

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии  
наук»  
(ИЦиГ СО РАН)

*На правах рукописи*

Еремин Дмитрий Вадимович

**УЧАСТИЕ ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА  
МОЗГА (CDNF) В РЕГУЛЯЦИИ ПОВЕДЕНИЯ И СЕРОТОНИНОВОЙ  
СИСТЕМЫ МОЗГА У МЫШЕЙ**

1.5.5 – физиология человека и животных  
Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук  
В.С. Науменко

Новосибирск 2026

## Оглавление

Список сокращений .....	3
Введение .....	4
Глава 1. Литературный обзор .....	9
1.1 Серотониновая система мозга .....	9
1.2 Структура, роль и функции классических нейротрофических факторов .....	13
1.2.1 Семейство нейротрофинов (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) .....	13
1.2.2 Семейство глиального нейротрофического фактора (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN) .....	18
1.3. Современные представления о структуре и функциях CDNF .....	22
1.3.1 Строение CDNF .....	22
1.3.2 Цитопротекторные свойства CDNF .....	25
1.3.2.1 Участие CDNF в стрессе ЭИП .....	25
1.3.2.2 Антиапоптотические свойства CDNF .....	26
1.3.2.3 Противовоспалительные эффекты CDNF .....	27
1.3.3 Участие CDNF в созревании и поддержании нейротрансмиттерных систем .....	28
Глава 2. Материалы и методы .....	30
2.1 Экспериментальные животные .....	30
2.2 Поведенческое тестирование .....	35
2.3 Генно-инженерные методы .....	38
2.4 Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени .....	38
2.5 Вестерн блот .....	40
2.6 Определение уровня серотонина и его метаболита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии .....	42
2.7 Иммуногистохимическое окрашивание .....	43
2.8 Статистическая обработка данных .....	43
Глава 3 Результаты .....	45
Глава 4 Обсуждение результатов .....	73
Заключение .....	82
Выводы .....	83
Список литературы .....	85

## Список сокращений

5-НТ (5-hydroxytryptamine) – серотонин или 5-гидрокситриптамиин;

5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота;

МАОА – моноаминоксидаза;

ДА – дофамин;

БП – болезнь Паркинсона;

НТФ – нейротрофический фактор;

CDNF (cerebral dopamine neurotrophic factor) – дофаминовый нейротрофический фактор мозга;

MANF (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor) – мезенцефалический астроцитарный нейротрофический фактор;

BDNF (brain derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга;

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум;

UPR (unfolded protein response) – реакция на развернутые белки;

GRP78 (glucose-regulated protein 78) – связывающий белок иммуноглобулина, также известный как белок 78 кДа, регулируемый глюкозой, или белок 5 теплового шока 70 кДа (кодируется геном *Hspa5*);

PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) – эукариотический фактор инициации трансляции 2-альфа-киназа 3 (кодируется геном *Eif2ak3*);

ATF6 (activating transcription factor 6) – активирующий фактор транскрипции 6;

IRE1 $\alpha$  (inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$ ) – инозитол-требующий фермент 1  $\alpha$  (кодируется геном *Ern1*);

ХВР1 (the x-box binding protein 1) – Связывающий X-box белок 1;

МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;

6-ОНДА – 6-гидроксидофамин;

AAV (adeno-associated virus) – аденоассоциированный вирус;

GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

## Введение

### Актуальность работы.

Нейротрофические факторы (НТФ) – это большая группа полипептидов (до 200 аминокислот), которые играют ключевую роль в развитии и сохранении структур как центральной и периферической нервных систем, так и многих других систем организма (Skarpeg, 2018). Они принимают участие в регуляции роста, развития, дифференциации, миграции и выживания клеточных популяций, процессах их адаптации к внешним воздействиям. Эволюционно НТФ являются очень древними и появились еще до развития позвоночных животных (Bothwell, 2016).

Среди наиболее известных на сегодня НТФ можно отметить фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофины (NT3-7) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Кроме того, нейротрофной активностью обладает разнообразная группа белков, классифицируемых как ростовые факторы (Voutilainen et al., 2015). Все НТФ секретируются клеткой и связываются с рецепторами на плазматической мембране (в основном из семейства Trk – TrkA, TrkB, TrkC), запуская нижележащие сигнальные пути, такие как путь регулируемой внеклеточными сигналами киназы (Ras/ERK), путь PLC $\gamma$  или путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt) (Airaksinen and Saarna, 2002). Эти сигнальные каскады обеспечивают формирование синапсов, выживание, дифференциацию и созревание нейронов.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor; CDNF) вместе с мезенцефалическим астроцитарным нейротрофическим фактором (mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor; MANF) образуют особое семейство секретируемых белков с нейротрофической активностью (Petrova et al., 2003; Lindholm et al., 2007). Свое название CDNF получил благодаря способности защищать и восстанавливать дофаминергические (ДА) нейроны, продемонстрированной в двух моделях болезни Паркинсона (БП) – вызванной 6-гидроксидофамином (6-OHDA), либо 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) у грызунов и человекообразных приматов (Lindholm et al., 2007; Airavaara et al., 2012; Garea-Rodríguez et al., 2016). Наблюдаемые нейротрофические эффекты CDNF, оказываемые на нигростриальные ДА нейроны, привели к тому, что уже были проведены клинические испытания, в которых CDNF используется для лечения БП у людей (Huttunen and Saarna, 2019).

В рамках первого клинического исследования CDNF на людях (фаза I-II) с участием пациентов с умеренной и тяжелой БП было установлено, что ежемесячные внутримозговые инфузии препарата через имплантируемую систему доставки являются безопасными и хорошо

переносятся: связанные с препаратом нежелательные явления были легкими или умеренными и не отличались по частоте от плацебо, а серьезные осложнения носили процедурный характер и были устранены после коррекции методики. Статистически значимого превосходства над плацебо в динамике двигательных симптомов по шкале UPDRS за 6 месяцев достигнуто не было, однако у отдельных участников на ПЭТ-сканировании отмечены позитивные сдвиги в дофаминовой системе, которые не наблюдались в контрольной группе, что рассматривается как предварительный биологический сигнал. В настоящее время продолжается долгосрочное наблюдение за пациентами, а также ведутся разработки проникающих в мозг аналогов CDNF (Huttunen et al., 2023).

В норме CDNF локализуется в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭПР), однако может усиленно секретироваться из клетки в условиях стресса ЭПР и защищать соседние клетки (Löhela et al., 2024). Стресс ЭПР – это патологическое состояние клеток, возникающее из-за неправильной укладки синтезируемых белков, такое состояние свойственно многим нейродегенеративным заболеваниям. В такие моменты решается судьба клетки: апоптоз или выживание. Реакция на развернутые белки (Unfolded Protein Response, UPR) является специализированным сигнальным механизмом, который замедляет синтез одних белков, но усиливает синтез белков-шаперонов, тем самым позволяя клетке пережить стресс ЭПР. Считается, что CDNF может связываться с сенсорами UPR и с самими неправильно свернутыми белками, подавляя сверхактивацию данного сигнального пути.

Хотя CDNF и классифицируются как НТФ в силу нейропротекторного и восстанавливающего действия, структурно он не похож на какие-либо другие НТФ, такие как NGF, BDNF или GDNF. Кроме того, для CDNF (как, впрочем, и для MANF) не было идентифицировано собственных рецепторов на клеточной поверхности. Однако позднее обнаружили, что CDNF и MANF могут связываться с KDEL-рецептором на плазматической мембране через C-концевую KDEL-подобную последовательность (Lindholm and Saarma., 2022).

#### **Степень разработанности проблемы.**

Есть данные о нейротрофных свойствах CDNF, а также о том, что этот НТФ способен активировать пролиферацию и миграцию нейронов (Liu et al., 2022). По результатам клинических испытаний на добровольцах с болезнью Паркинсона было показано, что данный белок безопасен для введения, но не оказал ожидаемого терапевтического эффекта (Huttunen et al., 2023). При этом полного представления об эффектах CDNF на мозг и поведение до сих пор нет. Хотя в названии и имеется слово «дофаминовый», эффекты CDNF вероятно не ограничиваются лишь одной нейротрансмиттерной системой. Одной из таких систем может быть серотониновая (5-НТ) система мозга, которая является наиболее древней и экспансивной, и отвечает за такие паттерны поведения, как агрессия, тревога, страх, депрессивность, пищевое

поведение, половое поведение, сон, обучение (Porova et al., 2017). Известно, что другие классические НТФ, такие как, BDNF и GDNF, модулируют 5-НТ систему, в связи с этим возникает вопрос: способен ли CDNF на то же?

**Цель работы** – изучение роли дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) в процессах нейропластичности, регуляции различных форм поведения, а также его влияния на 5-НТ систему мозга.

**Задачи исследования:**

- 1) Исследовать эффекты внутрижелудочкового введения рекомбинантного белка CDNF на двигательную активность, потребление воды и пищи, длительность сна в условиях домашней клетки, а также оценить когнитивные способности, исследовательское и тревожное поведение у мышей линии C57BL/6. Проанализировать влияние введения CDNF на обмен серотонина в среднем мозге, гиппокампе, фронтальной коре и гипоталамусе, а также оценить в указанных структурах экспрессию ключевых генов 5-НТ системы (ТПГ-2; 5-НТТ; MAOA; 5-НТ<sub>1A</sub>, 5-НТ<sub>2A</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> рецепторы) у мышей линии C57BL/6;
- 2) Оценить у мышей линии C57BL/6 в среднем мозге, гиппокампе, фронтальной коре и гипоталамусе уровни мРНК генов-маркеров стресса эндоплазматического ретикулума (*Atf6*, *Hspa5*, *Eif2ak3*, *Ern1*, *Xbp1*), а также уровни мРНК генов, белков и уровни фосфорилированных форм белков-маркеров нейрональной пластичности c-Fos и CREB после внутрижелудочкового введения CDNF;
- 3) Индуцировать сверхэкспрессию CDNF в нейронах гиппокампа мыши с помощью аденоассоциированной вирусного конструкта и оценить ее эффекты на двигательную активность, потребление воды и пищи, длительность сна и когнитивные способности в условиях домашней клетки, на социальное, исследовательское и тревожное поведение, а также на пространственное обучение и память у мышей линии C57BL/6. Исследовать влияние повышения уровня CDNF на экспрессию ключевых генов 5-НТ системы (ТПГ-2; 5-НТТ; MAOA; 5-НТ<sub>1A</sub>, 5-НТ<sub>2A</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> рецепторы) в гиппокампе у мышей линии C57BL/6;
- 4) Оценить уровни мРНК генов-маркеров стресса эндоплазматического ретикулума (*Atf6*, *Hspa5*, *Eif2ak3*, *Ern1*, *Xbp1*), а также уровни мРНК генов, белков и уровни фосфорилированных форм белков-маркеров нейрональной пластичности c-Fos и CREB в гиппокампе мышей линии C57BL/6 со сверхэкспрессией CDNF.

**Научная новизна.**

В работе впервые показано, что однократная внутрижелудочковая инъекция рекомбинантного белка CDNF мышам, улучшает ассоциативное обучение, оказывает антитревожный эффект. Кроме того, CDNF увеличивает уровень обмена серотонина в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе, снижает уровень мРНК генов основных рецептор

серотониновой системы (*Htr1a* и *Htr7*), увеличивает экспрессию, а также вызывает тенденцию к увеличению уровня фосфорилирования белков, принимающих участие в процессах нейропластичности (с-Fos и CREB) в среднем мозге. Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе вызывает усиление социального интереса у модельных животных, но увеличивает выраженность поведенческого отчаяния, при этом снижая только уровень мРНК *Htr1a*.

### **Теоретическая и научно-практическая ценность работы.**

Результаты данной работы расширяют наши представления об эффектах CDNF, механизмах его действия, выполняемых им функциях в регуляции нормального, не моторного поведения. При этом ключевую роль играет структура введения, а также способ воздействия (экзогенный или эндогенный), от чего эффекты CDNF могут значительно варьироваться. Полученные результаты позволяют рассматривать CDNF не только как потенциальное средство для терапии болезни Паркинсона, но и как средство для коррекции других поведенческих нарушений. Кроме того, данная работа дает новые фундаментальные знания об эффектах и функциях данного НТФ, что несомненно полезно при составлении учебных программ и курсов для студентов ВУЗов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) вовлечен в механизмы регуляции поведения, обучения и процессы нейропластичности у мышей, однако эффекты его воздействия в существенной степени зависят от способа и места введения – экзогенное введение в желудочки мозга или эндогенная сверхэкспрессия белка в гиппокампе.
- 2) Однократное экзогенное введение рекомбинантного белка CDNF в желудочки мозга мышам C57BL/6 снижает их тревожность и выраженность поведенческого отчаяния, а также улучшает ассоциативное обучение, что сопровождается усилением катаболизма серотонина в ключевых структурах мозга, снижением уровня мРНК генов основных серотониновых рецепторов (*Htr1a*, *Htr7*), активацией генов-маркеров стресса эндоплазматического ретикулама (*Hspa5*, *Xbp1*) и повышением уровня фосфорилирования белков с-Fos и CREB, вовлеченных в механизмы регуляции нейропластичности.
- 3) Эндогенная локальная сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе мышей C57BL/6 не влияет на тревожность и когнитивные функции мышей, но усиливает социальный интерес, увеличивая при этом выраженность их поведенческого отчаяния, что не приводит к каким-либо изменениям в экспрессии исследованных генов-маркеров стресса эндоплазматического ретикулама (*Atf6*, *Hspa5*, *Eif2ak3*, *Ern1*, *Xbp1*), белков-маркеров нейрональной пластичности (с-Fos, CREB) а также ключевых генов серотониновой

системы, за исключением гена *Htr1a* рецептора серотонина, уровень мРНК которого снижается.

#### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Высокая степень достоверности полученных результатов обосновывается достаточным объемом экспериментального материала с большим объемом исследованных выборок с применением современных высокотехнологичных молекулярно-генетических методов исследования и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки результатов.

Результаты работы вошли в отчет по гранту РФФИ №19-75-00016, а также представлены на конгрессе CRISPR 2023, конференции BGRS 2022, V Национальном конгрессе по регенеративной медицине, конференции МНСК 2020.

#### **Публикации по теме диссертации.**

Материал диссертации представлен в 6 публикациях, из которых 2 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus) и 4 тезисы конференций.

#### **Личный вклад.**

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, а также подготовке публикаций по материалам работы. Все эксперименты по изучению поведения и определению уровней экспрессии генов и белков, а также вся статистическая обработка полученных данных были проведены лично автором. Создание AAV-конструктов, а также иммуногистохимическое исследование срезов гиппокампа мышей было осуществлено совместно с к.б.н. Ильчибаевой Т.В., анализ ВЭЖХ проводили совместно с к.б.н. Цыбко А.С. Автор выражает благодарность к.б.н. Хоцкину Н.В. за помощь в регистрации поведения экспериментальных животных в условиях домашней клетки с помощью установки Phenomaster.

#### **Благодарности.**

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, чл.-корр. РАН, д.б.н. Науменко В. С. за общее руководство на всех этапах выполнения диссертации, а также сотрудникам лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН, которые помогали в проведении экспериментов и освоении методик: к.б.н. Ильчибаева Т. В., к.б.н. Цыбко А. С.

#### **Структура и объем работы.**

Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (170 источника). Работа содержит 2 таблицы, 2 схемы, 31 рисунков. Общий объем диссертационного исследования составляет 101 страницы.

## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1 Серотониновая система мозга

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) является одним из ключевых нейромедиаторов центральной нервной системы позвоночных, играющим фундаментальную роль в регуляции широкого спектра физиологических процессов. Несмотря на то что серотонинергические нейроны относительно немногочисленны, их влияние на функции мозга трудно переоценить: они участвуют в регуляции настроения, когнитивных функций, обучения и памяти, сна, болевой чувствительности, эмоций и вознаграждения (Dolgacheva et al., 2025). Нарушения серотонинергической передачи лежат в основе патогенеза многих нейропсихиатрических расстройств, включая депрессию, тревожные состояния, шизофрению, мигрень и болезнь Альцгеймера (Dolgacheva et al., 2025; Parajulee and Kim, 2023). Серотониновая система обладает уникальной организацией: небольшое количество тел нейронов, сконцентрированных преимущественно в ядрах шва ствола мозга, посылает проекции практически во все отделы центральной нервной системы, обеспечивая тем самым модуляцию множества нейрональных сетей. Такая архитектура позволяет серотонину выполнять функцию глобального регулятора, интегрирующего активность различных мозговых структур.

Биосинтез серотонина в центральной нервной системе представляет собой двухэтапный ферментативный процесс, лимитируемым звеном которого является доступность незаменимой аминокислоты триптофана, поступающей в организм с пищей. Первый и ключевой этап – гидроксирование L-триптофана – катализируется ферментом триптофангидроксилазой (ТПГ). В ЦНС млекопитающих экспрессируется нейрональная изоформа ТПГ2, тогда как изоформа ТПГ1 преимущественно локализована в энтерохромаффинных клетках кишечника (Nikishin et al., 2012). Активность ТПГ2 определяет общую скорость синтеза нейромедиатора. В результате гидроксирования триптофана образуется промежуточное соединение – 5-гидрокситриптофан (5-НТР). Второй этап включает декарбоксилирование 5-НТР, осуществляемое декарбоксилазой ароматических аминокислот (AAAD, также известной как ДОФА-декарбоксилаза). Данный фермент обладает низкой субстратной специфичностью и участвует в синтезе других биогенных аминов, однако в серотонинергических нейронах его активность направлена на превращение 5-НТР в конечный продукт – серотонин.

После синтеза серотонин накапливается в везикулах пресинаптического окончания с помощью везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, который обеспечивает его концентрацию и последующее экзоцитарное высвобождение в синаптическую щель в ответ на потенциал действия. Основным путем инактивации высвобожденного серотонина является его обратный захват из синаптического пространства в пресинаптическую терминаль,

осуществляемый высокоаффинным и селективным транспортером серотонина SERT (5-HTT). SERT является наиболее мощным регулятором внеклеточной концентрации 5-HT и контролирует как амплитуду, так и продолжительность серотонинергического сигнала (Sargin et al., 2019). Экспрессия VMAT2 и SERT, наряду с TPH2 и AАAD, наблюдается на ранних этапах развития нервной системы, что свидетельствует о важной роли серотонина уже в эмбриогенезе (Nikishin et al., 2012). После обратного захвата серотонин может быть повторно упакован в везикулы или подвергнут ферментативному расщеплению. Ключевую роль в катаболизме серотонина играет фермент моноаминоксидаза А (МАОА), которая окисляет серотонин с образованием 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК). Соотношение концентраций 5-ГИУК и самого нейромедиатора часто используется в экспериментальной нейробиологии как индекс оборота (метаболизма) серотонина в мозге.

Тела серотонинергических нейронов у млекопитающих компактно расположены в ядрах шва (nuclei raphe) ствола мозга. Наиболее крупными и наиболее изученными являются дорсальное ядро шва (DRN, B7) и медианное ядро шва (MRN, B8), расположенные в покрывке среднего мозга. Помимо них, серотонинергические нейроны обнаруживаются в ядре шва pontis (B5), большом ядре шва (B3), бледном ядре шва (B1) и других образованиях продолговатого мозга. Эти ядра образуют две основные группы: ростральную (включающую DRN и MRN) и каудальную (проецирующуюся на ствол мозга и спинной мозг) (Steinbusch et al., 2021).

Дорсальное ядро шва (DRN) представляет собой гетерогенное ядро, расположенное в вентральной и латеральной частях периаквадуктального серого вещества среднего мозга (Steinbusch et al., 2021). DRN обеспечивает серотонинергическую иннервацию множества областей переднего мозга, включая префронтальную кору, стриатум, миндалевидное тело и таламус. Показано, что DRN проецируется преимущественно во фронтальную кору и стриатум. Напротив, медианное ядро шва (MRN) преимущественно иннервирует гиппокамп и септум. Хотя проекции этих двух ядер во многом перекрываются, их различия в терминальных полях и морфологии аксонов указывают на функциональную специализацию. Было высказано предположение о существовании двух анатомически и функционально различных серотонинергических проекций к коре, при этом нейроны DRN, по-видимому, играют ведущую роль в контроле аффективного состояния. Важно подчеркнуть, что DRN и другие ядра шва содержат не только серотонинергические нейроны, но и популяции нейронов, использующих другие нейромедиаторы, включая ГАМК, глутамат, дофамин и норадреналин (Steinbusch et al., 2021). Эта гетерогенность обуславливает сложный характер регуляции серотонинергической системы и её взаимодействия с другими нейромедиаторными системами. Восходящие проекции DRN содержат множество нейротрансмиттеров, что делает это ядро ключевым интегратором сигналов в ЦНС (Steinbusch et al., 2021).

Многообразие физиологических эффектов серотонина обеспечивается существованием обширного семейства рецепторов, которое включает 14 различных подтипов у млекопитающих. За исключением 5-НТ<sub>3</sub>-рецептора, который является лиганд-управляемым ионным каналом, все остальные серотониновые рецепторы относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR) (Parajulee and Kim., 2023). На сегодняшний день признано семь основных семейств рецепторов, которые дополнительно подразделяется на подтипы (5-НТ<sub>1А</sub>, 5-НТ<sub>1В</sub>, 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>1Е</sub>, 5-НТ<sub>1F</sub>; 5-НТ<sub>2А</sub>, 5-НТ<sub>2В</sub>, 5-НТ<sub>2С</sub>; 5-НТ<sub>3</sub>; 5-НТ<sub>4</sub>; 5-НТ<sub>5А</sub>, 5-НТ<sub>5В</sub>; 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>) (Parajulee and Kim., 2023; Chagraoui et al., 2025).

