, следует отметить секретируемый фосфопротеин 1 (*Spp1*, также известный как остеопонтин). Недавно было показано, что он играет потенциальную роль в опосредованном макрофагами клиренсе Aβ [30]. Следовательно, недостаточная экспрессия *Spp1* может способствовать характерному для крыс OXYS накоплению патологических агрегатов Aβ в сетчатке и/или усугублять его, усиливая таким образом прогрессию нейродегенеративных изменений. Важно отметить, что большинство ДЭГ со сниженной экспрессией находятся ниже ключевых киназ рассматриваемого сигнального каскада и не влияют на его активность в целом.

На активность MEK1/2–ERK1/2-SP могут влиять мутации в генах, ассоциированных с этим SP, например, *BRAF* или *RAS* [31]. В недавнем исследовании мы обнаружили у крыс OXYS полиморфизмы в генах *Nqo2*, *Glipr2* и *Spred2*, которые участвуют в MEK1/2–ERK1/2-SP [32]. Тем не менее эти полиморфизмы являются синонимичными аминокислотными заменами и не влияют на структуру, функцию транскрипта и/или белка или на активность SP в целом.

Результаты анализа транскриптома были подтверждены исследованием на белковом уровне. Содержание ERK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS с возрастом существенно не менялось. Наши результаты согласуются с выводами единственного исследования содержания этого белка в сетчатке при ВМД, в котором не была выявлена разница в содержании ERK1/2 в сетчатке у пациентов с поздними стадиями ВМД по сравнению с пациентами без ВМД [5]. В настоящем исследовании мы не выявили изменений в содержании ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS как в период выраженных патологических изменений, так и на «доклинической», и на стадии манифестации признаков ВМД.

Передача сигнала по каскаду ERK1/2 происходит посредством последовательного фосфорилирования нижестоящих киназ, что является важной характеристикой активности SP. Соответственно, именно повышение уровня фосфорилированного ERK1/2 свидетельствует об активации этого сигнального пути.

Мы выявили повышение этого показателя с возрастом в сетчатке крыс обеих линий. При этом уровень фосфорилирования ERK1/2 в сетчатке крыс OXYS был выше, чем у крыс Wistar, начиная с молодого возраста. Таким образом, наши результаты согласуются с данными Dridi о гиперфосфорилировании ERK1/2 в сетчатке на поздних стадиях ВМД [5]. Также мы выявили повышенное фосфорилирование ERK1/2 уже на стадии манифестации ВМД-подобной патологии у крыс OXYS. Более того, в сетчатке 3- и 18-месячных крыс OXYS повышено, по сравнению с одновозрастными крысами Wistar, фосфорилирование MEK1/2. Киназы MEK1/2 являются активаторами ERK1/2 и обладают узкой субстратной специфичностью. Гиперфосфорилирование MEK1/2 указывает на активацию исследуемого нами SP.

Дополнительно в качестве критерия оценки активности ERK1/2-SP мы оценили изменения ERK1/2-зависимого фосфорилирования небольшого белка-шаперона CryaB. Этот белок защищает клетки сетчатки от окислительного стресса и препятствует нарушениям протеостаза, которым отводится важная роль в патогенезе ВМД [33]. В достаточно многочисленных исследованиях было показано, что эндогенный CryaB активируется при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при ВМД [34]. Тем не менее здесь мы подтвердили, что уровень CryaB в сетчатке крыс OXYS ниже, чем у крыс Wistar на протяжении всей жизни [35]. Такой результат, на первый взгляд, противоречит предыдущим исследованиям. В то же время в ряде работ было показано, что ингибирование CryaB повышает чувствительность клеток к окислительному стрессу, тогда как его избыточная экспрессия — защищает. Клетки РПЭ, лишённые CryaB, оказались более восприимчивыми к окислительному и эндоплазматическому стрессу [36–38].

Мутация R120G в CryaB индуцирует агрегацию белка, которая принимает участие в патогенезе ВМД. Активно обсуждается терапевтический потенциал CryaB в отношении ВМД [39]. Так, введение мышам экзогенного полноразмерного CryaB уменьшает нейровоспаление, нейропатию зрительного нерва и острое повреждение спинного мозга. Предварительная обработка CryaB оказалась эффективной в подавлении активации маркеров старения в клетках РПЭ [40]. Можно полагать, что увеличение с возрастом содержания CryaB в сетчатке крыс Wistar обусловлено адаптивной реакцией на накопление стрессовых раздражителей при физиологическом старении.