Сигнальные пути, активируемые серотониновыми рецепторами, определяются типом сопряженного G-белка. Рецепторы семейства 5-НТ<sub>1</sub> преимущественно сопряжены с G<sub>i/o</sub>-белками, ингибирующими аденилатциклазу при активации. Это приводит к снижению уровня цАМФ и, как следствие, к уменьшению активности протеинкиназы А (РКА). Рецепторы семейства 5-НТ<sub>2</sub> сопряжены с G<sub>q</sub>-белками, активирующими фосфолипазу С (PLC), что ведет к образованию инозитолтрифосфата (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерола (DAG) с последующей мобилизацией внутриклеточного кальция и активацией протеинкиназы С (PKC). Рецепторы 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> сопряжены с G<sub>s</sub>-белками, стимулирующими аденилатциклазу и повышающими уровень цАМФ (Chagraoui et al., 2025). Рецепторы 5-НТ<sub>3</sub> представляют собой пентамерные катионные каналы, обеспечивающие быструю деполяризацию мембраны и входящий поток ионов Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>.

Помимо классических G-белковых путей, некоторые серотониновые рецепторы (5-НТ<sub>2С</sub>, 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>) способны передавать сигнал через механизмы, не требующие ни G-белков, ни β-аррестинов – двух классических и почти универсальных трансдукторов сигнала GPCR (Voskaert et al, 2021). В частности, для 5-НТ<sub>6</sub>-рецептора показано динамическое взаимодействие с обширной сетью внутриклеточных белков, включая mTOR-киназу, нейрофибромин и Fyn-киназу, что регулирует локализацию, транспорт и сигнальные свойства рецептора (Chagraoui et al., 2025). G-белок-регулируемый индуктор роста нейритов 1 (GPRIN1) взаимодействует с 5-НТ<sub>6</sub>-рецептором независимо от агонистов, усиливая активность рецептора (Chagraoui et al., 2025). Это открывает новые перспективы для фармакологической модуляции серотониновой системы.

Серотонинергическая передача регулируется на нескольких уровнях. На уровне синтеза ключевую роль играет активность ТПГ2, которая, в свою очередь, зависит от доступности триптофана, поступающего через гематоэнцефалический барьер. На уровне высвобождения – частота потенциалов действия и активность везикулярного транспортера VMAT2. На уровне обратного захвата – функциональная активность SERT, которая является главной мишенью антидепрессантов из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС).

Генетические вариации *SLC6A4*, такие как полиморфизм 5-HTTLPR, влияют на экспрессию SERT и ассоциированы с предрасположенностью к депрессии и тревожным расстройствам (Bartova et al., 2022).

Важным регуляторным механизмом также является ауторецепторный контроль. Серотонинергические нейроны экспрессируют на своих сомах и дендритах соматодендритные 5-HT<sub>1A</sub>-ауторецепторы, активация которых подавляет частоту генерации потенциалов действия (отрицательная обратная связь). На пресинаптических терминалях расположены 5-HT<sub>1B</sub> (у грызунов) и 5-HT<sub>1D</sub> (у человека) ауторецепторы, ингибирующие высвобождение серотонина в синаптическую щель. Помимо ауторецепторов, на серотонинергических терминалях присутствуют гетерорецепторы, в том числе  $\alpha_2$ -адренергические, через которые другие нейромедиаторные системы могут модулировать высвобождение 5-HT (Raymond et al., 2001). Это обеспечивает интеграцию серотониновой системы в глобальные регуляторные сети мозга.

Кроме того, серотониновая система тесно взаимодействует с нейротрофическими факторами, в частности с BDNF. Показано, что ось BDNF-SERT-CREB опосредует изменения настроения и когнитивных функций при депрессивных расстройствах и влияет на ответ на терапию (Sargin et al., 2019). Окислительный стресс, цитокины и нейроэндокринные факторы через ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники также модулируют активность SERT и серотонинергическую передачу (Sargin et al., 2019).

Серотониновая система традиционно занимает центральное место в патофизиологии депрессии и тревожных расстройств. Хотя в последние годы ведутся дискуссии о роли серотонина в этиологии депрессии (Bartova et al., 2022), подавляющее большинство данных свидетельствует о её существенной вовлеченности. Критический анализ методологических недостатков обзора, отрицавшего связь между серотонином и депрессией, показал, что этот вывод является чрезмерно упрощенным и основан на избирательности данных и ошибочной интерпретации нейропсихофармакологических результатов (Jauhar et al., 2023). Исследования с деплецией триптофана и молекулярной визуализацией серотонинергической системы подтверждают роль серотонина в патофизиологии депрессии (Jauhar et al., 2023).

Эффективность антидепрессантов из группы СИОЗС, которые повышают внеклеточную концентрацию серотонина путем ингибирования SERT, является наиболее убедительным клиническим доказательством роли серотонина в регуляции настроения. Однако ответ на СИОЗС варьирует между пациентами, что связывают с генетическим полиморфизмом SERT, эпигенетическими изменениями (метилование *SLC6A4*) и взаимодействием со стрессом и воспалением (Sargin et al., 2019).

Помимо депрессии, серотониновая система вовлечена в патогенез тревожных расстройств, обсессивно-компульсивного расстройства (ОКР), панического расстройства,

посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), расстройств пищевого поведения, шизофрении и болезни Альцгеймера (Berger et al., 2009; Chagraoui et al., 2025). При аутизме также показана роль мозговой серотониновой системы как в развитии расстройства, так и в ассоциированных поведенческих нарушениях (Rodnyu et al., 2023). В контексте болезни Альцгеймера серотониновая система вовлечена в патологические процессы, ведущие к развитию заболевания, включая агрегацию  $\beta$ -амилоида и тау-белка (Porova and Naumenko, 2013; Chagraoui et al., 2025). Участие серотонина в регуляции сосудистого тонуса и ангиогенеза также может иметь значение для сосудистых компонентов нейродегенеративных заболеваний.

## **1.2 Структура, роль и функции классических нейротрофических факторов**

### **1.2.1 Семейство нейротрофинов (NGF, BDNF, NT-3, NT-4)**

Нейротрофины – это семейство секретируемых полипептидов, которые играют важнейшую роль в развитии, поддержании и функционировании нервной системы позвоночных. Основы современных представлений о нейротрофической поддержке были заложены открытием фактора роста нервов (NGF) в 1950-х годах, которое продемонстрировало, что выживание нейронов зависит от трофических сигналов, поступающих от клеток-мишеней (Gavioli et al., 2024; Bekinschtein and von Bohlen, 2020). Впоследствии были идентифицированы и другие члены этого семейства, включая нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4/5) (Numakawa and Kajihara, 2025). Помимо своей классической роли в поддержании выживания нейронов в период эмбрионального развития, нейротрофины регулируют широкий спектр процессов и во взрослом организме, включая синаптическую пластичность, рост аксонов и дендритов, а также поддержание дифференцировки нейронов (Samaddar et al., 2025; Numakawa and Kajihara, 2025). Нарушения в работе систем нейротрофинов и их рецепторов лежат в основе многих нейродегенеративных и психических заболеваний, что делает эти белки важными молекулярными мишенями для терапевтических вмешательств (Numakawa and Kajihara, 2025).

Семейство нейротрофинов млекопитающих включает четыре основных белка: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3) и нейротрофин-4 (NT-4) (Ateaque et al., 2023). Все члены семейства синтезируются в виде предшественников – препронейротрофинов, которые после удаления сигнального пептида и про- домена дают начало зрелым формам (Brigadski and Leßmann, 2023). Зрелые нейротрофины обладают высоко консервативной структурой, характеризующейся уникальным мотивом «цистинового узла» (cystine-knot), который обеспечивает исключительную стабильность этих белков во внеклеточной среде и необходим для их димеризации (Ateaque et al., 2023).

Гены нейротрофинов кодируют полипептидные предшественники, включающие сигнальный пептид (пре-домен), пропоследовательность (про-домен) и последовательность зрелого белка. Сигнальный пептид направляет синтезируемый белок в эндоплазматический ретикулум. Про-домен, расположенный на N-конце предшественника, играет важную роль в обеспечении правильного сворачивания и внутриклеточного процессинга нейротрофина (Costa et al., 2018). Удаление про-домена происходит путём протеолитического расщепления по консервативному участку. Ключевую роль в этом процессе играют ферменты семейства пропротеинконвертаз, в частности фурин, а также PC1, PC2, PACE4 и PC5/6-B (Seidah et al., 1996; Brigadski and Leßmann, 2023).

Важно отметить, что пронеуротрофины (непроцессированные формы) и зрелые нейротрофины обладают принципиально различной биологической активностью и взаимодействуют с разными рецепторными системами. В то время как зрелые нейротрофины являются высокоаффинными лигандами для Trk-рецепторов (TrkA, TrkB, TrkC), запуская каскады, способствующие выживанию, росту и дифференцировке нейронов, пронеуротрофины предпочтительно связываются с рецептором p75NTR, часто в комплексе с ко-рецептором сортилином, что приводит к активации сигнальных путей, связанных с апоптозом (Lu et al., 2005; Costa et al., 2018). Эта дихотомия в действии нейротрофинов контролируется протеолитическим расщеплением пронеуротрофинов (Lu et al., 2005). Таким образом, баланс между про- и зрелыми формами нейротрофинов и их рецепторами является критическим фактором, определяющим выживаемость нейронов и пластичность нервной системы. Нарушение этого баланса, в частности увеличение соотношения proBDNF/mBDNF, наблюдается при нормальном старении и связывается с патогенезом нейродегенеративных заболеваний (Bathina et al., 2023).

В физиологических условиях нейротрофины функционируют в виде нековалентно связанных гомодимеров. Димерная конформация имеет критическое значение для рецепторного связывания: димерная структура необходима для связывания с рецептором, так как она позволяет одновременно взаимодействовать с двумя молекулами рецептора и запускать их димеризацию (Ateaque et al., 2023). Лиганд-индуцированная димеризация и активация рецепторов Trk является ключевым событием для инициации внутриклеточной сигнальной трансдукции (Haddad et al., 2017). Важно отметить, что для TrkB рецептора различные нейротрофины (BDNF, NT-4 и NT-3) индуцируют образование димеров TrkB с разной конфигурацией и стабильностью, что может объяснять различия в их сигнальных эффектах (Ahmed et al., 2020). Поверхность димера характеризуется специфическим распределением положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Данный паттерн зарядов является отличительным признаком каждого нейротрофина и определяет его избирательность

связывания с тем или иным Trk-рецептором (Skaper, 2018). Коэволюция нейротрофинов и их Trk-рецепторов привела к формированию специфических контактов через различные аминокислотные остатки в варибельных областях молекулы, что обеспечивает точность лиганд-рецепторных взаимодействий (Lanave et al., 2007; Skaper, 2018). Эта избирательность не является абсолютной: в определенных условиях, например, при высоких концентрациях NT-3, может наблюдаться перекрестная активация TrkB, что указывает на сложный характер лиганд-рецепторных взаимодействий (Haddad et al., 2017; Ateaque et al., 2023).

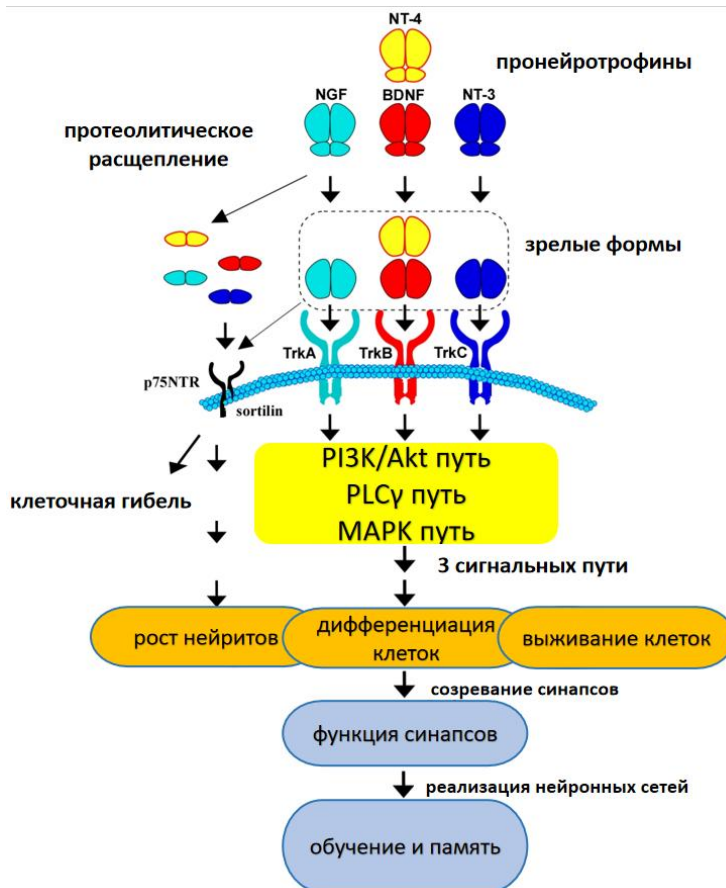


Рис.1 Нейротрофины и их рецепторы в ЦНС.

Экспрессия генов нейротрофинов находится под строгим контролем множества сигнальных путей. Ген *Bdnf* является наиболее изученным примером сложной транскрипционной регуляции (Zhivkovich et al., 2024). У грызунов ген *Bdnf* содержит девять 5'-нетранслируемых экзонов (I–IXa), каждый из которых под контролем собственного промотора, и общий 3'-кодирующий экзон (IX) (Bach et al., 2024). Альтернативное использование этих промоторов даёт начало множеству вариантов мРНК, кодирующих один и тот же белок BDNF, что позволяет клеткам тонко регулировать его экспрессию в пространственно-временном и активность-зависимом контекстах (You and Lu, 2023). Транскрипция некоторых с этих промоторов, в частности промоторы I и IV, усиливается при повышении нейрональной активности (Brigadski and Leßmann, 2023). При этом транскрипты, инициируемые с разных

промоторов, выполняют, по-видимому, различные клеточные функции. Повышение экспрессии варианта *Bdnf I* ассоциировано с изменениями в экспрессии генов, связанных с дендритным ростом и синаптической пластичностью, тогда как активация *Bdnf IV* ведёт к экспрессии генов, участвующих в протеолизе и модуляции поведения (Bach et al., 2024). В частности, селективное повышение уровня *Bdnf I* способствует увеличению плотности шипиков и усложнению дендритного ветвления, тогда как повышение уровня *Bdnf IV* ослабляет экспрессию контекстуального страха (Bach et al., 2024). Кроме того, показано, что индукция *Bdnf I* необходима для вызванной электрошоком дендритной структурной пластичности в нейронах грушевидной коры (Li et al., 2022). Таким образом, BDNF, продуцируемый с этих промоторов, может выполнять уникальные клеточные, синаптические и поведенческие функции (Bach et al., 2024).

Регуляция синтеза нейротрофинов не ограничивается уровнем транскрипции. Посттранскрипционные механизмы играют не менее важную роль. Одним из ключевых примеров является наличие у мРНК *Bdnf* двух различных 3'-нетранслируемых областей (3'UTR). Длинная 3'UTR функционирует как цис-действующий репрессор трансляции в покое, в то время как короткая 3'UTR обеспечивает базальный уровень продукции BDNF. При нейрональной активации этот трансляционный блок снимается (Ruiz et al., 2014). Кроме того, BDNF индуцирует селективную трансляцию ограниченного набора мРНК, демонстрируя высокую степень специфичности в отношении транскриптов. Данная селективность достигается за счет взаимодействия с РНК-связывающими белками и микроРНК, что имеет ключевое значение для трофических функций нейротрофина в пластичности нейронов (Ruiz et al., 2014). Нейротрофины также способны регулировать собственную экспрессию: BDNF может контролировать как транскрипцию, так и трансляцию генов, включая гены, кодирующие другие нейротрофины (Teng et al., 2010).

Синтезированные препронейротрофины подвергаются внутриклеточному транспорту и протеолитическому созреванию. Процессинг пронейротрофинов может происходить как в конститутивном, так и в регулируемом секреторном пути. Удаление пропоследовательности осуществляется специфическими протеазами, включая фурин и пропротеинконвертазы (Chao et al., 2006). Эффективность процессинга зависит от структуры про-домена. Про-домен нейротрофинов также может выполнять самостоятельные регуляторные функции. Например, продомен BDNF способен модулировать квантовую секрецию нейромедиатора в моторных синапсах, действуя через рецептор p75NTR и требуя участия ко-рецептора сортилина (Molchanova et al., 2024).

Биологические эффекты нейротрофинов опосредуются двумя классами рецепторов: высокоаффинными тирозинкиназными рецепторами семейства Trk и низкоаффинным

рецептором p75NTR, который связывает все нейротрофины (von Bohlen und Halbach and Klausch, 2024; Ateaque et al., 2023). Семейство Trk включает три рецептора: TrkA, TrkB и TrkC (Dahiya et al., 2025). Специфичность взаимодействия нейротрофинов с Trk-рецепторами хорошо изучена: NGF является основным лигандом для TrkA, BDNF и NT-4 связываются с TrkB, а NT-3 преимущественно активирует TrkC, хотя в некоторых условиях NT-3 может также активировать TrkA и TrkB (Ateaque et al., 2023). Связывание димера нейротрофина с Trk-рецепторами индуцирует их димеризацию и трансфосфорилирование внутриклеточного киназного домена, что служит пусковым сигналом для нижележащих сигнальных каскадов (Dahiya et al., 2025).

Активация Trk-рецепторов ведёт к запуску трёх основных внутриклеточных сигнальных путей: MAPK/ERK, PI3K/Akt и PLC $\gamma$  (Dahiya et al., 2025). Путь MAPK/ERK активируется через адаптерный белок Shc и комплекс Grb2/SOS, что приводит к последовательной активации киназ Ras, Raf, MEK и ERK. Фосфорилированная ERK транслоцируется в ядро, где регулирует активность транскрипционных факторов, контролирующих пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток. Путь PI3K/Akt инициируется связыванием регуляторной субъединицы p85 PI3K с фосфорилированными тирозиновыми остатками Trk. Активация PI3K приводит к фосфорилированию и активации Akt, который способствует выживанию клеток, фосфорилируя и инактивируя проапоптотические белки (Ali et al., 2024). Путь PLC $\gamma$  активируется при связывании фосфолипазы C $\gamma$  с фосфорилированными тирозинами Trk. PLC $\gamma$  катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP $_2$ ) на инозитолтрифосфат (IP $_3$ ) и диацилглицерол (DAG). IP $_3$  вызывает высвобождение Ca $^{2+}$  из внутриклеточных депо, что, наряду с активацией протеинкиназы C (PKC) под действием DAG, запускает каскады, ведущие к активации транскрипционных факторов (Dahiya et al., 2025).

Рецептор p75NTR является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. В отличие от Trk-рецепторов, p75NTR связывает все нейротрофины, однако наиболее высокое сродство он проявляет к их непроцессированным предшественникам – пронеуротрофинам, что придаёт специфичность сигнализации в зависимости от формы лиганда (Ali et al., 2024). Функциональные исходы активации p75NTR многогранны и зависят от клеточного контекста. В отсутствие Trk-рецепторов p75NTR может инициировать апоптотическую сигнализацию, однако при коэкспрессии с Trk функциональный ответ может меняться на противоположный. Способность p75NTR образовывать гетеродимеры с TrkA, TrkB, TrkC, сортилином или Nogo-рецептором лежит в основе его плеiotропных эффектов (von Bohlen und Halbach and Klausch, 2024).

Активация p75NTR приводит к запуску иных внутриклеточных каскадов, включая NF- $\kappa$ B и JNK. Активация JNK (c-Jun N-terminal kinase) ассоциирована с индукцией апоптоза, в то время как NF- $\kappa$ B может оказывать как про-, так и антиапоптотическое действие в

зависимости от клеточного контекста (Ali et al., 2024). В целом, сигналы, исходящие от Trk-рецепторов, поддерживают выживание, рост и синаптическую пластичность, тогда как сигналы, генерируемые p75NTR, в отсутствие Trk могут индуцировать апоптоз и ослаблять рост нейритов. Перекрёстные взаимодействия между этими двумя рецепторными системами, а также образование рецепторных комплексов с различными ко-рецепторами, определяют конечный биологический ответ клетки на нейротрофины (von Bohlen und Halbach and Klausch, 2024; Ateaque et al., 2023).

Несмотря на огромный прогресс в понимании молекулярных механизмов действия нейротрофинов, их терапевтический потенциал в клинической практике остается реализованным лишь частично. Основными препятствиями являются сложности доставки белков через гематоэнцефалический барьер, их низкая стабильность и быстрое выведение из организма. Перспективными направлениями являются разработка низкомолекулярных миметиков нейротрофинов, агонистов Trk-рецепторов, а также использование биоматериалов для направленной доставки (Houlton et al., 2019; Miranda-Lourenço et al., 2020).

### **1.2.2 Семейство глиального нейротрофического фактора (GDNF, NRTN, ARTN, PSPN)**

Семейство глиального нейротрофического фактора (GDNF) является вторым по значимости семейством нейротрофических факторов после нейротрофинов и играет критическую роль в развитии, выживании и поддержании различных популяций нейронов центральной и периферической нервной системы. GDNF был впервые идентифицирован в 1993 году как секретируемый продукт линии глиальных клеток B49 крысы, стимулирующий выживание и дифференцировку дофаминергических нейронов среднего мозга, что сразу привлекло внимание к его потенциальному применению при болезни Паркинсона (Barker et al., 2024). Впоследствии были открыты три родственных белка: нейтурин (NRTN), артемин (ARTN) и персефин (PSPN), которые вместе с GDNF образуют семейство лигандов GDNF (GFL) (Mol et al., 2023).

Сигнальный путь GDNF/RET имеет решающее значение для развития и поддержания центральной и периферической нервной системы, морфогенеза почек, сперматогенеза и выживания дофаминергических нейронов (Mol et al., 2023; Barker et al., 2024). Дисрегуляция этой сигнальной системы связана с патогенезом различных заболеваний, включая нейродегенеративные расстройства (болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз), рак щитовидной железы и легкого, а также хроническую болезнь почек (Kim et al., 2025; Mol et al., 2023).

GDNF, NRTN, ARTN и PSPN являются секретируемыми димерными белками, которые относятся к надсемейству трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Все члены семейства

синтезируются в виде предшественников – препро-GFL, включающих сигнальный пептид, пропоследовательность и зрелый домен. Зрелые GFL обладают высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей и имеют сходную третичную структуру, характеризующуюся мотивом «цистинового узла» (Ibáñez and Andressoo, 2017). Ключевой структурной особенностью GFL является наличие трех консервативных внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые формируют компактный и стабильный «цистиновый узел» – характерную черту всех членов суперсемейства TGF- $\beta$  (Ibáñez and Andressoo, 2017). Дисульфидные связи у GDNF образуются между остатками цистеина в положениях 41-102, 68-131 и 72-133. Помимо внутримолекулярных связей, зрелые GFL образуют нековалентные гомодимеры, хотя в некоторых случаях, например, для GDNF, также присутствует межпочечная дисульфидная связь, соединяющая две мономерные субъединицы (Ibáñez and Andressoo, 2017).

В 2023 году была опубликована кристаллическая структура декамерного комплекса GDNF-GFR $\alpha$ 1, которая выявила уникальную архитектуру сборки, состоящую из двух пентамеров GFR $\alpha$ 1, соединенных пятью димерами GDNF (Goodman et al., 2023). Данная работа показала, что комплекс GDNF-GFR $\alpha$ 1 способен поддерживать синаптическую клеточную адгезию независимо от RET, а белки RET и гепарансульфат (HS) конкурируют за интерфейс адгезии, предотвращая формирование адгезивного комплекса в пользу трофической сигнализации (Goodman et al., 2023).

Как и нейротрофины, GFL синтезируются в виде препро-белков, содержащих N-концевой сигнальный пептид, направляющий белок в эндоплазматический ретикулум, и пропоследовательность, которая удаляется в процессе внутриклеточного транспорта. Пропоследовательность играет важную роль в правильном сворачивании зрелого белка и обеспечении его последующего процессинга. Удаление пропоследовательности осуществляется специфическими пропротеин конвертазами, включая фурин, и необходимо для образования биологически активного зрелого димера (Ibáñez and Andressoo, 2017).

Экспрессия гена *GDNF* находится под контролем сложных транскрипционных механизмов. Человеческий ген *GDNF* содержит промотор, содержащий TATA-бокс, предшествующий экзону 1, а также три экзона и триплетный повтор в 3'-нетранслируемой области (3'UTR) (Grimm et al., 1998). Альтернативный сплайсинг генерирует несколько вариантов транскриптов, что позволяет клеткам тонко регулировать экспрессию *GDNF* в зависимости от тканеспецифических и развивающихся сигналов (Lahiri, 2024). Транскрипция *GDNF* регулируется разнообразными внеклеточными сигналами. Показано, что тестостерон усиливает экспрессию *GDNF* в клетках глиомы и астроцитах, что способствует пролиферации, миграции и инвазии клеток глиомы через *GDNF*-опосредованную нейровоспалительную

передачу сигнала (Kanwore et al., 2023). Кроме того, дофамин регулирует секрецию GDNF в толстой кишке через холинергические механизмы, при этом низкие концентрации дофамина стимулируют секрецию GDNF через D1-рецепторы, тогда как высокие концентрации подавляют ее через D2-рецепторы (Zhang et al., 2023). Важную роль в регуляции экспрессии GFL играют также эпигенетические механизмы. Например, употребление алкоголя изменяет метилирование промотора GDNF и, как следствие, уровень экспрессии GDNF у крыс (Maier et al., 2020). 3'-Нетранслируемые области (3'UTR) мРНК GDNF модулируют уровень экспрессии гена, регулируя стабильность мРНК и эффективность трансляции. Отрицательные регуляторные элементы в 3'UTR GDNF способны подавлять экспрессию белка, что предотвращает гиперэкспрессию GDNF в физиологических условиях (Maier et al., 2020). Нокдаун этих элементов приводит к повышению уровня GDNF, что может иметь терапевтическое значение (Lahiri, 2024).

После синтеза в эндоплазматическом ретикулуме препро-GFL транспортируются в аппарат Гольджи, где происходит протеолитическое удаление пропоследовательности и гликозилирование. Зрелые GFL затем упаковываются в секреторные везикулы и высвобождаются во внеклеточное пространство конститутивным или регулируемым путем. Важным аспектом регуляции активности GFL является их способность к образованию градиента концентрации в тканях. GDNF действует как хемоаттрактант для аксонов дофаминовых нейронов, экспрессирующих RET, и способен привлекать эти аксоны на расстояние, в семь раз превышающее дистанцию, на которую их привлекают другие сигналы (Montaño-Rodríguez et al., 2024).

В отличие от нейротрофинов, которые взаимодействуют со своими рецепторами напрямую, GFL используют уникальную двухкомпонентную рецепторную систему, состоящую из гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанных корецепторов семейства GFR $\alpha$  (GDNF family receptor alpha) и сигнального рецепторного тирозинкиназного рецептора RET (rearranged during transfection) (Mol et al., 2023). Каждый из четырех GFL обладает избирательной аффинностью к определенному корецептору GFR $\alpha$ : GDNF связывается с GFR $\alpha$ 1, NRTN с GFR $\alpha$ 2, ARTN с GFR $\alpha$ 3 и PSPN с GFR $\alpha$ 4 (Mol et al., 2023). GFR $\alpha$ 1 также может взаимодействовать с другими GFL с более низкой аффинностью. Структурные исследования показали, что GFR $\alpha$ 1 обладает тремя внеклеточными доменами (D1–D3). Домен D3 играет ключевую роль в связывании GDNF и активации RET (Leppänen et al., 2017). RET является рецепторной тирозинкиназой, которая служит общим сигнальным компонентом для всех GFL (Mol et al., 2023). RET активируется после связывания комплекса GFL-GFR $\alpha$  с внеклеточными доменами RET, что индуцирует димеризацию и трансфосфорилирование внутриклеточного тирозинкиназного домена. Ключевым остатком в передаче сигнала является тирозин 1062 (Tyr1062), фосфорилирование

которого служит док-сайтом для множества адаптерных белков, запускающих различные внутриклеточные каскады (Carlomagno et al., 2024). RET также может активироваться при образовании генетических транслокаций и точечных мутаций, что играет важную роль в онкогенезе, в частности, при раке щитовидной железы и немелкоклеточном раке легкого (Carlomagno et al., 2024; Mol et al., 2023). Активация RET приводит к запуску трех основных внутриклеточных сигнальных каскадов, которые частично перекрываются с путями, активируемыми Trk-рецепторами: MAPK/ERK, PI3K/Akt и PLC $\gamma$ . Молекулярная карта сигнального пути GDNF/RET, разработанная в 2023 году, включает 1151 молекулярную реакцию, включая 52 события молекулярной ассоциации, 70 событий ферментативного катализа, 36 событий активации/ингибирования, 22 события транслокации, 856 событий регуляции генов и 115 событий экспрессии на уровне белка (Mol et al., 2023).

Помимо классического пути через RET, GFL способны передавать сигнал через альтернативные механизмы. Наиболее изученным RET-независимым путем является взаимодействие комплекса GFL-GFR $\alpha$  с нейтральной молекулой клеточной адгезии NCAM (neural cell adhesion molecule) (Goodman et al., 2023). Активация NCAM комплексом GDNF-GFR $\alpha$ 1 стимулирует рост нейритов и выживание нейронов через активацию киназ Fyn и FAK. Кроме того, комплекс GDNF-GFR $\alpha$ 1 способен опосредовать синаптическую клеточную адгезию независимо от RET, что было подтверждено в исследовании 2023 года с использованием криоэлектронной томографии (Goodman et al., 2023). Гепарансульфат-протеогликаны, в частности синдекан-3, также выступают в качестве альтернативных рецепторов для GFL, что особенно важно в контексте развития коры головного мозга (Bespalov et al., 2011; Goodman et al., 2023).

GDNF является одним из наиболее мощных нейротрофических факторов для дофаминергических нейронов черной субстанции (SNpc). Корцепторный комплекс GFR $\alpha$ 1-RET экспрессируется всеми дофаминергическими нейронами SNpc и необходим для выживающих эффектов GDNF (Barker et al., 2024). Двукратное повышение экспрессии GDNF в нативно экспрессирующих клетках увеличивает оборот дофамина и максимизирует нейропротекторные и благоприятные моторные эффекты, минимизируя гипердофаминергию (Barker et al., 2024). GDNF также играет важную роль в выживании мотонейронов спинного мозга, что делает его потенциальным терапевтическим агентом при боковом амиотрофическом склерозе (Stansberry et al., 2023).

Сигнальный путь GDNF/RET необходим для морфогенеза почек. GDNF, секретируемый метанефрической мезенхимой, индуцирует ветвление мочеточного зачатка через активацию RET на его поверхности. Кроме того, GDNF обладает антифибротическими и антиапоптотическими свойствами в почках и может ослаблять почечный фиброз через

ингибирование воспалительных путей (Kim et al., 2025). Дисрегуляция сигнального пути GDNF/RET связана с развитием множества злокачественных новообразований. Транслокации и точечные мутации RET являются драйверными событиями при медуллярном раке щитовидной железы и немелкоклеточном раке легкого (Carlomagno et al., 2024). Полиморфизм G691S RET усиливает GDNF-индуцированную инвазию клеток рака поджелудочной железы через амплификацию сигнального пути MAPK (Hogan et al., 2017). Тестостерон также может способствовать росту опухолей головного мозга через GDNF-опосредованную нейровоспалительную сигнализацию (Kanwore et al., 2023). Сигнальный путь GDNF/RET необходим для самообновления сперматогониальных стволовых клеток. GDNF, секретируемый клетками Сертоли, активирует RET на сперматогониях и способствует поддержанию пула сперматогониальных стволовых клеток (Kaneyasu et al., 2023).

Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярных механизмов действия GFL, их терапевтическое применение остается ограниченным. В клинических испытаниях рекомбинантного GDNF при болезни Паркинсона были достигнуты лишь ограниченные успехи, что, вероятно, связано с отсутствием жизнеспособных рецепторных мишеней на поздних стадиях нейродегенерации (Marshall, 2023). Перспективными направлениями являются разработка методов оптимальной пространственной и количественной регуляции GDNF, использование генной терапии (AAV-GDNF) и поиск низкомолекулярных агонистов RET.

### 1.3. Современные представления о структуре и функциях CDNF

#### 1.3.1 Строение CDNF

CDNF представляет собой небольшой секретируемый белок (18 кДа, 187 аминокислот), который вместе с MANF образует отдельное семейство нейротрофических факторов. По первичной структуре CDNF на 59% идентичен MANF, но не имеет гомологии с классическими НТФ, такими как NGF, BDNF или GDNF (Parkash et al., 2009). Гены, кодирующие MANF и CDNF, у человека называются *MANF* и *CDNF*, соответственно. Ген, кодирующий CDNF, консервативен среди позвоночных (будь то мышь, человек или *Danio rerio*), которые имеют его ортологи (Lindholm et al., 2007; Chen et al 2020). В то же время беспозвоночные, такие как плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, круглый червь *Caenorhabditis elegans* и губка *Suberites domuncula* имеют лишь один ортологичный ген *Manf/Cdnf* (Lindström et al., 2013; Sereno et al., 2017; Richman et al., 2018).

В отличие от большинства НТФ, CDNF не требует протеолитического удаления пропоследовательности: он синтезируется с коротким сигнальным пептидом (26 аминокислот), который обеспечивает его транспорт в эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и там

отщепляется. Структурно в CDNF выделяют глобулярный N-концевой домен и неструктурированный С-концевой фрагмент, соединённые гибким линкером (Parkash et al., 2009; Hellman et al., 2010a). N-концевой участок содержит сапозин-подобный (SAPLIP) домен. Белки, несущие такой домен (например, гранулизин, НК-лизин), способны связываться с мембранными липидами. Интересно, что MANF, обладая SAPLIP-доменом, взаимодействует с сульфатидом – липидом, экспонированным на внеклеточной поверхности мембраны и присутствующим во внеклеточной жидкости. CDNF же, несмотря на высокое структурное сходство с MANF, не связывает сульфатид (Bai et al., 2018). Замена лизина на лейцин в позиции 122 человеческого MANF (у CDNF в этой позиции лейцин) критически снижает аффинность к сульфатиду. В то же время есть указания на участие CDNF в липидном обмене у *Drosophila* (Palgi et al., 2012). Возможно, CDNF взаимодействует с иным набором липидов или делает это в других условиях (например, при изменении pH). Эти различия могут отражать функциональную специализацию двух родственных белков.

MANF лучше изучен в контексте гликозилирования. Например, MANF содержит сайты N-гликозилирования, которые могут влиять на его внутриклеточную локализацию (Lindholm and Saarna, 2022). Для CDNF данное явление менее изучено. Человеческий CDNF содержит N-связанный и O-связанный сайты гликозилирования (Sun et al., 2011). Исследования показывают, что гликозилирование CDNF не требуется для его секреции или проявления нейропротекторной активности. Например, мутантные формы CDNF без возможности гликозилирования сохраняют способность защищать дофаминовые нейроны в моделях болезни Паркинсона (Lindholm et al., 2007; Sun et al., 2011). Основные структурные и функциональные особенности CDNF связаны с его доменами (SAPLIP и SAP-доменом) и способностью регулировать стресс ЭПР.

В молекуле CDNF присутствуют два мотива CXXC (цистеин-X-X-цистеин): один на N-конце, другой – на С-конце (Parkash et al., 2009). Такие мотивы типичны для дисульфидизомераз – ферментов, обеспечивающих правильное сворачивание белков в ЭПР (Appenzeller-Herzog and Ellgaard, 2008). Однако ни CDNF, ни MANF не проявляют оксидоредуктазной активности, тем не менее С-концевой CXXC-мотив необходим для их цитопротекторных функций. Показано, что аналогичный мотив у MANF помогает ему работать как шаперон, способствуя правильной укладке белков в ЭПР (Arrieta et al., 2020); для CDNF предполагается сходная роль.

С-концевая область CDNF содержит SAP-подобный домен (SAF-A/B, Acinus, PIAS). Классические SAP-домены обычно опосредуют связывание с нуклеиновыми кислотами, но у CDNF этот домен эволюционировал для белок-белковых взаимодействий внутри ЭПР. Известно, что SAP-подобный домен MANF связывается с субъединицей p65 транскрипционного фактора NFκB (Chen et al., 2015), а также с шапероном BiP/GRP78 в его

АДФ-связанной форме, препятствуя обмену нуклеотидов и тем самым модулируя активность BiP (Yan et al., 2019). Для CDFN показано, что его SAP-подобный домен взаимодействует с шаперонами ЭПР, в частности с GRP78/BiP, что способствует восстановлению гомеостаза при стрессе ЭПР (Lindholm et al., 2016; Tang et al., 2017). Делеция или мутации в этом домене нарушают способность CDFN снижать уровень проапоптотического фактора CHOP и подавлять активацию JNK и каспаз.

Наиболее интересной особенностью CDFN является его частично неструктурированный С-конец, несущий сигнал удержания в ЭПР (ER retention sequence, ERS). Классический ERS представляет собой тетрапептид KDEL (лизин-аспарагин-глутамин-лейцин), который узнаётся KDEL-рецепторами и обеспечивает возврат белков из аппарата Гольджи в ЭПР (Mei et al., 2017). У CDFN вместо KDEL присутствует последовательность KTEL (лизин-тирозин-глутамин-лейцин). Этого мотива достаточно для эффективной ретенции в ЭПР в физиологических условиях (Henderson et al., 2013). KTEL-последовательность играет ключевую роль в регуляции секреции CDFN: при стрессе ЭПР, особенно связанном с истощением кальция, CDFN может высвобождаться из клетки (Trychta et al., 2018). Удаление ERS приводит к конститутивной секреции CDFN и утрате защитного эффекта против индуктора стресса ЭПР тапсигаргина (Arancibia et al., 2018).

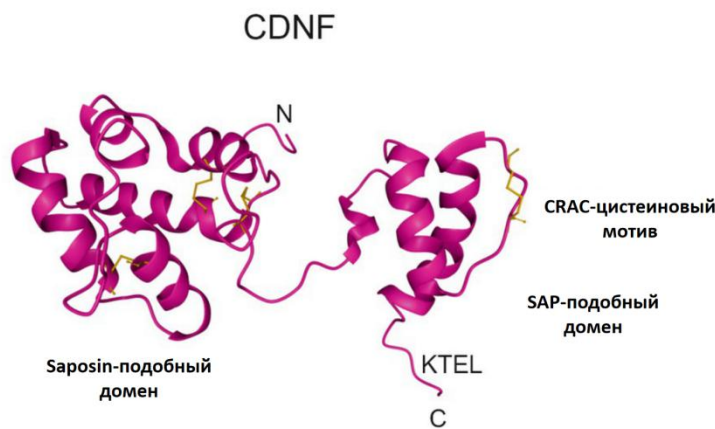


Рис. 2 ЯМР-спектроскопическая структура CDFN в растворе с ключевыми мотивами.

Важно отметить, что несмотря на структурное родство CDFN и MANF, их физиологические роли существенно различаются. Нокаут *Manf* у мышей приводит к тяжёлым нарушениям развития, инсулин-зависимому диабету, хроническому воспалению и фиброзу печени (Lindahl et al., 2014; Sousa-Victor et al., 2019). Напротив, мыши с делецией *Cdnf* жизнеспособны, фертильны, имеют нормальную продолжительность жизни и не демонстрируют явных аномалий в развитии и метаболизме (Lindahl et al., 2020). Из этого следует, что не только структура, но и функции CDFN не сводимы к таковым у MANF, и рассматривать биологию CDFN исключительно путем экстраполяции с MANF, было бы

ошибкой. Тем не менее, представления о функциях, выполняемых CDNF, сформировались в значительной степени под влиянием исследований MANF.

### 1.3.2 Цитопротекторные свойства CDNF

#### 1.3.2.1 Участие CDNF в стрессе ЭПР

Эндоплазматический ретикулум отвечает за синтез липидов, хранение кальция и созревание секреторных белков. Различные повреждающие воздействия (гипоксия, окислительный стресс, нарушение гомеостаза кальция) могут приводить к накоплению неправильно свернутых белков в просвете ЭПР – состоянию, известному как стресс ЭПР (Schwarz et al., 2016). В ответ на это клетка активирует защитную программу – реакцию на развернутые белки (unfolded protein response, UPR). UPR запускается тремя трансмембранными сенсорами: PERK, ATF6 и IRE1 $\alpha$ . В норме эти сенсоры связаны с шапероном GRP78 (BiP) и находятся в неактивном состоянии. При стрессе GRP78 диссоциирует от сенсоров, что приводит к их активации: PERK фосфорилирует eIF2 $\alpha$ , снижая общую трансляцию, но избирательно увеличивая синтез шаперонов и факторов антиоксидантной защиты; ATF6 перемещается в аппарат Гольджи, где расщепляется, и его активный фрагмент действует как транскрипционный фактор, индуцируя экспрессию шаперонов и компонентов ERAD; IRE1 $\alpha$  активирует сплайсинг мРНК *Xbp1*, и образующийся белок XBP1s стимулирует транскрипцию генов, участвующих в деградации неправильно свернутых белков и фолдинге (Hetz, 2012; Walter and Ron, 2007).

Хроническая или чрезмерная активация UPR может приводить к апоптозу и рассматривается как важный патогенетический фактор при нейродегенеративных заболеваниях, диабете и раке (Brown and Naidoo, 2012; Ghemrawi and Khair, 2020).

Сегодня считается, что MANF является одним из генов-маркеров UPR, наряду с GRP78, PERK и XBP1 (Jäntti and Harvey, 2020), так как его экспрессия усиливается в ответ на обработку клеток туникамицином – препаратом, вызывающим нарушение протеостаза в ЭПР (Mizobuchi et al., 2007), или при индукции стресса ЭПР с помощью фолдинг-дефектных пептидов (Bergmann et al., 2018). Рассматривать же *Cdnf* в качестве гена-маркера UPR пока преждевременно. Имеется только одна работа, в которой было показано усиление экспрессии CDNF в первичной культуре нейронов в ответ на индуктор стресса ЭПР туникамицин (Zhang et al., 2018). Вместе с тем, исследования по генетическому взаимодействию, проведенные у *D. melanogaster* и *C. elegans*, имеющих один *Manf/Cdnf* гомолог, подтвердили, что путь IRE1 $\alpha$ /XBP1 вовлечен в транскрипционную регуляцию *Manf* и *Cdnf* (Lindström et al., 2013; Hartman et al., 2019). Кроме

того, секреция CDNF, как и MANF, снижается в ответ на сверхэкспрессию GRP78 и KDEL рецептора *in vitro* (Norisada et al., 2016).