Исследование ERK1/2-зависимого фосфорилирования CryaB в положении Ser45 в сетчатке, его изменений с возрастом и при развитии ВМД ранее не проводилось. Примечательно, что гиперфосфорилирование CryaB совпало с усилением фосфорилирования ERK1/2 в сетчатке крыс Wistar и OXYS, что подтверждает активацию MEK1/2–ERK1/2-SP. Фосфорилирование CryaB повышает его способность образовывать прочные связи с нейротоксическими белками, включая A β , и делает CryaB нерастворимым. Усиленное накопление таких агрегатов было выявлено в гомогенатах головного мозга пациентов с БА [41]. Сходство патогенеза ВМД и БА в настоящее время активно обсуждается. Дегенеративные изменения сетчатки при ВМД, как и мозга при БА, связаны с воспалением, патологической агрегацией A β и окислительным стрессом [42]. Их регуляция MAPK-SP предполагает сходные изменения активности этого пути при развитии заболеваний. Активация пути MEK1/2–ERK1/2-SP с гиперфосфорилированием ERK1 и ERK2 обнаружена у больных деменцией [43]. Эти изменения связаны с нейротоксическим действием патологических агрегатов A β , отложения которых выявляются также в сетчатке пациентов с ВМД и считаются дополнительным фактором риска развития потери зрения. Результаты наших исследований на крысах OXYS, у которых одновременно развиваются признаки БА и ВМД, подтверждают эту гипотезу. В сетчатке крыс OXYS усиленное накопление A β регистрируется в возрасте около 12 месяцев — в период, когда признаки ВМД достаточно ярко выражены и прогрессируют [19]. В головном мозге крыс OXYS повышенный уровень A β начинает определяться с ~7 месяцев, его накопление прогрессирует с возрастом параллельно с другими признаками БА [17] на фоне усиления активности MEK1/2–ERK1/2-SP [24]. Аналогичные данные были получены на других животных моделях БА [44].

Тау является белком-мишенью ERK1/2-SP. Гиперфосфорилирование Тау — один из ключевых патоморфологических признаков заболевания — выявляется не только в мозге, но и в сетчатке как у пациентов с БА, так и у крыс OXYS [17]. Накопление этого белка в нейрофибриллярных клубках в структурах головного мозга усугубляет нейротоксическое действие на нейроны, запуская петлю обратной связи, которая приводит к гиперактивации MAPK-SP. Ранее мы выявили увеличение активности p38 MAPK-SP в мозге крыс OXYS уже на стадии манифестации признаков БА [22, 23] на фоне гиперфосфорилирования Тау, которое

предшествует накоплению Аβ и регистрируется уже в возрасте 3 месяцев [17]. Как показало настоящее исследование, развитие признаков ВМД у крыс OXYS происходит на фоне усиления в сетчатке ERK1/2-зависимого фосфорилирования Тау.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши данные свидетельствуют о повышении активности MEK1/2–ERK1/2-SP в сетчатке здоровых животных с возрастом. У крыс OXYS манифестация и прогрессия признаков ВМД происходит на фоне повышенной, по сравнению с крысами Wistar, активности MEK1/2–ERK1/2-SP. Прогрессия признаков ВМД сопровождается усилением в сетчатке крыс OXYS MEK1/2–ERK1/2-зависимого фосфорилирования Тау и CrysB (p-Ser45) и, как было показано ранее, накоплением патологических агрегатов Аβ.