Все эти данные указывают на фундаментальное сходство механизмов, регулирующих экспрессию и секрецию CDNF и MANF. Поэтому можно ожидать, что с поступлением новых данных, *Cdnf* также займет место в числе генов-маркеров UPR.

Каким образом CDNF модулирует UPR? Предполагается, что он действует по аналогии с MANF: связывается с GRP78/BiP и стабилизирует его взаимодействие с сенсорами UPR, предотвращая их преждевременную активацию (Huttunen and Saarna, 2019; Jäntti and Harvey, 2020). В ряде работ показано, что CDNF подавляет стресс ЭПР. Например, на модели болезни Альцгеймера CDNF уменьшал вызванную  $\beta$ -амилоидом активацию UPR в гиппокампе (Zhou et al., 2016); аналогичный эффект наблюдался в дофаминергических нейронах при обработке 6-ОНДА (Voutilainen et al., 2017). Однако есть и данные, указывающие на более тонкую регуляцию. В клетках HEK293 и первичных нейронах сверхэкспрессия CDNF, напротив, повышала уровни некоторых маркеров UPR, но одновременно снижала апоптоз и гибель клеток, вызванную тапсигаргином (Arancibia et al., 2018). Это позволяет предположить, что CDNF не просто выключает UPR, а модулирует его, сдвигая баланс в сторону адаптивных, про-выживающих реакций. Умеренная активация UPR может быть даже полезной, поскольку через ATF6 и XBP1 индуцируются шапероны, восстанавливающие протеостаз.

### **1.3.2.2 Антиапоптотические свойства CDNF**

Апоптоз – ключевой механизм гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях (Radi et al., 2014). Стресс ЭПР существенно повышает чувствительность клеток к апоптотической гибели (Hetz and Papa, 2018). CDNF способен предотвращать апоптоз не только за счёт подавления стресса ЭПР, но и путём прямого воздействия на компоненты апоптотического каскада. Например, на линии PC12, обработанной 6-ОНДА, добавление рекомбинантного CDNF дозозависимо повышало выживаемость, увеличивало соотношение Bcl-2/Bax и снижало активность каспазы-3 (Mei and Niu, 2014). Точный механизм этого эффекта неизвестен, но определённые параллели можно провести с MANF. С-концевой домен MANF гомологичен SAP-домену белка Ku70, который, как сообщалось, ингибирует проапоптотический белок Bax (Sawada et al., 2003; однако эта статья позже была отозвана). Искусственно синтезированный С-концевой фрагмент MANF защищал нейроны от Bax-индуцированного апоптоза (Hellman et al., 2011b). Хотя прямое связывание MANF с Bax впоследствии не подтвердилось (Matlik et al., 2015), структурное сходство С-концов MANF и CDNF оставляет возможность, что CDNF может взаимодействовать с проапоптотическими белками иным образом.

### 1.3.2.3 Противовоспалительные эффекты CDNF

Многочисленные исследования указывают на способность CDNF ослаблять воспалительные реакции. В первичной культуре астроцитов крысы обработка туникамицином увеличивала продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL-6; сверхэкспрессия CDNF в этих клетках перед стрессом снижала цитокиновый ответ (Cheng et al., 2013). В микроглии, активированной липополисахаридом (LPS), экспрессия CDNF возрастала, а добавление рекомбинантного белка уменьшало синтез PGE2 и IL-1 $\beta$ , а также снижало токсичность. Эти эффекты сопровождалось снижением фосфорилирования JNK (Zhao et al., 2014). В другой работе показано, что CDNF в микроглии, обработанной LPS, подавляет сигнальный путь АКТ/FoxO1/mTOR и уменьшает секрецию TNF $\alpha$  (Zhang et al., 2019). В модели болезни Паркинсона (введение 6-ОНДА в чёрную субстанцию крыс) сверхэкспрессия CDNF ослабляла нитрозативный стресс, глиоз и продукцию IL-6, хотя уровни TNF $\alpha$  и IL1 $\beta$  не изменились (Nadella et al., 2014). Таким образом, противовоспалительное действие CDNF многогранно и не ограничивается простым подавлением цитокинов.

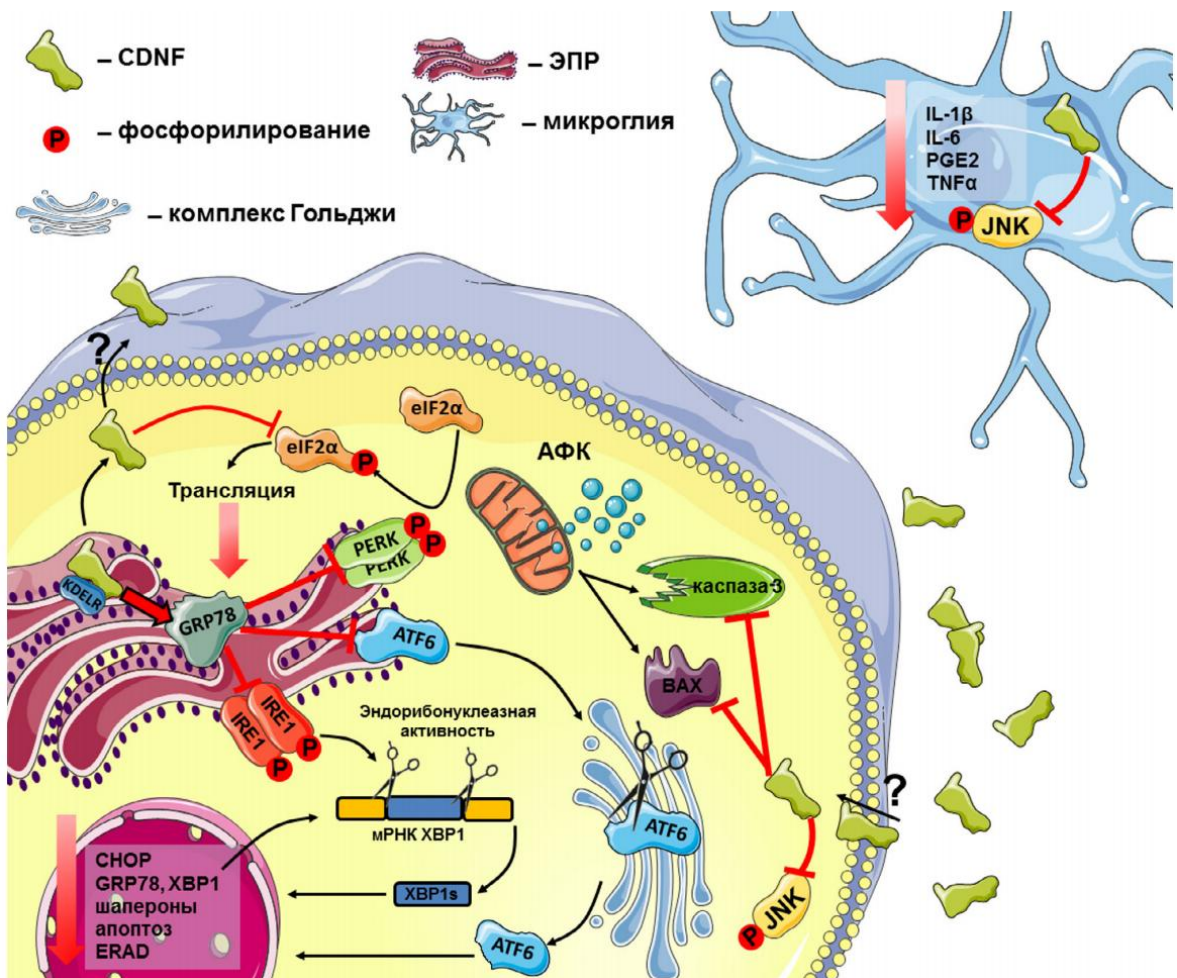


Рис.3 В физиологических условиях белок GRP78 находится в связанном состоянии с сенсорами реакции на развернутые белки (UPR) – ATF6, IRE1 и PERK, тем самым удерживая их в неактивной форме. При развитии стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) происходит отсоединение GRP78 от этих

сенсоров, что запускает их активацию. Активированный ATF6 перемещается в аппарат Гольджи, где подвергается протеолитическому расщеплению. Образовавшийся активный фрагмент действует как транскрипционный фактор, стимулируя экспрессию генов шаперонов (включая GRP78), проапоптотического фактора CHOP, белка XBP1, а также других регуляторов апоптоза. IRE1 активируется за счет димеризации и последующего транс-аутофосфорилирования. Его цитоплазматический домен, обладающий эндорибонуклеазной активностью, вырезает интрон из транскрипта XBP1, что приводит к синтезу укороченной формы XBP1s. Этот белок также выполняет функцию транскрипционного фактора, запуская экспрессию генов, участвующих в деградации неправильно свернутых белков ЭПР (ERAD), а также генов шаперонов. PERK, активируясь, образует димеры и фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 $\alpha$ , что вызывает общее подавление синтеза белка в клетке. Предполагается, что CDNF внутри ЭПР связывается с GRP78, стабилизируя его и предотвращая диссоциацию от ATF6, IRE1 и PERK. В результате эти сенсоры не активируются, и описанные выше сигнальные пути не запускаются. В случае, когда рецептор KDEL (KDELR) не удерживает CDNF в ЭПР, белок переходит в секретируемую форму и, оказавшись в цитоплазме, препятствует фосфорилированию eIF2 $\alpha$ . Кроме того, свободный CDNF, предположительно напрямую, связывается с эффекторами апоптоза, BAX и каспазой-3, и ингибирует их активность. CDNF также может выделяться во внеклеточное пространство, однако точный механизм его взаимодействия с мембранными липидами пока остается неизвестным. В микроглиальных клетках CDNF блокирует киназу JNK, что подавляет экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2, TNF $\alpha$ ), обеспечивая тем самым противовоспалительный эффект. Важно отметить, что блокада JNK может происходить также в астроцитах и нейронах.

### 1.3.3 Участие CDNF в созревании и поддержании нейротрансмиттерных систем

С момента открытия CDNF рассматривается прежде всего как фактор, защищающий дофаминергические нейроны – это отражено в его названии. И действительно, CDNF эффективно защищал и восстанавливал функции ДА нейронов во многих моделях БП (Tang et al., 2017), а недавно было показано, что аналогичную функцию CDNF выполняет и в модели болезни Хантингтона (Stepanova et al., 2020). Экспрессия CDNF, как и многих ключевых генов дофаминовой системы, изменилась у мышей во время длительного космического полета на биоспутнике Бион-М1 (Tsybko et al., 2015; Porova et al., 2015), что косвенно свидетельствует о его участии в адаптации ДА нейронов к условиям микрогравитации. У мышей с нокаутом *Cdnf* не наблюдается потери дофаминовых нейронов в чёрной субстанции, но выявлены возрастные нарушения функции дофаминовой системы: изменена работа дофаминового транспортера, повышена чувствительность к D-амфетамину, а также усилена секреция дофамина в стриатуме (Lindahl et al., 2020). Кроме того, у этих мышей снижена экспрессия тирозингидроксилазы и дофаминового транспортера в нейронах подслизистого сплетения тонкого кишечника, а число таких нейронов с возрастом уменьшается (Chalazonitis et al., 2020). Интересно, что в одном

исследовании была обнаружена ассоциация между развитием БП в позднем возрасте и полиморфизмом rs7094179 в гене *CDNF* (Choi et al., 2011), хотя данный полиморфизм, по мнению авторов исследования, вероятно не функционален.

Последние данные указывают на то, что эффекты *CDNF* могут не ограничиваться исключительно дофаминовой системой. Так, у *Cdnf*<sup>-/-</sup> мышей в подслизистой области тонкого кишечника обнаружено существенное снижение числа нейронов экспрессирующих NO синтазу (nNOS) и белок, связанный с геном кальцитонина (calcitonin gene-related protein; CGRP), а также ГАМК-ергических нейронов (Chalazonitis et al., 2020).

Рыбы *Danio rerio* с нокаутом гена *cdnf* отличались гиперактивностью и нарушениями в поведении, связанном с тревогой, социальными предпочтениями и сплоченностью стаи (Chen et al., 2020). У этих животных также наблюдались сниженная коммуникабельность и повышенная восприимчивость к припадкам, которые могут быть связаны с дефицитом сразу нескольких нейромедиаторных систем, включая ДА, ГАМК-ергические и гистаминергические нейроны. Хотя уровень дофамина в головном мозге не изменился, у рыб с дефицитом *CDNF* были выявлены отклонения в группировке ДА нейронов в кластеры. Одновременно с этим было снижено число гистаминовых нейронов, окружающих ДА нейроны. Аномально низкое количество ГАМК-ергических нейронов было обнаружено в гипоталамусе, а экспрессия глутаматдекарбоксилазы была снижена во всем мозге рыб с нокаутом *CDNF* (Chen et al., 2020). Эти наблюдения позволяют предположить, что *CDNF* выступает в роли более общего модулятора, регулирующего нейрогенез и созревание различных медиатор-специфических популяций нейронов на протяжении развития и во взрослом состоянии. (Chalazonitis et al., 2020). Интересно, что *CDNF* способен активировать сигнальный путь PI3K-Akt как *in vitro*, так и *in vivo*, причём этот эффект аддитивен с действием GDNF (Voutilainen et al., 2017). Поскольку указанный сигнальный путь является необходимым компонентом процесса долговременной потенциации (Man et al., 2003; Sui et al., 2008), можно предположить, что *CDNF* принимает самое активное участие в процессах нейропластичности связанных с обучением и памятью. Например, сверхэкспрессия белка *CDNF* в гиппокампе приводит к более динамичному пространственному обучению (Каминская и др., 2023). Кроме того, есть и другие косвенные сведения. *CDNF* подавляет апоптоз через снижение уровня СНОР и каспаз, что частично совпадает с эффектами активации PI3K/Akt (например, ингибирование проапоптотических белков Bad, Bax). *CDNF* усиливает активность Nrf2 (антиоксидантный путь), который может перекрестно взаимодействовать с PI3K/Akt, но это не доказано для *CDNF*. В моделях болезни Альцгеймера *CDNF* улучшает синаптическую пластичность, что иногда связано с Akt-опосредованным синтезом белков, однако прямая связь не установлена (Kemppainen et al., 2015).

Считается, что CDNF начинает выполнять свои функции лишь в критических условиях, как например, стресс ЭПР, когда перед клеткой встает вопрос: пойти по пути апоптоза или выжить (Kemppainen et al., 2015). Несмотря на значительные структурные особенности и уникальный механизм действия, функционально CDNF гораздо ближе к классическим НТФ, чем считалось изначально. Уже накопленные в настоящее время литературные данные позволяют сказать, что исследование данного НТФ не должно ограничиваться лишь моделями БП или болезни Альцгеймера.

На сегодняшний день цитопротекторные свойства и возможности CDNF достаточно хорошо известны, что делает его перспективной молекулой для терапии различных заболеваний. С другой стороны, до конца не изучена роль CDNF в созревании и поддержании различных нейротрансмиттерных систем, постоянное взаимодействие между которыми обеспечивает сложное и многообразное поведение. Кроме того, знание о том, как CDNF модулирует нейротрансмиттеры и поведение может расширить спектр потенциального терапевтического применения данного НТФ.

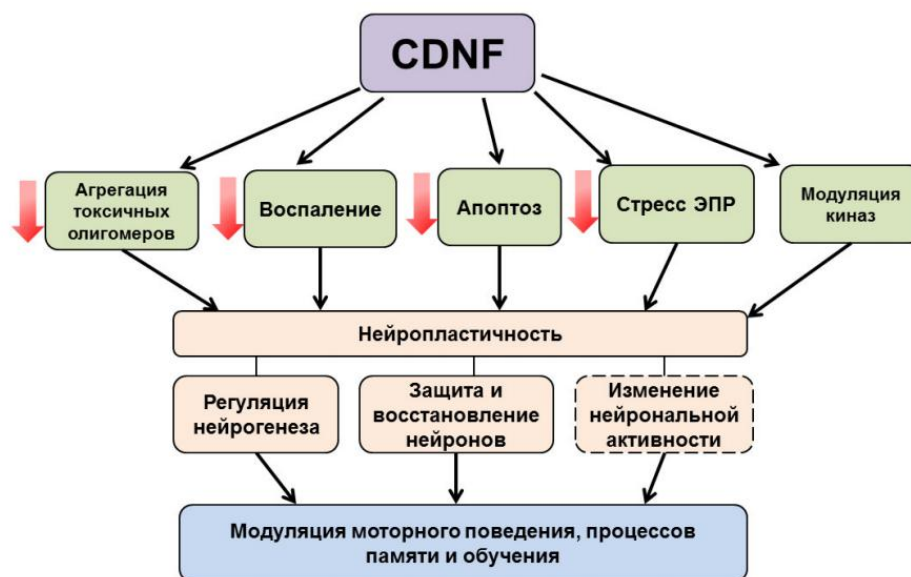


Рис. 4 Обобщающая схема эффектов CDNF. Пунктиром обозначен гипотетический механизм.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Экспериментальные животные

Эксперименты проводились на взрослых (2-3 месяца) самцах мышей линии C57BL/6 на базе ЦКП «SPF виварий» ИЦиГ СО РАН. Животные во время эксперимента содержались по 5-6 особей в пластмассовых клетках в стандартных лабораторных условиях (температура 18-22°C, относительная влажность 50-60%, естественное освещение (12 часов света и 12 часов темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Для выполнения поведенческих тестов за

два дня до эксперимента животные были рассажены в индивидуальные клетки для снятия групповых эффектов.

### Дизайн эксперимента №1

Перед операцией животным вводился внутривенно наркоз Авертин (2,2,2-трибромэтанол, 2-метил-2-бутанол, физиологический раствор) в дозировке 20 мкл на 1 г веса. Инъекция рекомбинатного белка CDNF или натрий-фосфатного буфера (PBS) производилась в левый боковой желудочек мозга по стереотаксическим координатам AP: -0.5 мм, ML: -1.0 мм, DV: 2.0 мм (<https://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=-1&ap=-0.5&dv=2>). Животные были поделены на 4 группы: 1) получившие инъекцию PBS, 2) получившие инъекцию 3 мкг белка rhCDNF (рекомбинантный человеческий CDNF), 3) получившие инъекцию 10 мкг белка rhCDNF, 4) получившие инъекцию 30 мкг белка rhCDNF (Схема 1). Белок предоставлен лабораторией M. Saarna (Университет Хельсинки), именно этот белок вводили людям по время клинических испытаний. Согласно программному обеспечению на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> человеческий и мышинный CDNF обладают 77% идентичностью в первичной последовательности аминокислот, что делает их весьма гомологичными белками. Таким образом, введение rhCDNF мышам является вполне валидным методом изучения эффектов CDNF, которые он может оказывать и на человека.

После инъекции белка CDNF, животные по одному помещались в свои домашние клетки, и после суток восстановления после операции начиналась регистрация данных в клетке с установкой PhenoMaster (Схема 1А). Другая группа животных после получения разных доз CDNF через сутки после операции проходила поведенческое тестирование (Схема 1Б).

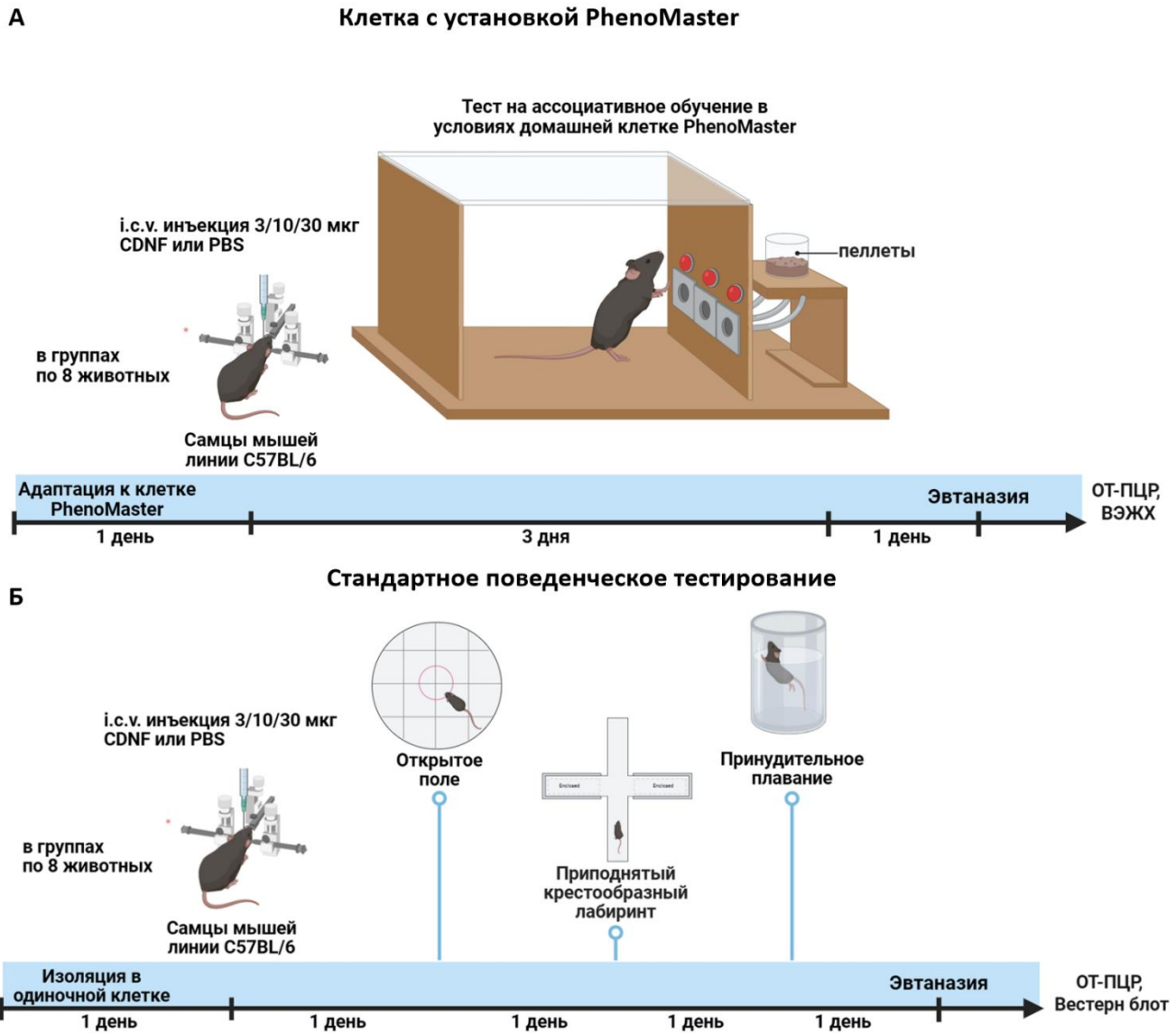


Схема 1. Дизайн эксперимента с внутрижелудочковым введением белка CDNF. (А) группа мышей, содержащихся в домашних клетка с установкой PhenoMaster, (Б) группа мышей, проходившая поведенческое тестирование.

## Дизайн эксперимента №2

Перед операцией животным вводился внутривенно наркоз Авертин (2,2,2-трибромэтанол, 2-метил-2-бутанол, физиологический раствор) в дозировке 20 мкл на 1 г веса. AAV-Syn-CDNF-EGFP (далее это группа животных «AAV\_CDNF») или AAV-Syn-EGFP (далее это группа животных «AAV\_EGFP») вводились в оба гиппокампа по координатам: AP: -2 мм, ML: -1.5 мм, DV: 2 мм и AP: -2 мм, ML: +1.5 мм, DV: 2 мм (<https://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=-1.5&ap=-2&dv=-2%29> и <https://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/?ml=1.5&ap=-2&dv=-2%29>).

Через 4 недели (необходимое время для наработки целевого белка) после инъекции вирусных частиц одна часть животных помещалась по 1 особи в клетки с установкой PhenoMster для записи параметров (Схема 2А). Другая часть животных проходила поведенческое тестирование (Схема 2 Б, В). Прохождение теста «водный лабиринт Морриса» и теста «резидент-интродер» вызывает наибольший стресс у животных, что может значительно повлиять на дальнейшее поведенческое тестирование. Поэтому было решено разделить их на разные батареи тестов.

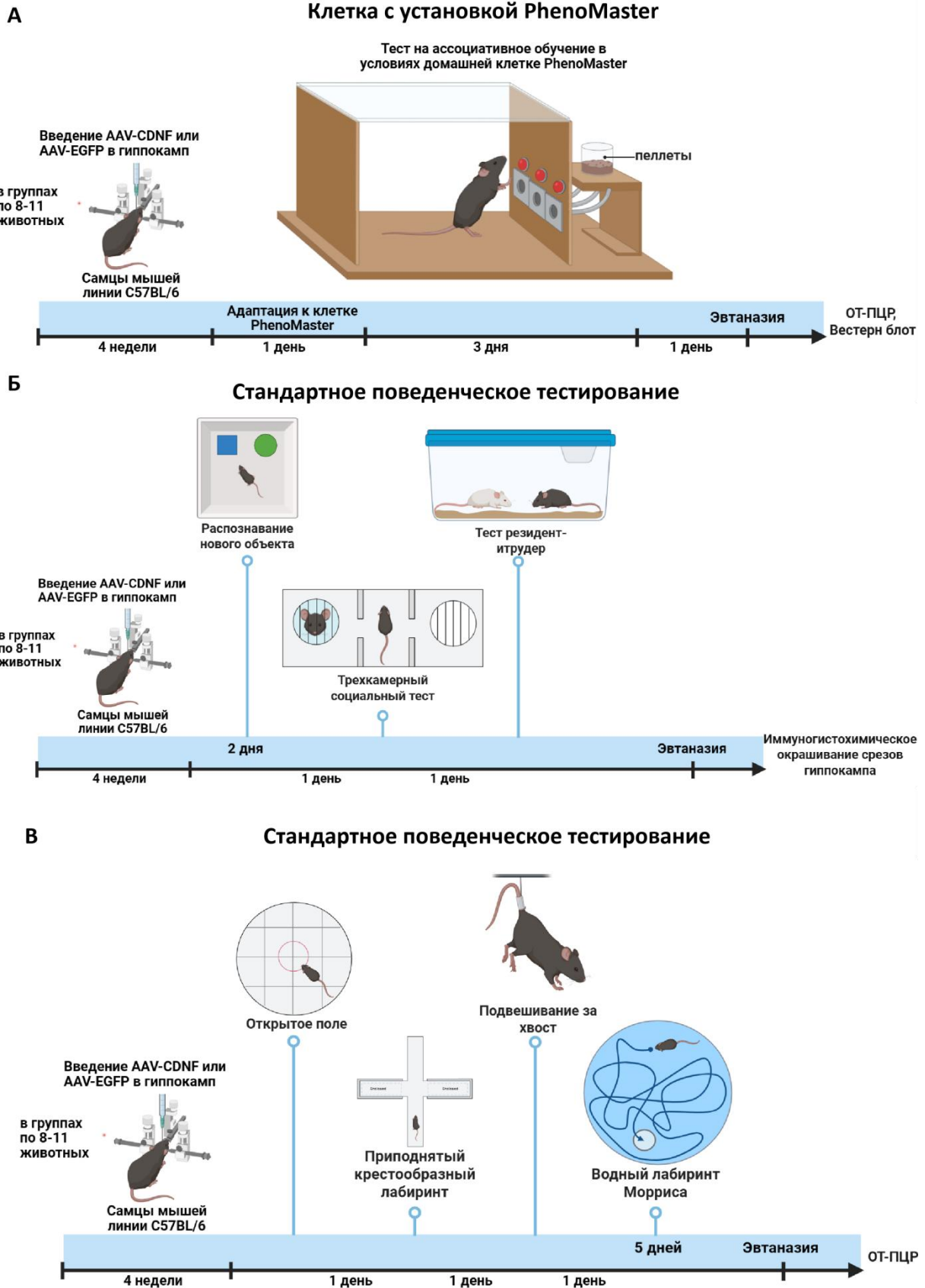


Схема 2. Дизайн эксперимента с введением аденоассоциированного вирусного конструкта, обеспечивающего сверхэкспрессию CDNF в гиппокампе. (А) группа мышей, содержащихся в домашних клетках с установкой PhenoMaster, (Б,В) группа мышей, проходившая поведенческое тестирование.

## **2.2 Поведенческое тестирование**

### **Тестирование в условиях домашней клетки**

С помощью установки PhenoMaster (TSE Systems, Германия) автоматически регистрировались такие физиологические показатели животных как: общая двигательная активность, скорость (см/сек), пройденный путь (м), потребление пищи (г) и воды (мл), время сна (мин). Программное обеспечение установки PhenoMaster определяет состояние сна как отсутствие подвижности животного в течение 40 секунд или более. Неподвижность животного в течение минимум 40-160 секунд рассматривалась равнозначным одному эпизоду сна.

В течение трех дней у животных исследовали когнитивные способности с помощью теста «Оперантная стенка». Начало теста всегда совпадало с началом периода активного бодрствования животных, сигналом служил свет лампочки, встроенной в модуль. Модуль был запрограммирован таким образом, что на первый день животное получало простейшую задачу – получить вознаграждение в виде сладкой пеллеты, совершая тычок носом в отверстие, помеченное горящей лампочкой. На второй день задача усложнялась – теперь, чтобы получить вознаграждение, необходимо было выполнить тычки носом в два помеченных светом отверстия. На третий день задача не отличалась от предыдущего, однако отверстия уже не были помечены светом – животное должно было само вспомнить необходимую последовательность действий. Продолжительность тестирования каждый день составляла не более 120 мин. Окончание теста наступало, когда животное получало все пеллеты (всего 10 шт), либо автоматически, по истечении указанного интервала. Запись параметров начиналась после первого тычка в отверстие.

### **Открытое поле**

Животное помещалось в центр круглой арены (40 см в диаметре). В течение 5 минут с помощью программного обеспечения EthoStudio (Kulikov et al., 2008) автоматически регистрировались пройденный путь, исследованная площадь арены, время нахождения в центре, а также число вертикальных стоек и эпизодов груминга.

### **Приподнятый крестообразный лабиринт**

Лабиринт представляет собой пересекающиеся под прямым углом рукава, два из которых открыты и два закрыты. Длина рукавов составляла 30 см, ширина – 6 см, расстояние над уровнем пола – 60 см. Закрытые рукава имели стенки из непрозрачного пластика высотой 20 см (безопасные рукава). Животное помещали в закрытый рукав лабиринта. В течение 5 минут с помощью программного обеспечения EthoStudio автоматически регистрировали пройденный путь, исследованная площадь закрытых и открытых рукавов, число выглядываний

из закрытых рукавов и число свисаний подсчитывалось вручную. Данный тест предназначен для исследования тревожности у животных.

### **Подвешивание за хвост**

Животное с помощью липкой ленты подвешивались за хвост вниз головой. После 2 минут пре теста, в течение 4 минут считалось время и количество эпизодов неподвижности. Данный тест позволяет оценить выраженность депрессивно-подобного поведения (Cryan et al., 2005). В норме мыши линии C57BL/6 не демонстрируют депрессивного поведения, поэтому в нашем случае мы оценивали выраженность поведенческого отчаяния, напрямую связанного с психомоторными характеристиками.

### **Принудительное плавание**

Животное помещается в стеклянный стакан (15 × 25 см), наполненный водой 25 °С. После 2 минут пре теста, в течение 4 минут считается время неподвижности животного с помощью программного обеспечения EthoStudio. Данный тест является аналогом теста подвешивания за хвост (Kulikov et al., 2010).

### **Распознавание нового объекта**

Данный тест был использован в первую очередь для оценки долговременной памяти мышей. Поскольку интерес к новому является имманентной характеристикой грызунов, любые отклонения от данного поведения в тесте можно использовать для фиксации признаков неофобии. В первый день животные в течение 5 мин привыкали к пустой арене (40см в диаметре). В второй день на арене на равном расстоянии друг от друга и от стен располагались два одинаковых объекта. Для устранения предпочтения животными определенных характеристик объектов половине мышей каждой группы предъявлялась пара объектов «X», а другой половине – пара объектов «Y». Животных помещали по одному на арену на 5 мин. где они могли свободно взаимодействовать с объектами. Затем мышей возвращали в индивидуальные клетки, а арену и предметы после каждого животного тщательно протирали. В день испытаний на арену поместили один из старых предметов вместе с новым, незнакомым животному. После этого мышь помещали в центр арены и записывали поведение в течение 5 мин, за это время животное могло свободно исследовать как новый, так и старый объект. Время взаимодействия с новыми и старыми объектами записывалось вручную в EthoStudio. Регистрировались следующие взаимодействия с предметом: обнюхивание (расстояние от носа менее 1 см) и вставание, опираясь на предмет. По окончании теста мышь возвращали в индивидуальную клетку и после каждого животного тщательно протирали арену и предметы. Индекс предпочтения рассчитывался как  $d = d1/e1$ , где  $d1$  – время, потраченное на изучение нового объекта, минус время, потраченное на изучение знакомого объекта, а  $e1$  – общее время исследования двух разных объектов.

### **Трехкамерный социальный тест**

Каждую мышь помещали отдельно в прямоугольную арену (60×40×22 см), изготовленную из непрозрачного пластика и состоящую из 3х отсеков, соединенных переходами. Тест состоял из двух этапов: привыкания и социализации. Каждую подопытную мышь помещали в центральную камеру на этапе привыкания, чтобы она могла свободно исследовать камеры в течение 10 минут. На этапе социализации пустой цилиндр (O) и цилиндр с другой мышью (S) помещали в боковые отсеки, и каждой экспериментальной мыши давали возможность исследовать все 3 отсека в течение 10 минут. Время пребывания в каждом отсеке и время обнюхивания (носом к цилиндру на расстоянии менее 2 см) в течение каждой 10-минутной фазы регистрировали с помощью программного обеспечения EthoStudio (Kulikov et al., 2008). После каждого эксперимента оборудование тщательно вытирали. Индекс социального предпочтения рассчитывали, как разницу между временем взаимодействия экспериментального животного с мышью в цилиндре (S) и пустым цилиндром (O), отнесенную к общему времени, проведенному в двух боковых отсеках или времени обнюхивания цели (S - O/общее время).

### **Резидент-интродер**

Тест проводился в рамках парадигмы резидент-интродер (Carter and Shieh, 2015). Самца мыши-альбиноса линии CD1 (интродер) вводили в домашнюю клетку тестируемого самца (резидента). Продолжительность теста составляла 10 мин, в течение этого времени считались время и количество обнюхиваний, а также количество и продолжительность атак.

### **Водный лабиринт Морриса**

Большой пластиковый цилиндр (100 см в диаметре, 40 см высотой) наполняется водой 25 °С, подкрашивается обезжиренный сухим молоком. В один из секторов на равноудаленном расстоянии от центра и края цилиндра ставится небольшая подводная платформа (5 см в диаметре, 14.5 см высотой) так, чтобы она находилась на 1 см ниже уровня воды, кроме того на боковой стенке арены есть визуальная метка в виде черного квадрата. Животное помещают в воду последовательно с 3 разных точек, если в течении минуты животное не находит платформу, то его сажают на платформу на 15 сек, после этого дают отдохнуть 15 сек и снова запускают в бассейн. Данное обучение проходит 4 дня, где мы учитываем время нахождения платформы, пройденный путь и дистанцию до платформы в каждый момент времени. На 5-ый день подводная платформа убирается, в течение 3 попыток по 1 минуте считается время нахождения в целевом секторе (где была платформа) и в противоположном.

### 2.3 Генно-инженерные методы

Плазмиды рAAV-Syn-CDNF-EGFP и рAAV-Syn-EGFP были сконструированы к.б.н. Т. В. Ильчибаевой с помощью генно-инженерных методов. Плазида рAAV-Syn-CDNF-EGFP кодирует мышинный (*Mus musculus*) белок CDNF под промотором *Syn1* обеспечивает конститутивную экспрессию во всех нейронах. Чтобы избежать возможное нарушение функций белка CDNF, перед последовательностью, кодирующей EGFP стоит стоп-кодон. Плазида рAAV-Syn-EGFP кодирует ген EGFP под промотором *Syn1* и в данной работе выступает в качестве контрольной плазмиды. С помощью полученных плазмид была собрана аденоассоциированные вирусы, которые при интрацеребральном введении способны трансдуцировать нейроны мыши *in vivo* обеспечивать сверхэкспрессию белка CDNF.

Клетки НЕК 293FT субкультивировали в среде DMEM (Sigma, Германия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США), 1% GlutaMAX (Gibco США) и 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Клетки инкубировали при 37°C при 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пересеивали при 70% конfluence и среду обновляли каждые 2–3 дня. Клетки НЕК 293FT трансфецировали плазмидами с использованием полиэтиленимина (PEI, Polysciences, 23966-2, Германия), следуя инструкциям производителя.

Упаковка рAAV-Syn-CDNF-EGFP или рAAV-Syn-EGFP в аденоассоциированные вирусные частицы была выполнена путем котрансфекции с плазмидами рAAV-DJ и рHelper (Cell Biolabs, Inc., США) в клетках НЕК-293FT. Вирусные частицы собирали через 48 часов в соответствии с протоколом (Grimm et al., 2003). Количество полученных вирусных частиц определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с системой праймеров для участка WPRE (F 5'-cctgggtgctgtctctttatgagg-3'; R 5'-tgacaggtggggcaatgc-3'). Серию разведений исходной плазмиды известной концентрации использовали в качестве стандарта для определения количества вирусных частиц. Оба AAV вектора, использованные в этом исследовании, имели одинаковые геномные титры (10<sup>8</sup> вирусных частиц на 1 мкл).

### 2.4 Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени

Общую РНК выделили с помощью ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. РНК обрабатывалась ДНКазой без РНКазной активности (1000 о.е./мл; «Promega», США) (2 ед. на пробу, 37°C, 15 мин), разводилась водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при -80°C.

ПЦР с детекцией в режиме реального времени (*real-time PCR*). Праймеры, используемые для амплификации кДНК, исследуемых генов, разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании “Биосан” (Новосибирск). 1 мкл кДНК была смешана с 19 мкл реакционной смеси состоящей из:

2 мкл 4 mM праймеров, 2 мкл 10-кратного ПЦР буфера, содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I, 2 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 мкл 2.5 mM dNTP, 0,16 мкл Taq ДНК-полимеразы и 10,84 мкл H<sub>2</sub>O (R-414, Синтол, Москва, Россия). ПЦР проводилась на амплификаторе LightCycler 480 System (“Roche”, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95°C - 1 цикл; 15 сек при 95°C, 30 сек при температуре указанной в Таблице 1., 20 сек при 72°C - 40 циклов. Последовательности праймеров для сплайсированных и несплайсированных форм ХВР1 взяты из отдельной статьи (Yoon et al., 2019). В качестве внешнего экзогенного стандарта для контроля ПЦР использовалась геномная ДНК, выделенная из ядер гепатоцитов самца мыши линии C57BL/6. 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 в отдельных пробирках и была использована как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) построили с помощью автоматического программного обеспечения LightCycler 480 System. Для контроля специфичности амплификации использовался анализ кривой плавления для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия генов представляется как отношение количества кДНК, исследуемого гена, к 100 копиям гена *Polr2a*, который кодирует ДНК-зависимую субъединицу РРВ1 РНК-полимеразы II, выполняющей функцию внутреннего стандарта. Так как в работе использовался только 1 ген для нормализации исследуемых генов, то для каждой ПЦР ген *Polr2a* проверяли на стабильную экспрессию, то есть, чтобы его экспрессия среди групп не отличалась друг от друга.

Таблица 1. Последовательности и характеристики олигонуклеотидов используемых в работе в качестве праймеров. .

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С	Длина ПЦР продукта, пн
<i>Atf6</i>	F5'- CTCAAACCAATGCCAGTGTCC-3' F5'-ATGCTGATAATCGACTGCTGC-3'	59	94
<i>Creb1</i>	F5'-GCTGGCTAACAATGGTACGGAT-3' F5'-TGGTTGCTGGGCACTAGAAT-3'	64	140
<i>Eif2ak3</i>	F5'-ACAACAGTGA CT CAGCGGAC-3' F5'-GCAGCCAGAGTCC TCAAACA-3'	60	194
<i>Ern1</i>	F5'-TCTGGGGATGTCCTGTGGAT-3' F5'-CTTGGCCTCTGTCTCCTTGG-3'	60	195
<i>Fos</i>	F5'-AAAGAGAAGGAAAACTGGAG-3'	58	264

	R5'-CGGAAACAAGAAGTCATCAA-3'		
<i>Hspa5</i>	F5'-CGCTCTACCATGAAGCCTGT-3' F5'-AGCCTCATCGGGGTTTATGC-3'	60	174
<i>Htr1a</i>	F5'-GACTGCCACCCTCTGCCCTATATC-3' R5'-TCAGCAAGGCAAACAATTCCAG-3'	62	200
<i>Htr2a</i>	F5'-AGAAGCCACCTTGTGTGTGA-3' R5'-TTGCTCATTGCTGATGGACT-3'	61	169
<i>Htr7</i>	F5'-GGCTACACGATCTACTCCACCG-3' R5'-CGCACACTCTCCACCTCCTTC-3'	65	198
<i>Maoa</i>	F5'- AATGAGGATGTTAAATGGGTAGATGTTGG T-3' R5'-CTTGACATATTCAACTAGACGCTC-3'	62	138
<i>Polr2a</i>	F5'-GTTGTCGGGCAGCAGAATGTAG-3' R5'-TCAATGAGACCTTCTCGTCTCC-3'	61	188
<i>Slc6a4</i>	F5'-AAGCCCCACCTTGACTCCTCC-3' R5'-CTCCTTCCTCTCCTCACATATCC-3'	57	198
<i>Xbp1</i> (sXbp1- сплайсиров анная форма)	F5'-GCTGAGTCCGCAGCAGGT-3' F5'-CAGGGTCCAACCTTGTCCAGAAT-3'	60	130
<i>Trh2</i>	F5'-CATTCCTCGCACAATTCCAGTCG-3' R5'-AGTCTACATCCATCCCAACTGCTG-3'	61	239
<i>Xbp1</i> (uXbp1- несплайсир ованная форма)	F5'-CAGACTACGTGCACCTCTGC-3' F5'-CAGGGTCCAACCTTGTCCAGAAT-3'	60	139

## 2.5 Вестерн блот

Исследуемые структуры мозга гомогенизировали в буфере LB (300 мМ NaCl, 100 мМ Трис-HCl, pH 8,4 мМ ЭДТА, 0,2% Triton X-100, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз). Инкубировали 1ч на льду, центрифугировали 12 000 × g, 15 мин. Белок супернатанта переносили в чистую пробирку и хранили при -80°C. Концентрацию белка оценивали спектрофотометрически с использованием набора для анализа белка Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США) на NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, Массачусетс, США) с последующим доведением образцов до равных концентраций с помощью x2 Лемли буфером. Перед электрофорезом белки денатурировали 10 мин

нагреванием до 95°C. Белковые экстракты разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) в системе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Мембраны инкубировали в трис-буферном солевом растворе с добавлением 0,05% Tween 20 (TBST), содержащего 5% обезжиренного сухого молока (NFDM-TBST) для блокирования неспецифического связывания мембраны и антител. Все мембраны были заблокированы в течение 1ч, затем проинкубированы с первичными антителами 18 ч при +4°C. Далее мембраны отмывались от излишков первичных антител TBST и инкубировались со вторичными антителами, конъюгированным с пероксидазой хрена, 1ч при комнатной температуре. После удаления излишком антител мембраны обрабатывали субстратом Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя. Белковые полосы детектировали с помощью сканера блотов C-DiGit (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Количественную оценку белковых полос проводили с помощью ImageStudio (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Уровни целевого белка были нормализованы к уровням белка GAPDH и представлены в процентах от значений контрольных животных.