Вклад авторов. Н. А. Муралёва — концепция исследования, проведение экспериментов; Н. Г. Колосова — обсуждение результатов

исследования; Н. А. Муралёва и Н. Г. Колосова — подготовка и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 22-25-00224).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа выполнена на крысах линии OXYS и Wistar (контрольная линия) на базе Центра коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН. Содержание животных (включая соответствующие помещения, квалифицированный персонал, необходимую документацию) и все эксперименты с животными проводились в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 85/1 от 18.06.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blasiak, J., Sobczuk, P., Pawlowska, E., and Kaarniranta, K. (2022) Interplay between aging and other factors of the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Ageing Res. Rev.*, **81**, 101735, doi: 10.1016/j.arr.2022.101735.
2. Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update, *Physiol. Rev.*, **92**, 689–737, doi: 10.1152/physrev.00028.2011.
3. Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H., and Padmanabhan, J. (2017) Activation of Ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0149-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0149-16.2017.
4. Ahmed, T., Zulfiqar, A., Arguelles, S., Rasekhian, M., Nabavi, S. F., et al. (2020) Map kinase signaling as therapeutic target for neurodegeneration, *Pharmacol. Res.*, **160**, 105090, doi: 10.1016/j.phrs.2020.105090.
5. Dridi, S., Hirano, Y., Tarallo, V., Kim, Y., Fowler, B. J., et al. (2012) ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13781–13786, doi: 10.1073/pnas.1206494109.
6. SanGiovanni, J. P., and Lee, P. H. (2013) AMD-associated genes encoding stress-activated MAPK pathway constituents are identified by interval-based enrichment analysis, *PLoS One*, **8**, e71239, doi: 10.1371/journal.pone.0071239.
7. Jung, S., Nah, J., Han, J., Choi, S. G., Kim, H., et al. (2016) Dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26) stimulates Aβ42 generation by promoting amyloid precursor protein axonal transport during hypoxia, *J. Neurochem.*, **137**, 770–781, doi: 10.1111/jnc.13597.
8. Calderwood, S. K., Xie, Y., Wang, X., Khaleque, M. A., Chou, S. D., et al. (2010) Signal transduction pathways leading to heat shock transcription, *Signal Transd. Ins.*, **2**, 13–24, doi: 10.4137/STI.S3994.
9. Darling, N. J., and Cook, S. J. (2014) The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 2150–2163, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.009.
10. Hutt, D. M., and Balch, W. E. (2013) Expanding proteostasis by membrane trafficking networks, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a013383, doi: 10.1101/cshperspect.a013383.
11. Du, X., Koronyo, Y., Mirzaei, N., Yang, C., Fuchs, D. T., et al. (2022) Label-free hyperspectral imaging and deep-learning prediction of retinal amyloid β-protein and phosphorylated tau, *PNAS Nexus*, **1**, pgac164, doi: 10.1093/pnasnexus/pgac164.