Таблица 2. Характеристики используемых в работе антител.

Белок	Первичные антитела		Вторичные антитела: разведение, название
	Разведение	Название	
CDNF	1 : 500	Paq458Mu01 («CloudClone», США)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
CREB	1 : 1000	Ab 31387 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
pCREB	1 : 1000	Ab 32096 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
c-Fos	1 : 500	Sc-52 («Santa Cruz», США)	Против кролика 1 : 8000 G-21234 («Invitrogen», США)
p-c-Fos	1 : 1000	D82c12 («Cell Signaling Technology», США)	Против кролика 1 : 8000 G-21234 («Invitrogen», США)

			США)
GAPDH	1 : 10000	Ab 8245 («Abcam», Великобритания)	Против мыши 1 : 30 000 ab6728 («Abcam», Великобритания)
5-HT1AR	1 : 1000	Ab 85615 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
5-HT2AR	1 : 500	Ab 66049 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
5-HT7R	1 : 1000	Ab 128892 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
TRH2	1 : 1000	Ab 184505 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
5-НТТ	1:1000	303614 («Biological Life Sciences», США)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)
МАОА	1 : 1000	Ab 126751 («Abcam», Великобритания)	Против кролика 1 : 10 000 G-21234 («Invitrogen», США)

## 2.6 Определение уровня серотонина и его метаболита методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Структуры мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Элвехема в 200 мкл 0,6 М  $\text{HClO}_4$  (Sigma Aldrich, США), содержащего 200 нг/мл изопротеренола (Sigma Aldrich) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при 4° С для осаждения белка. Супернатанты разбавляли в 2 раза водой и фильтровали с использованием центрифужной пробирки с 0,22 мкм ацетатцеллюлозным фильтром (Spin-X®, США). Осадок хранили при -20° С до количественного определения белка по методу Брэдфорда (Bradford, 1976), 20 мкл отфильтрованного супернатанта вводили в петлю системы ВЭЖХ.

Анализ биогенных аминов проводили с использованием системы ВЭЖХ, в которой содержались следующие компоненты: электрохимический детектор (700 мВ,

электрохимический детектор DECADE ИТМ; Antec, Нидерланды), проточная ячейка из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, The Нидерланды), системный контроллер СВМ-20А, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20А и дегазатор DGU-20А5R (Shimadzu Corporation, США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли изократическим элюированием при скорости потока 1 мл/мин на колонке С18 (размер частиц 5 мкм, L × ID 100 × 4,6 мм, Luna, Phenomenex, США), защищенной предколонкой С8 (Phenomenex, США) картридж. Подвижная фаза представляла собой смесь из 90% 50 мМ фосфатного буфера (Sigma Aldrich), содержащую 300 мкг/л натриевой соли октансульфоновой кислоты (Sigma Aldrich) (рН 3,9) и 10% метанола класса ВЭЖХ (Fisher Chemical, США). Температура колонки стабилизировалась при 40 °С. Содержание веществ выражали в нг/мг белка (анализ Бредфорда).

## 2.7 Иммуногистохимическое окрашивание

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 8 мкм делали в криостате («Thermo Scientific», США). Пермеабиллизацию проводили погружением в 0,3%-ный раствор Triton X-100 (Т8787, «Sigma-Aldrich») на 30 мин. Неспецифическое связывание блокировали 5%-ной нормальной ослиной 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), разведенным в PBS, проводили в течение ночи при 4 °С. 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 #А-21203 Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594). Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензида (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).

## 2.8 Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 8.0. Экстремальные значения в выборках исключались с помощью критерия Диксона, при уровне значимости  $q=0,1$ . Если выборки подчинялись нормальному распределению (критерии Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова), то сравнивались при помощи однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с

последующим post-hoc анализом по Фишеру для 4 групп или двустороннего t-критерия Стьюдента для 2 групп. В тех случаях когда ANOVA не показывал достоверного основного эффекта, но имел тенденцию ( $0.06 \leq p \leq 0.08$ ), проводили post-hoc по Даннету. Для обсчета «водного лабиринта Морриса» и показателей с PhenoMaster использовался ANOVA для повторных измерений. Если же выборки не подчинялись нормальному распределению, то применялся H-критерий Краскела-Уоллиса для 4 групп со множественным сравнением по Данну или U-критерий Манна-Уитни для 2 групп. Для статистических сравнений в качестве критерия значимости использовали  $p < 0.05$ . Все данные на графиках представлены как средние  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ), при этом для отображения нормального распределения выборки использовались столбчатые диаграммы, для ненормального скрипичные.

## Глава 3 Результаты

### *Эффекты i.c.v. инъекции рекомбинантного белка CDNF на поведение мышей в условиях домашней клетки*

У мышей после введения 3 мкг белка CDNF увеличился суточный пройденный путь через 48 ч после i.c.v. инъекции ( $F_{3,21} = 3.17$ ;  $p < 0.05$ ). Однако, этот эффект не наблюдался в последующие дни. Достоверной разницы в общем пройденном пути у экспериментальных животных на протяжении всего эксперимента обнаружено не было (Рис. 5Б), то есть изменения в двигательной активности были временными и незначительными. Центральная инъекция CDNF не повлияла на общее потребление пищи (Рис. 5Г) и потребление воды (Рис. 5Е) у мышей. Была обнаружена лишь разница в ежедневном потреблении пищи и воды ( $F_{3,48} = 10.93$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 5В и  $F_{3,50} = 9.08$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 5Д). При этом, во всех случаях взаимодействия между факторами «центральная инъекция  $\times$  день эксперимента» показано не было. Мыши, получившие инъекцию CDNF, потеряли в весе ( $F_{3,28} = 3.17$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 6), хотя общее потребление пищи, как указано выше не отличалось.

У всех животных, как группы PBS, так CDNF, наблюдалось уменьшение ( $p < 0.001$ ) средней продолжительности эпизодов сна в течение часа темной фазы суток по сравнению со светлой фазой (Рис. 7А). Это соответствует известной циркадной активности мышей. В то же время, был обнаружен значительный эффект введения 3 мкг CDNF ( $F_{3,54} = 5.53$ ;  $p < 0.01$ ): мыши, получившие 3 мкг CDNF, продемонстрировали достоверное снижение ( $p < 0.01$ ) средней продолжительности сна за каждый час светлой фазы, по сравнению с остальными группами (Рис. 7Б). При анализе ежедневной продолжительности сна было обнаружено достоверное взаимодействие «центральная инъекция  $\times$  время эксперимента» ( $F_{192,1792} = 1.18$ ;  $p = 0.05$ ). Post-hoc анализ показал, что в течение 8 часов светлой фазы суток через 48 ч после введения CDNF средняя продолжительность эпизода сна у мышей, получивших 3 мкг белка была меньше, чем у контрольных животных, но позже стабилизировалась. Каких-либо эффектов введения CDNF на общее число эпизодов сна или число эпизодов сна в каждом отдельном часе показано не было. Таким образом, при инъекции белка CDNF может вызывать значительные, но временные нарушения сна.

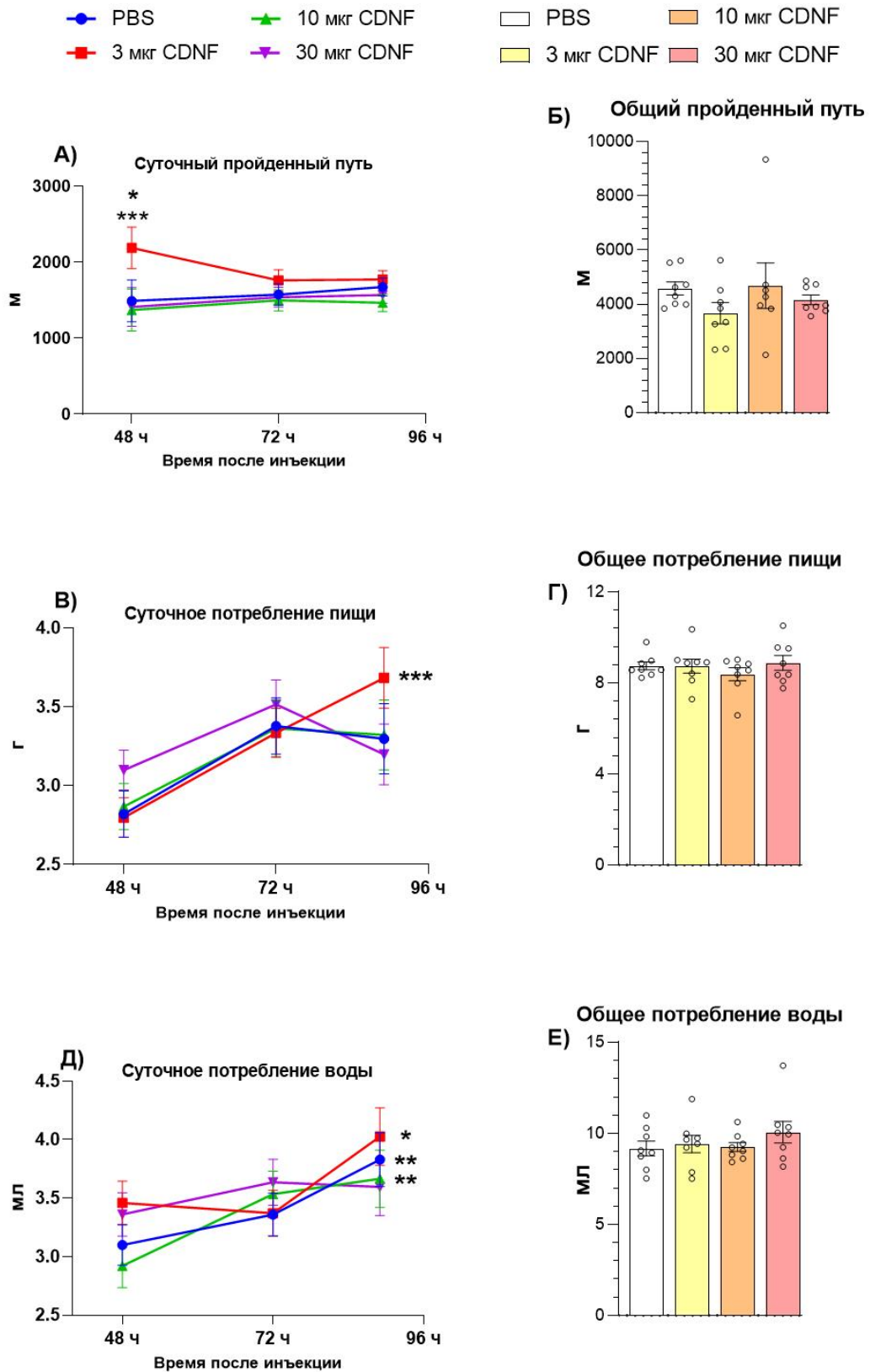


Рис. 5 Ежедневный (А) и общий (Б) пройденный путь после внутрижелудочковой инъекции белка CDNF у мышей. \*  $p < 0.05$  – 3 мкг CDNF по сравнению с PBS; \*\*\*  $p < 0.001$  – 3 мкг CDNF по сравнению с 10 и 30 мкг CDNF (ANOVA для повторных измерений, post-hoc по Фишеру); Ежедневное (В) и общее (Г) потребление пищи. \*\*\*  $p < 0.001$  – 3 мкг CDNF по сравнению с первым днем эксперимента (ANOVA для повторных измерений, post-hoc по Фишеру);

Ежедневное (Д) и общее (Е) потребление воды. \* $p < 0.05$  – 3 мкг CDNF последнего дня по сравнению с первым днем эксперимента; \*\* $p < 0.01$  – 10 мкг CDNF и PBS последнего дня по сравнению с первым днем эксперимента (ANOVA для повторных измерений, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

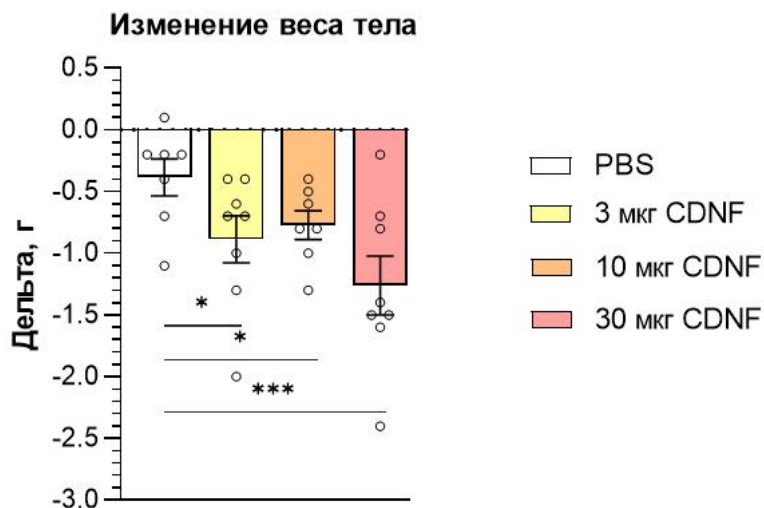


Рис. 6 Изменение веса тела мышей после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10, 30 мкг CDNF. \* $p < 0.05$  – 3 мкг и 10 мкг CDNF по сравнению с PBS; \*\*\* $p < 0.001$  – 30 мкг CDNF по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

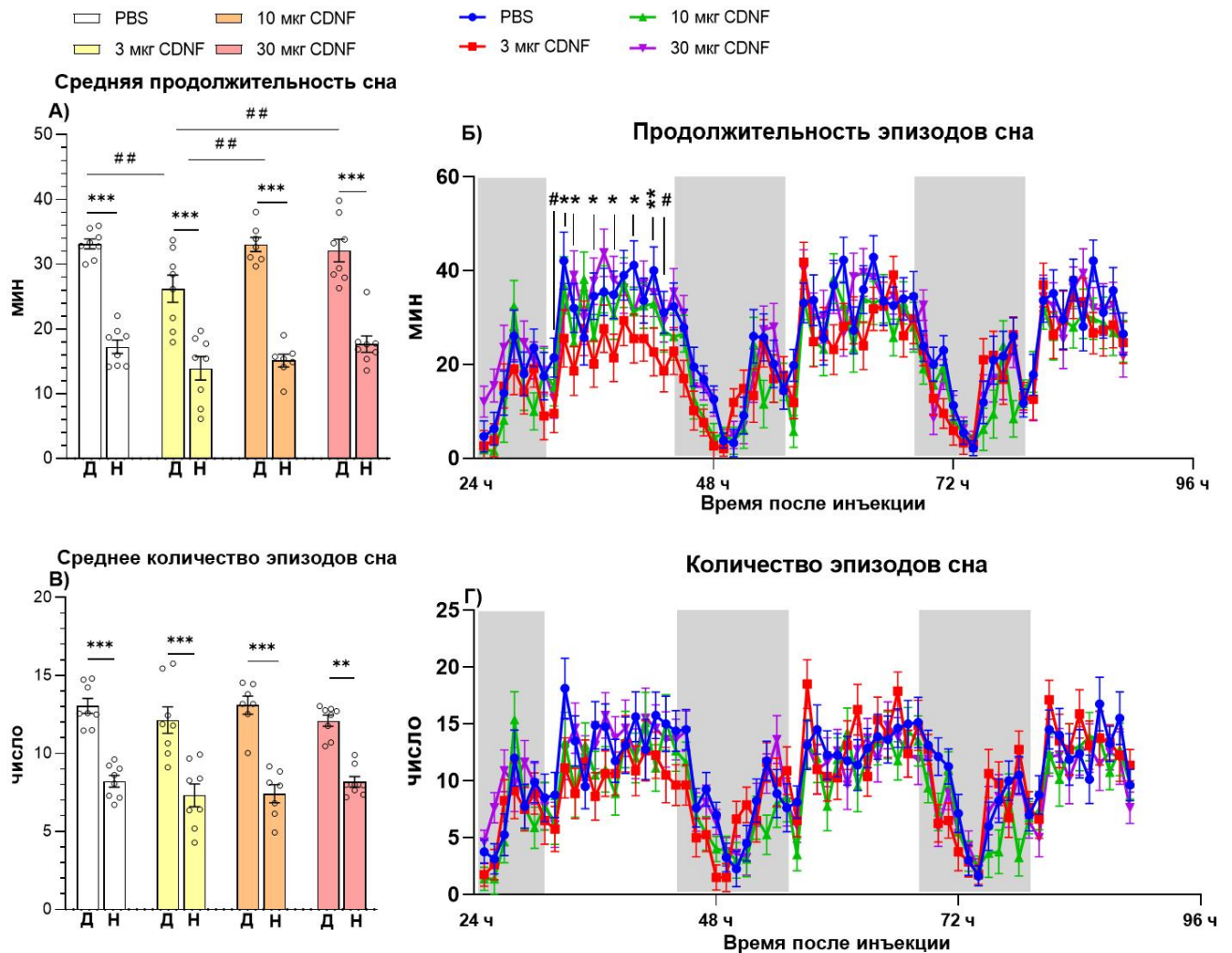


Рис. 7 Средняя продолжительность эпизода сна в течение каждого часа светлой и темной фазы суток у мышей после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10, 30 мкг CDNF (А). \*\*\*  $p < 0.001$  для ночи по сравнению с днем; ##  $p < 0.01$  – 3 мкг CDNF по сравнению с другими группами (двухфакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру); (Б) Ежечасная продолжительность сна. # тенденция  $p = 0.06$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  – 3 мкг CDNF по сравнению с PBS (ANOVA для повторных измерений, post-hoc по Фишеру). (В) Среднее количество эпизода сна в течение каждого часа светлой и темной фазы суток после центральной инъекции PBS или 3, 10, 30 мкг CDNF. \*\*\*  $p < 0.001$  ночь по сравнению с днем (двухфакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). (Г) Ежедневное число эпизодов сна. Данные представлены как  $M \pm SEM$ . Д – светлая фаза суток, Н – темная фаза суток. На графиках с динамикой темная фаза суток закрашена серым цветом.

Было обнаружено значительное улучшение способностей к обучению у животных после введения CDNF. На третий день теста «оперантная стенка» животные продемонстрировали увеличение числа тычков носом ( $N = 8.2$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 8А), и числа полученных пеллет ( $N = 8.764$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 8В). Также наблюдалась тенденция к увеличению ( $N = 7.285$ ;  $p = 0.06$ )

общего времени тычков носом у мышей, получивших 3 и 30 мкг CDNF (Рис. 8Б). Таким образом, CDNF позитивно повлиял на ассоциативное обучение у мышей.

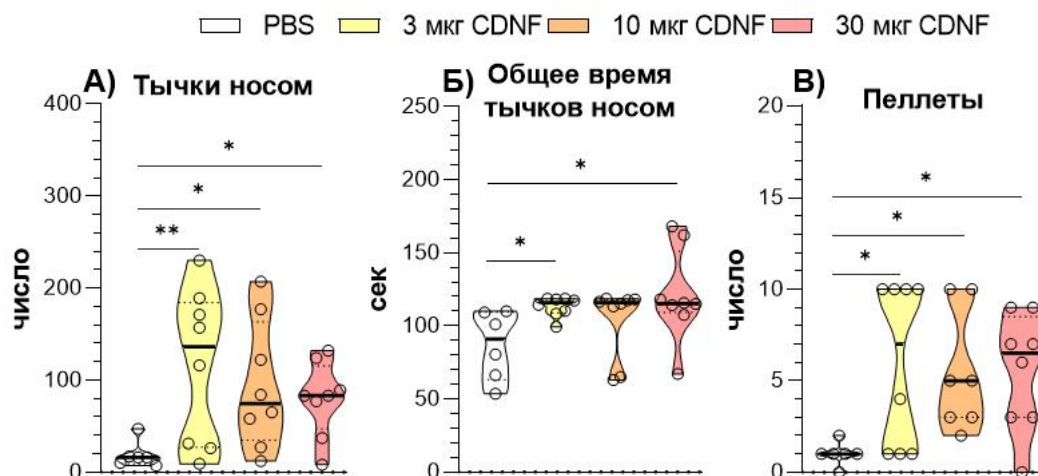


Рис. 8 Ассоциативное обучение у мышей в тесте «оперантная стенка» после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10, 30 мкг CDNF. Число тычков носом (А), общее время тычков носом (Б) и число полученного вознаграждения (пеллеты) (В). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  – по сравнению с PBS (критерий Краскела-Уоллиса со множественным сравнением по Данну). Диаграммы представлены в виде скрипичных диаграмм, поскольку анализировались непараметрическим тестом. Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Поведенческое тестирование после центральной инъекции разных доз CDNF у мышей

У мышей в тесте «открытое поле» был выявлен эффект введения CDNF на общий путь ( $F_{3,27} = 3.77$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 9А). Однако post-hoc анализ показал лишь тенденцию ( $p = 0.06$ ) к уменьшению пройденной дистанции у мышей, получивших 30 мкг CDNF по сравнению с контролем. Дистанция уменьшилась у групп 3 и 30 мкг CDNF по сравнению с группой 10 мкг CDNF. Можно предположить, что центральная инъекция CDNF имела незначительное влияние на двигательную активность животных, тем более, что данные PhenoMaster не показывают разницы в общем пройденном пути. Введение CDNF повлияло на исследованную площадь арены ( $F_{3,27} = 4.14$ ;  $p < 0.05$ ). Животные, которые получили 10 мкг CDNF, исследовали большую площадь, чем контрольные животные ( $p < 0.05$ ; Рис. 9Б). В то время, доза 30 мкг CDNF значительно увеличила время в центре арены ( $F_{3,27} = 3.83$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 9Г) и уменьшила общее число пристеночных вертикальных стоек ( $F_{3,25} = 8.67$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 9Д), а также отношение пристеночных стоек ко времени проведенным на периферии ( $F_{3,25} = 7.98$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 9Е). Число эпизодов груминга у животных не изменилось (Рис. 9В). Возросшее время в центре арены может демонстрировать анксиолитический (антитревожный) эффект введения 30 мкг

CDNF. Уменьшение числа вертикальных стоек скорее отражает меньшую степень тигмотаксиса (желание животных быть ближе к стенке), а не уменьшение исследовательской активности, поскольку выраженность тигмотаксиса негативно коррелирует с временем, проведенным в центре, а исследованная площадь арены изменяется крайне незначительно.

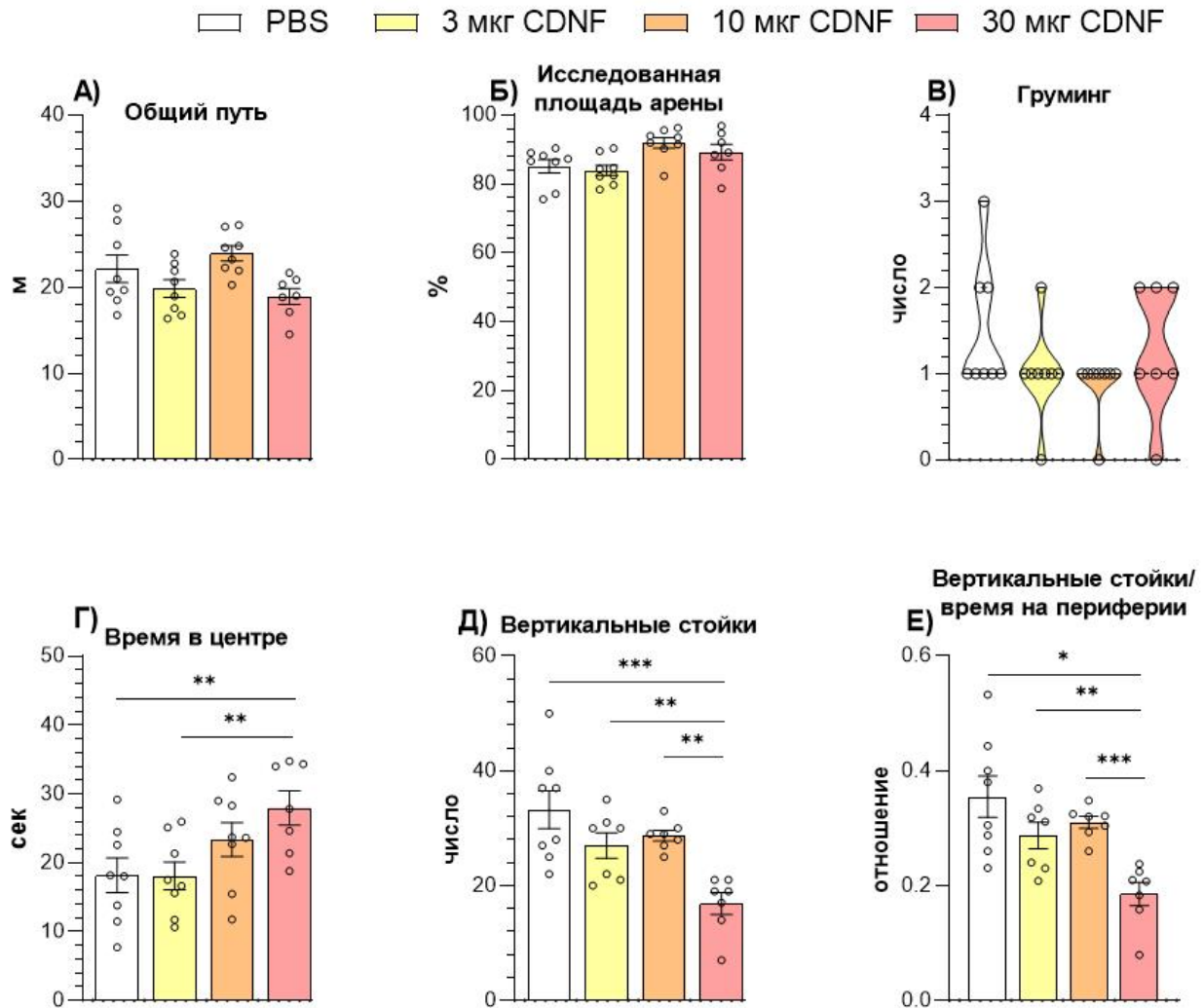


Рис.9 Общий путь (А), исследованная площадь арены (Б), число груминга (В), время в центре арены (Г), число вертикальных стоек (Д) и отношение вертикальных стоек ко времени на периферии (Е) у мышей после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDFN в тесте «открытое поле». \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (Однофакторный ANOVA, *post-hoc* по Фишеру). (А-Г) представлены как  $M \pm SEM$ , (Д) представлена в виде скрипичных диаграмм, поскольку анализировались непараметрическим тестом Краскела-Уоллиса.

Для подтверждения анксиолитического эффекта CDFN был проведен тест «приподнятый крестообразный лабиринт». У животных после введения CDFN увеличилось время проведенное в открытых рукавах ( $F_{3,27} = 3.11$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 10В) и их исследованная площадь ( $F_{3,27} = 3.37$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 10Д), с обратной стороны уменьшилось время в закрытых рукавах ( $F_{3,27} = 3.32$ ;  $p <$

0.05; Рис. 10Б) и их исследованная площадь ( $F_{3,26} = 4.94$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 10Г). При этом двигательная активность животных не изменялась (Рис. 10А). Мы обнаружили эффект CDNF ( $F_{3,27} = 6.85$ ;  $p < 0.01$ ) на исследовательское поведение – латентное время первого выглядывания из закрытого рукава уменьшилось у животных с инъекцией CDNF (Рис. 10З). Таким образом, внутрижелудочковое введение белка CDNF вызывает значительный антитревожный эффект у животных.

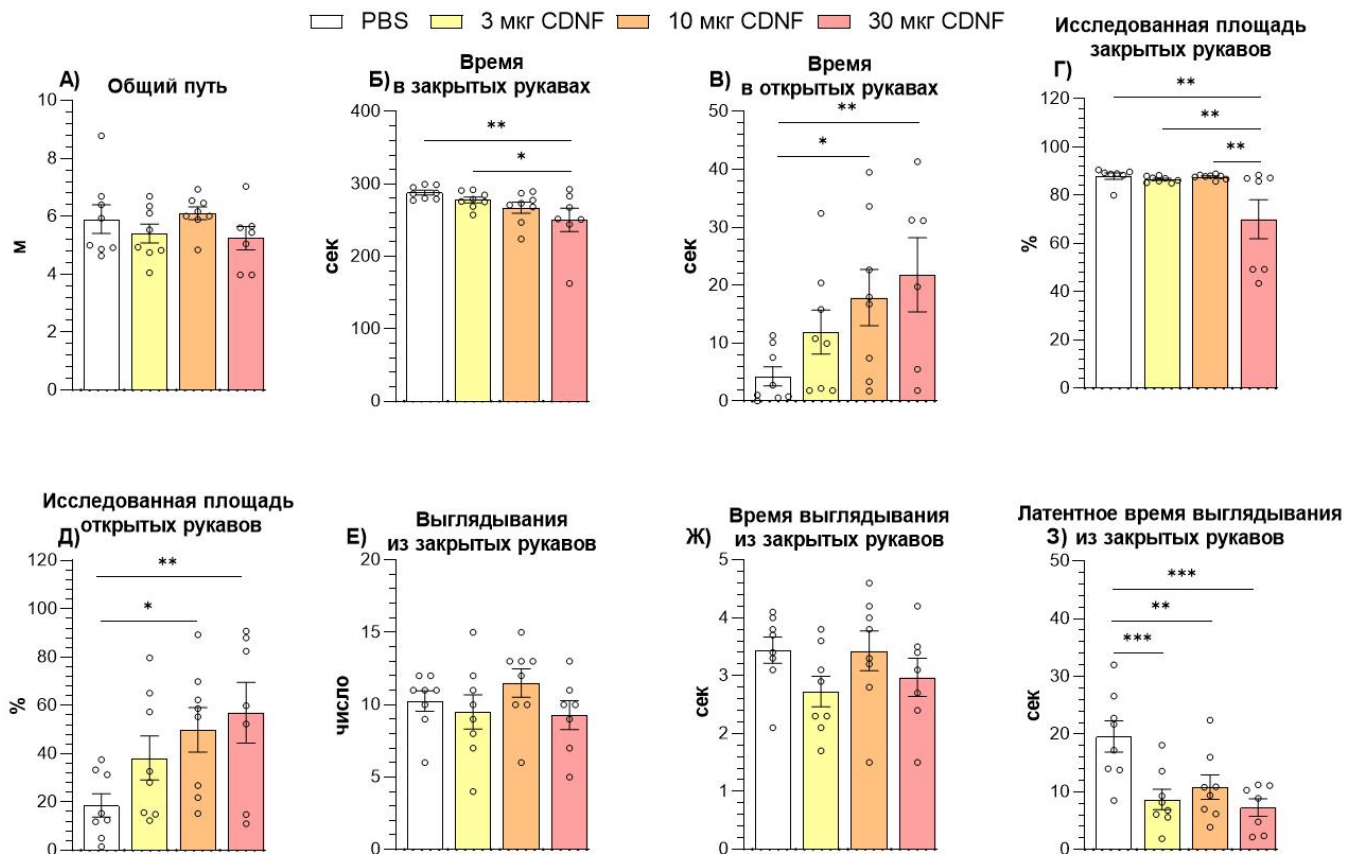


Рис. 10 Общий путь (А), время в закрытых (Б) и открытых (В) рукавах, исследованная площадь закрытых (Г) и открытых (Д) рукавах, число (Е), время (Ж) и латентное время (З) выглядываний из закрытых рукавов у мышей после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

В тесте принудительного плавания основной эффект инъекции CDNF на время неподвижности оказался незначительным ( $F_{3,24} = 2.53$ ;  $p = 0.08$ ) в соответствии с однофакторным ANOVA, однако post-hoc анализ по Даннету выявил разницу между группой 30 мкг CDNF и контрольной группой (Рис. 11Г). Таким образом, i.c.v. белка CDNF в максимальной дозе 30 мкг способна снижать выраженность поведенческого отчаяния у мышей.

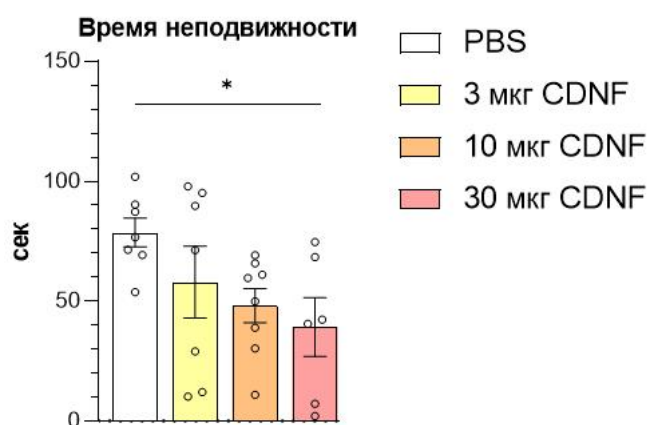


Рис. 11 Время неподвижности в тесте «принудительного плавания» у мышей после внутрибрюшной инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF. \* $p < 0.05$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, *post-hoc* по Даннету). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### **Влияние центрального введения белка CDNF на обмен серотонина, а также экспрессию ферментов его метаболизма и рецепторов у мышей**

Анализ метаболизма 5-НТ показал его значительные изменения после центрального введения животным рекомбинантного CDNF. Это отражается в возросшем соотношении 5-ГИУК/5-НТ в среднем мозге ( $F_{3,28} = 4.11$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 12А), фронтальной коре ( $F_{3,27} = 3.27$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 12Б) и гиппокампе ( $F_{3,28} = 5.98$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 12В). Во фронтальной коре также был обнаружен возросший уровень 5-ГИУК ( $F_{3,25} = 4.54$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 12Б). Данный сдвиг в катаболизме 5-НТ может отражать возможное увеличение синтеза или секреции этого нейротрансмиттера после введения CDNF.

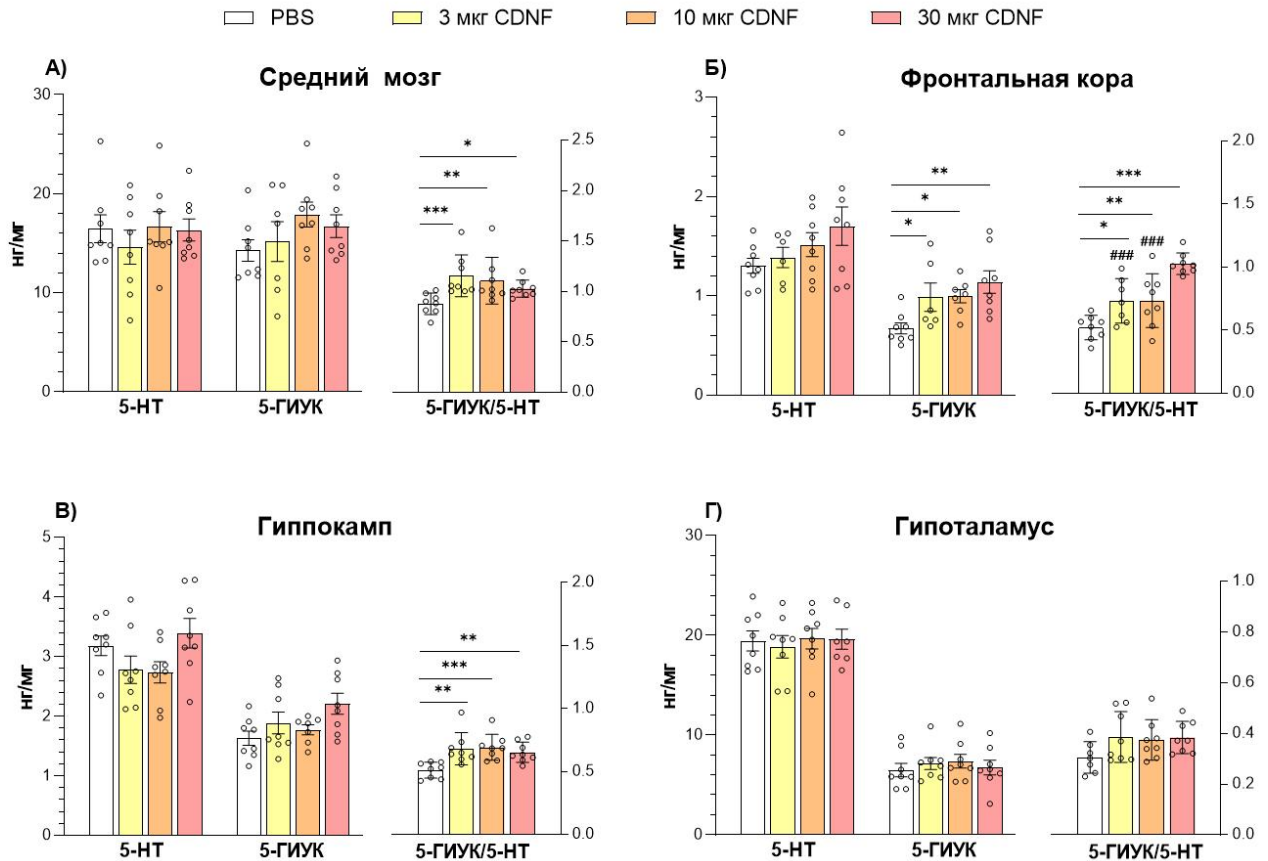


Рис. 12 Уровни серотонина (5-НТ) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК), а также их отношение в исследованных структурах мозга у мышей после внутривенной инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF. Уровни 5-НТ и 5-ГИУК представлены в нг/мг общего белка. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – по сравнению с PBS; ### $p < 0.001$  – по сравнению с 30 мкг CDNF (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

Центральная инъекция CDNF не вызвала изменения в уровне мРНК и белка TRH2 (Рис. 13 А, Б) и 5-НТТ (Рис. 13 В, Г) в среднем мозге. У мышей из группы, получившей 10 мкг и 30 мкг CDNF, уровень мРНК *Maoa* уменьшился во фронтальной коре ( $F_{3,26} = 3.64$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 13Д), а в среднем мозге, наоборот, наблюдалось увеличение уровня белка MAOA после дозы 30 мкг CDNF ( $F_{3,23} = 4.427$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 13Е).

Мы обнаружили значительные изменения в уровне мРНК 5-НТ рецепторов в исследуемых структурах. Так, уровень мРНК 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора увеличился ( $F_{3,23} = 13.05$ ;  $p < 0.001$ ) во фронтальной коре после введения CDNF во всех дозах по сравнению с контролем (Рис. 14А). Мыши, получившие 10 или 30 мкг белка CDNF, имели более низкий уровень мРНК 5-НТ<sub>7</sub> рецептора в гиппокампе ( $F_{3,28} = 5.66$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 14Д). Однако эти результаты не сопровождалось изменениями в уровне белка исследуемых серотониновых рецепторов (Рис. 14

Б, Г, Е). Таким образом, инъекция CDNF вызвала значительные изменения в уровне мРНК рецепторов серотонина, при этом не затрагивая экспрессию генов синтеза и катаболизма серотонина.