12. Den Haan, J., Morrema, T., Verbraak, F. D., de Boer, J. F., Scheltens, P., et al. (2018) Amyloid-beta and phosphorylated tau in post-mortem Alzheimer's disease retinas, *Acta Neuropath. Com.*, **6**, 147, doi: 10.1186/s40478-018-0650-x.
13. Löffler, K. U., Edward, D. P., and Tso, M. O. (1995) Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina, *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, **36**, 24-31.
14. Tenreiro, S., Eckermann, K., and Outeiro, T. F. (2014) Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 42, doi: 10.3389/fnmol.2014.00042.
15. Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., et al. (2002) Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14682-14687, doi: 10.1073/pnas.222551899.
16. Kyosseva, S. V. (2016) Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration, *Ophthalmol Eye Dis.*, **8**, 23-30, doi: 10.4137/OED.S32200.
17. Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., et al. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer's disease, *Cell Cycle*, **13**, 898-909, doi: 10.4161/cc.28255.
18. Stefanova, N. A., Ershov, N. I., Maksimova, K. Y., Muraleva, N. A., Tyumentsev, M. A., and Kolosova, N. G. (2019) The rat prefrontal-cortex transcriptome: effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **74**, 33-43, doi: 10.1093/gerona/gly198.
19. Kozhevnikova, O. S., Korbolina, E. E., Ershov, N. I., and Kolosova, N. G. (2013) Rat retinal transcriptome: effects of aging and AMD-like retinopathy, *Cell Cycle*, **12**, 1745-1761, doi: 10.4161/cc.24825.
20. Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh, Logvinov, S. V., and Kolosova, N. G. (2008) Clinical and morphological characteristics of chorioretinal degeneration in early aging OXYS rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 455-458, doi: 10.1007/s10517-009-0298-4.
21. Колосова Н. Г., Кожевникова О. С., Муралёва Н. А., Рудницкая Е. А., Румянцева Ю. В., Стефанова Н. А., Телегина Д. В., Тюменцев М. А., Фурсова А. Ж. (2022) SkQ1 как инструмент воздействия на программу преждевременного старения: опыт исследований на крысах OXYS, *Биохимия*, **87**, 1916-1927, doi: 10.31857/S0320972522120119.
22. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2019) p38 MAPK-dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Exp. Gerontol.*, **119**, 45-52, doi: 10.1016/j.exger.2019.01.017.
23. Muraleva, N. A., Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2020) SkQ1 suppresses the p38 MAPK signaling pathway involved in Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *Antioxidants*, **9**, 676, doi: 10.3390/antiox9080676.
24. Muraleva, N. A., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2021) MEK1/2-ERK pathway alterations as a therapeutic target in sporadic Alzheimer's disease: a study in senescence-accelerated OXYS rats, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1058, doi: 10.3390/antiox10071058.
25. Saprunova, V. B., Lelekova, M. A., Kolosova, N. G., and Bakeeva, L. E. (2012) SkQ1 slows development of age-dependent destructive processes in retina and vascular layer of eyes of Wistar and OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 648-658, doi: 10.1134/S0006297912060120.
26. Markovets, A. M., Saprunova, V. B., Zhdankina, A. A., Fursova, A. Zh., Bakeeva, L. E., and Kolosova, N. G. (2011) Alterations of retinal pigment epithelium cause AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats, *Aging*, **3**, 44-54, doi: 10.18632/aging.100243.
27. Tegelina, D. V., Kozhevnikova, O. S., Bayborodin, S. I., and Kolosova, N. G. (2017) Contributions of age-related alterations of the retinal pigment epithelium and of glia to the AMD-like pathology in OXYS rats, *Sci. Rep.*, **7**, 41533, doi: 10.1038/srep41533.
28. Cano, M., Guerrero-Castilla, A., Nabavi, S. M., Ayala, A., and Argüelles, S. (2019) Targeting pro-senescence mitogen activated protein kinase (Mapk) enzymes with bioactive natural compounds, *Food Chem. Toxicol.*, **2**, 110544, doi: 10.1016/j.fct.2019.05.052.
29. Kolosova, N. G., Muraleva, N. A., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Fursova, A. Z., and Blagosklonny, M. V. (2012) Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in rats, *Am. J. Pathol.*, **181**, 472-477, doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.018.
30. Rentsendorj, A., Sheyn, J., Fuchs, D. T., Daley, D., Salumbides, B. C., et al. (2018) A novel role for osteopontin in macrophage-mediated amyloid-β clearance in Alzheimer's models, *Brain Behav. Immun.*, **67**, 163-180, doi: 10.1016/j.bbi.2017.08.019.
31. Xu, J., Pfarr, N., Endris, V., Mai, E. K., Hanafiah, N. H., et al. (2017) Molecular signaling in multiple myeloma: association of RAS/RAF mutations and MEK/ERK pathway activation, *Oncogenesis*, **6**, e337, doi: 10.1038/oncsis.2017.36.
32. Devyatkin, V. A., Redina, O. E., Kolosova, N. G., and Muraleva, N. A. (2020) Single-nucleotide polymorphisms associated with the senescence-accelerated phenotype of OXYS rats: a focus on Alzheimer's disease-like and age-related-macular-degeneration-like pathologies, *J. Alzheimer's Dis.*, **73**, 1167-1183, doi: 10.3233/JAD-190956.
33. Maksimiuk, M., Sobiborowicz, A., Tuzimek, A., Deptała, A., Czerw, A., et al. (2020) αB-crystallin as a promising target in pathological conditions – A review, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **27**, 326-334, doi: 10.26444/aaem/111759.

34. Kannan, R., Sreekumar, P. G., and Hinton, D. R. (2016) Alpha crystallins in the retinal pigment epithelium and implications for the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 258-268, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.05.016.
35. Muraleva, N. A., Kozhevnikova, O. S., Zhdankina, A. A., Stefanova, N. A., Karamysheva, T. V., et al. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 restores α B-crystallin expression and protects against AMD-like retinopathy in OXYS rats, *Cell Cycle*, **13**, 3499-3505, doi: 10.4161/15384101.2014.958393.
36. Dou, G., Sreekumar, P. G., Spee, C., He, S., Ryan, S. J., et al. (2012) Deficiency of α B crystallin augments ER stress-induced apoptosis by enhancing mitochondrial dysfunction, *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 1111-1122, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.042.
37. Yaung, J., Jin, M., Barron, E., Spee, C., Wawrousek, E. F., et al. (2007) α -Crystallin distribution in retinal pigment epithelium and effect of gene knockouts on sensitivity to oxidative stress, *Mol. Vis.*, **13**, 566-577.
38. Zhou, P., Kannan, R., Spee, C., Sreekumar, P. G., Dou, G., and Hinton, D. R. (2014) Protection of retina by α B crystallin in sodium iodate induced retinal degeneration, *PLoS One*, **9**, e98275, doi: 10.1371/journal.pone.0098275.
39. Sreekumar, P. G., Li, Z., Wang, W., Spee, C., Hinton, D. R., Kannan, R., MacKay, J. A. (2018) Intra-vitreous α B crystallin fused to elastin-like polypeptide provides neuroprotection in a mouse model of age-related macular degeneration, *J. Control. Rel.*, **283**, 94-104, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.014.
40. Sreekumar, P. G., Reddy, S. T., Hinton, D. R., and Kannan, R. (2022) Mechanisms of RPE senescence and potential role of α B crystallin peptide as a senolytic agent in experimental AMD, *Exp. Eye Res.*, **215**, 108918, doi: 10.1016/j.exer.2021.108918.
41. Kato, K., Inaguma, Y., Ito, H., Iida, K., Iwamoto, I., et al. (2001) Ser-59 is the major phosphorylation site in α B-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease, *J. Neurochem.*, **76**, 730-736, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00038.x.
42. Ashok, A., Singh, N., Chaudhary, S., Bellamkonda, V., Kritikos, A. E., et al. (2020) Retinal degeneration and Alzheimer's disease: an evolving link, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7290, doi: 10.3390/ijms21197290.
43. Zhu, X., Castellani, R. J., Takeda, A., Nunomura, A., Atwood, C. S., et al. (2001) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer's disease: the 'two hit' hypothesis, *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 39-46, doi: 10.1016/s0047-6374(01)00342-6.
44. Faucher, P., Mons, N., Micheau, J., Louis, C., and Beracochea, D. J. (2016) Hippocampal injections of oligomeric amyloid β -peptide (1-42) induce selective working memory deficits and long-lasting alterations of ERK signaling pathway, *Front. Aging Neurosci.*, **7**, 245, doi: 10.3389/fnagi.2015.00245.

ALTERATION OF THE MEK1/2–ERK1/2 SIGNALING PATHWAY IN THE RETINA WITH AGE AND WITH THE DEVELOPMENT OF AMD-LIKE RETINOPATHY

N. A. Muraleva* and N. G. Kolosova

*Institute of Cytology and Genetics (ICG), Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: myraleva@bionet.nsc.ru*

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex neurodegenerative disease that is a major cause of irreversible visual impairment in developed countries. Although age is the greatest risk factor for AMD, molecular explanations of this clinical observation are not known. Growing evidence shows that dysregulation of MAPK pathways contributes to aging and neurodegenerative diseases; however, information about the upregulation of MAPKs in this context is still controversial. Among these kinases, ERK1 and ERK2 participate in the maintenance of proteostasis through the regulation of protein aggregation induced by endoplasmic-reticulum stress and other stress-mediated responses in the cell. Here, to assess the contribution of alterations of MEK1/2-ERK1/2 signaling-pathway activity to the development of AMD, we compared its changes with age in the retina of control (Wistar) rats and OXYS rats, which develop AMD-like retinopathy spontaneously. We showed that ERK1/2 signaling-pathway activity increases during physiological aging in the Wistar retina. The manifestation and dramatic progression of AMD-like pathology in OXYS rats co-occurred with hyperphosphorylation of ERK1/2 and MEK1/2 as key ERK1/2 signaling-pathway kinases in the retina. Besides, progression of the retinopathy was accompanied by ERK1/2-dependent tau protein hyperphosphorylation and enhancement of ERK1/2-dependent phosphorylation of CryaB at Ser45 in the retina.

Keywords: aging, age-related macular degeneration, ERK1/2 signaling pathway, α B-crystallin, tau protein, phosphorylation, OXYS rat