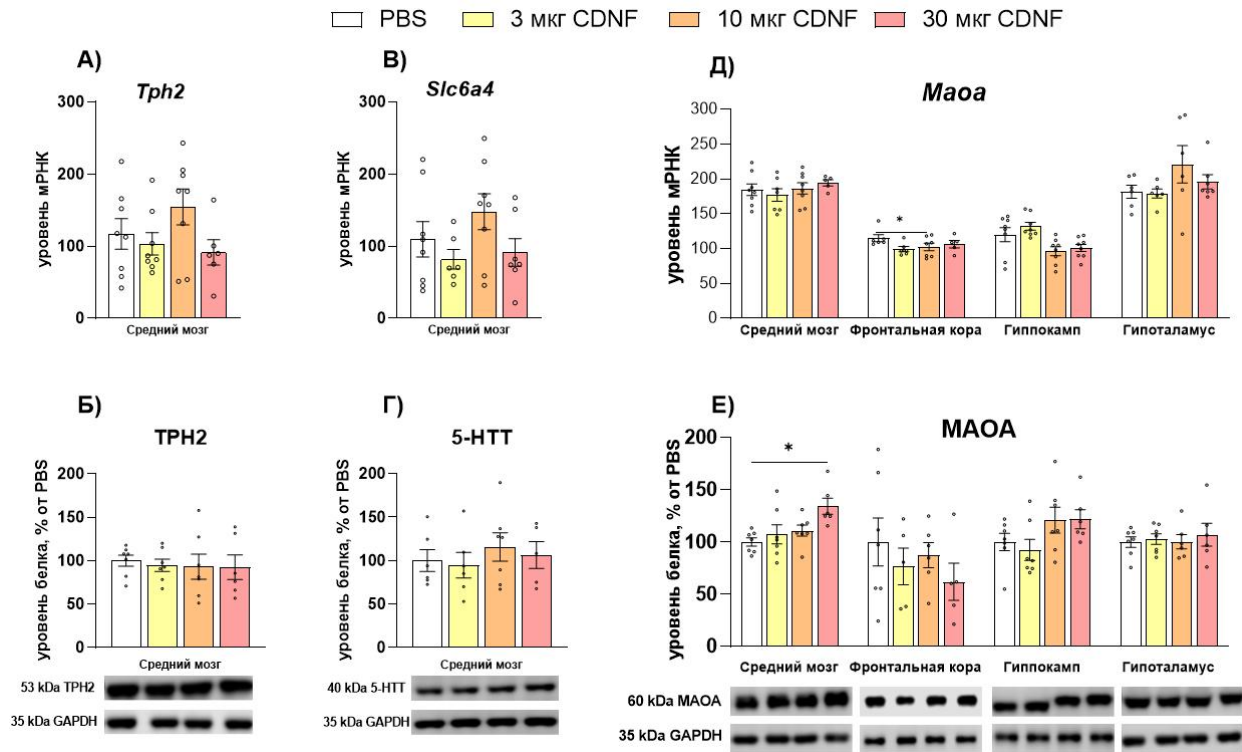


Рис. 13 Уровни мРНК генов *Trp2* (А), *Slc6a4* (кодирует белок 5-НТТ) (В), *Maoa* (Д), и уровни белка *TPH2* (Б), 5-НТТ (Г), *MAOA* (Е) в исследованных структурах мозга у мышей после внутрижелудочковой инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. \*  $p < 0.05$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

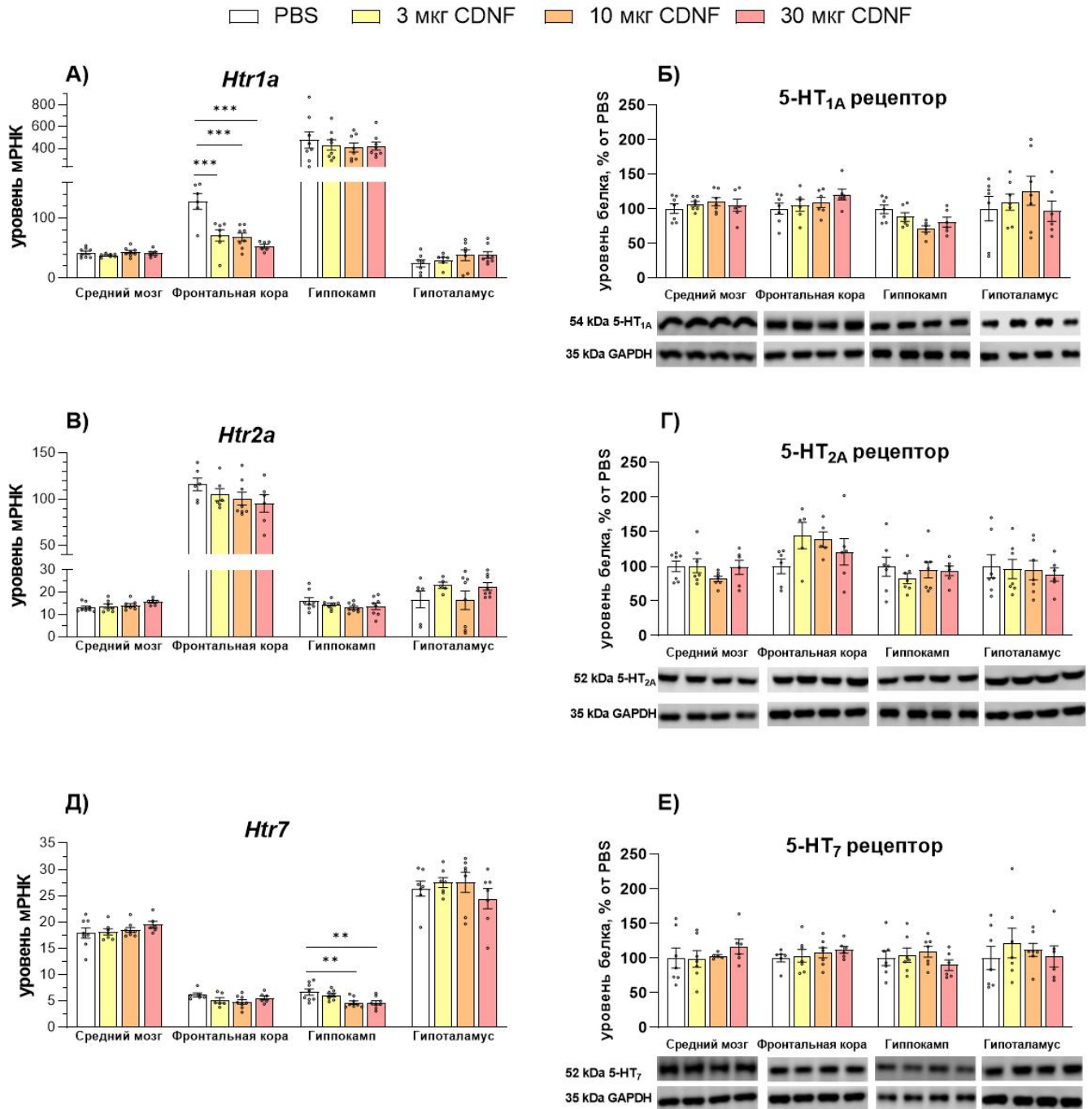


Рис. 14 Уровни мРНК генов *Htr1a* (А), *Htr2a* (В), *Htr7* (Д), и уровни белка 5-HT<sub>1A</sub> рецептора (Б), 5-HT<sub>2A</sub> рецептора (Г) и 5-HT<sub>7</sub> рецептора (Е) в исследованных структурах мозга у мышей после внутривентрикулярной инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

**Эффекты центральной инъекции CDNF на экспрессию генов нейропластичности у мышей**

Инъекция белка CDNF мышам повлияла на уровень мРНК некоторых генов, связанных с нейропластичностью. Так, например, уровень мРНК *Fos* увеличился в исследованных структурах ( $F_{3,26} = 4.27$ ;  $p < 0.05$  для среднего мозга;  $F_{3,21} = 5.66$ ;  $p < 0.01$  фронтальной коры;  $F_{3,28} = 8.57$ ;  $p < 0.001$  гиппокампа;  $F_{3,26} = 4.41$ ;  $p < 0.01$  и гипоталамуса соответственно; Рис. 15А). Уровень же мРНК CREB возрос только в гипоталамусе ( $F_{3,24} = 4.89$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 15Д). Уровень белка с-Fos снижался в среднем мозге ( $F_{3,23} = 3.88$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 15Б), повышался в гипоталамусе ( $F_{3,22} = 3.42$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 15В), при этом наблюдалась тенденция к уменьшению его фосфорилированной формы во фронтальной коре ( $F_{3,22} = 2.82$ ;  $p = 0.06$ ; Рис. 15В) и достоверно повышалось в гипоталамусе ( $F_{3,22} = 3.42$ ;  $p < 0.05$ ; Рис. 15Б). Уровни фосфорилирования белков с-Fos ( $F_{3,21} = 2.66$ ;  $p = 0.07$ ; Рис. 15Г) и CREB ( $F_{3,21} = 2.84$ ;  $p = 0.06$ ; Рис. 15З) имели тенденцию к росту в среднем мозге с эффектом только при максимальных дозах CDNF. Можно предположить, что именно фосфорилирование CREB и с-Fos сыграло роль в улучшении уровня ассоциативного обучения у мышей.

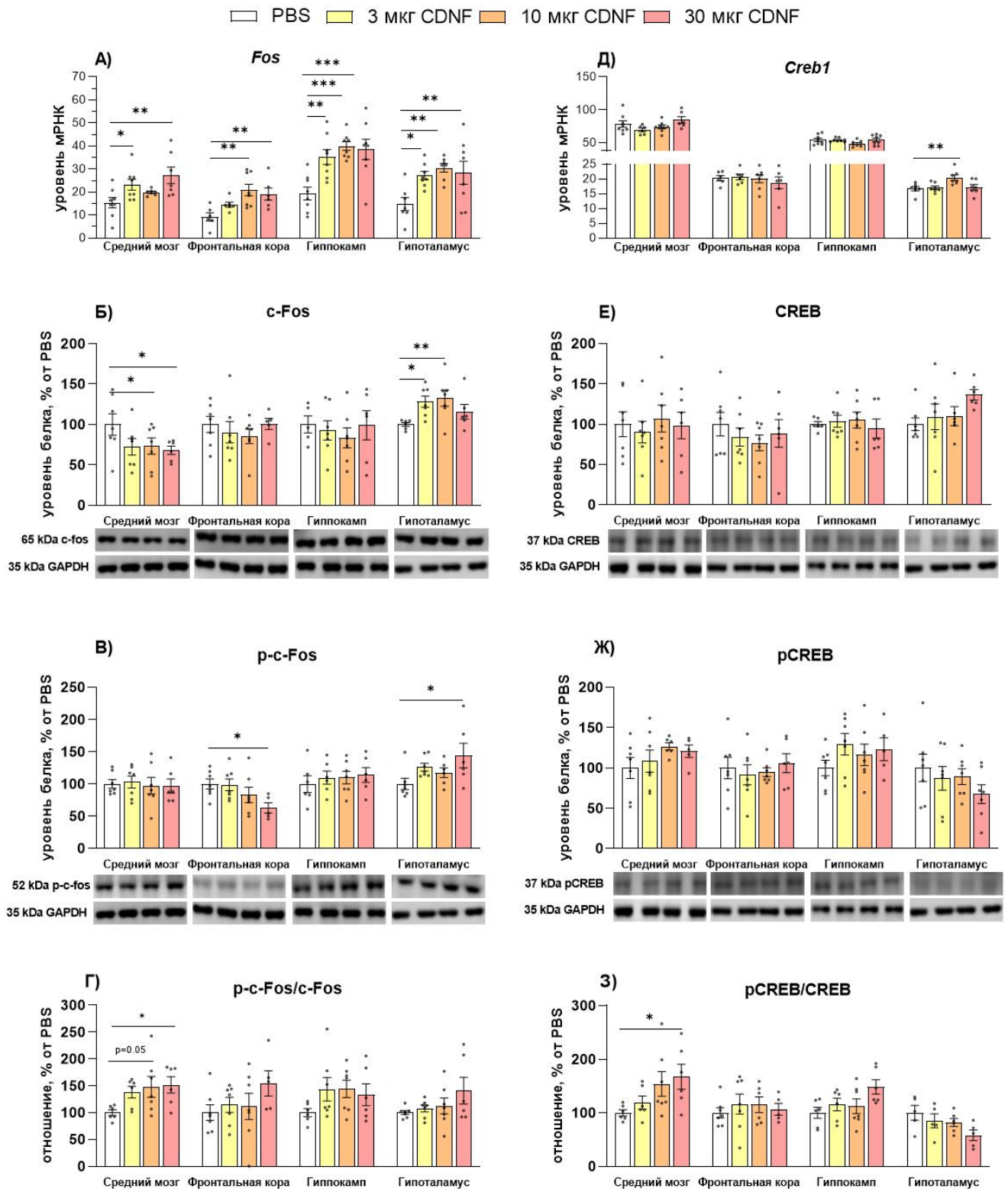


Рис. 15 Уровни мРНК генов *Fos* (А), *Creb* (Д), белков *c-Fos* (Б) *CREB* (Е), их фосфорилированных форм (В, Ж) и их отношение (Г, З) в исследованных структурах мозга у мышей после внутривentricular инъекции PBS или 3, 10 или 30 мкг CDNF. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. (А-Ж) \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc)

по Фишеру). (Г,З)  $*p < 0.05$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Даннету). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Эффекты центральной инъекции CDNF на уровень мРНК генов UPR у мышей

В качестве маркера активации реакции на резвернутые белки (UPR) были измерены уровни мРНК генов *Hspa5*, *Atf6*, *Eif2ak3*, *Ern1*, *Xbp1*. Отношение уровня мРНК сплайсированной формы гена *Xbp1* к несплайсированной форме (Рис. 16Д) возрастало в среднем мозге ( $F_{3,28} = 4.21$ ;  $p < 0.05$ ) и фронтальной коре ( $F_{3,27} = 4.10$ ;  $p < 0.05$ ), падало в гиппокампе ( $F_{3,27} = 4.04$ ;  $p < 0.05$ ) и не изменялось в гипоталамусе. В среднем мозге возрастал уровень мРНК гена *Hspa5* ( $F_{3,25} = 6.34$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 16А), во фронтальной коре снижался уровень мРНК *Atf6* ( $F_{3,24} = 6.89$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 16В), в гиппокампе снижались уровни мРНК *Eif2ak3* ( $F_{3,28} = 8.96$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 16Б) и *Ern1* ( $F_{3,28} = 4.27$ ;  $p < 0.01$ ; Рис. 16Г). Таким образом, CDNF оказывает структуроспецифический эффект на гены каскада UPR

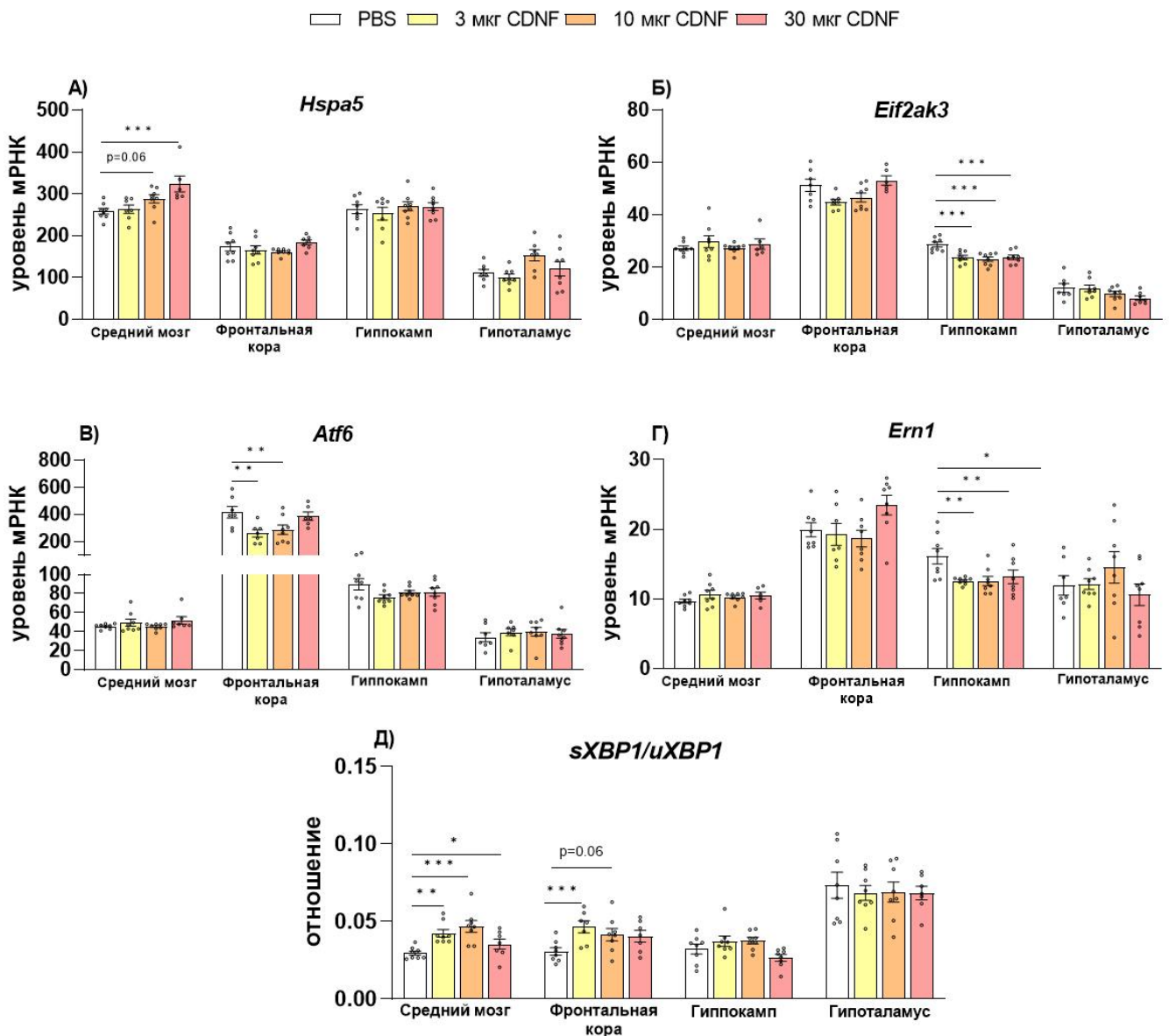


Рис.16 Уровни мРНК генов *Hspa5* (кодирует белок GRP78) (А), *Eif2ak3* (кодирует белок PERK) (Б), *Atf6* (В) и *Ern1* (кодирует белок IRE1) (Г), а также отношение уровня мРНК сплайсированной формы гена *Xbp1* к нессплайсированной форме (Д) в исследованных структурах мозга у мышей после внутрижелудочковой инъекции 3, 10 или 30 мкг CDNF или PBS. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, *post-hoc* по Фишеру). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Индукция сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе мышей

Инъекция аденоассоциированного вирусного конструктора AAV-Syn-CDNF-EGFP в гиппокамп мышей вызвала сверхэкспрессию *Cdnf* как на уровне мРНК ( $t=15.79$ ;  $df=16$ ,  $p<0.001$ ) (Рис. 17А), так и на уровне белка ( $t=4.63$ ;  $df=13$ ;  $p<0.001$ ) (Рис. 17Б). Кроме того, было показано, что данный CDNF колокализуется с кальретикулином, являющимся белком-маркером ЭПР (Рис. 17В).

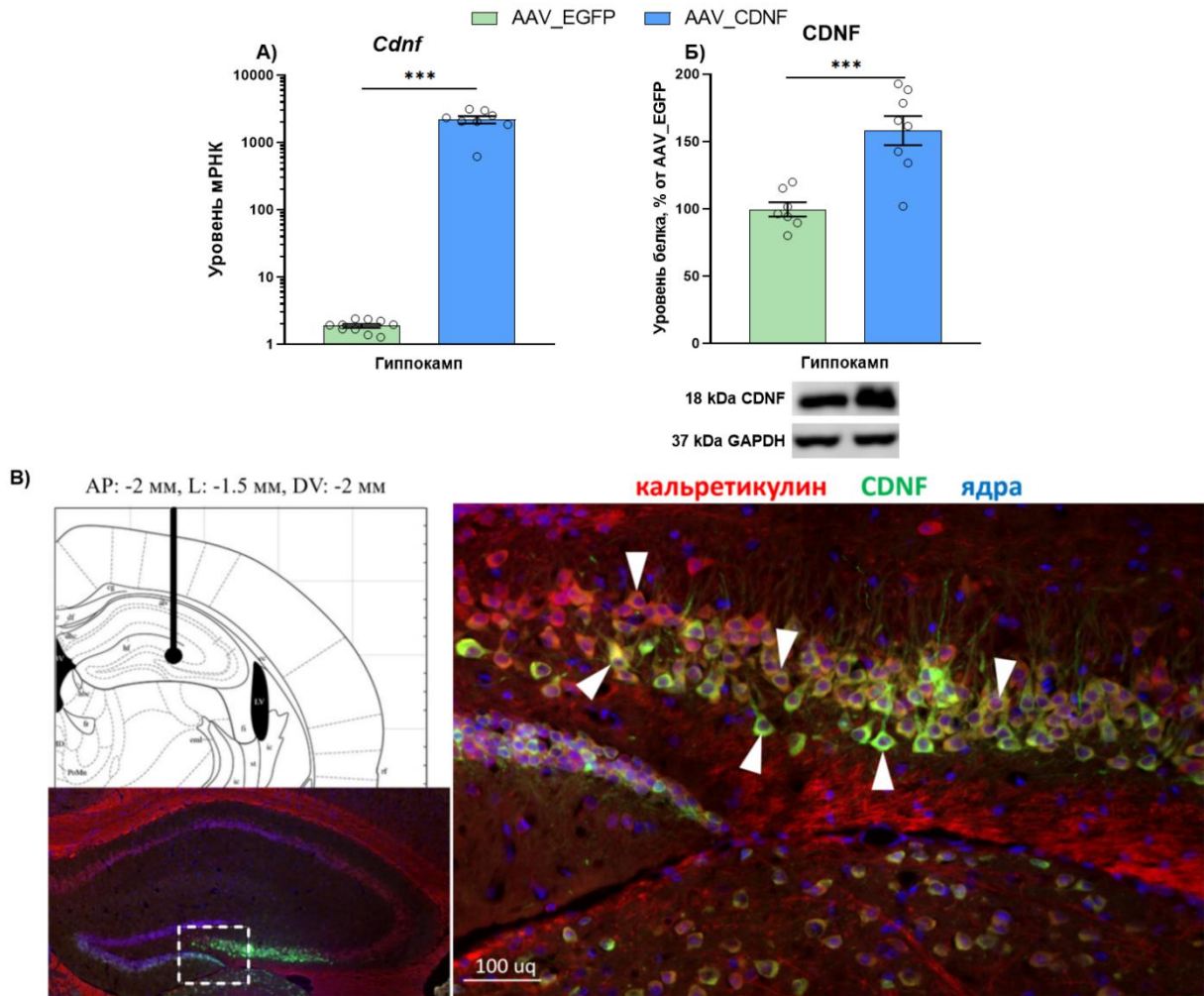


Рис. 17 Уровень мРНК *Cdnf* (А), уровень белка CDNF (Б) в гиппокампе, а также иммуногистохимическое окрашивание срезов гиппокампа антителами к CDNF и

кальретикулину у мышей групп *AAV\_CDNF* и *AAV\_EGFP*. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка *GAPDH*. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### ***Тестирование мышей со сверхэкспрессией белка CDNF в гиппокампе в условиях домашней клетки***

Тестирование в установке PhenoMaster показало, что сверхэкспрессия белка CDNF у мышей не вызывает изменений ни в двигательной активности (Рис. 18Г), ни в потреблении пищи (Рис. 18Д), и воды (Рис. 18Е). Взаимодействие факторов «группа x время» также не обнаружено для суточного пройденного пути (Рис. 18А), для суточного потребления пищи (Рис. 18Б) и для суточного потребления воды (Рис. 18В).

Сверхэкспрессия белка CDNF не повлияла на среднюю продолжительность (Рис. 19Б) и количество эпизодов сна (Рис. 19Г) у экспериментальных животных. При этом все также видна разница между дневной и ночной продолжительностью сна ( $F_{1,20} = 360$ ,  $p < 0.001$ ) и числом эпизодов сна ( $F_{1,20} = 323$ ,  $p < 0.001$ ), что отражает особенности циркадных ритмов ночных животных (Рис. 19А,В). Мы видим, что сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не привела к каким-либо нарушениям сна, в отличие от инъекции белка CDNF.

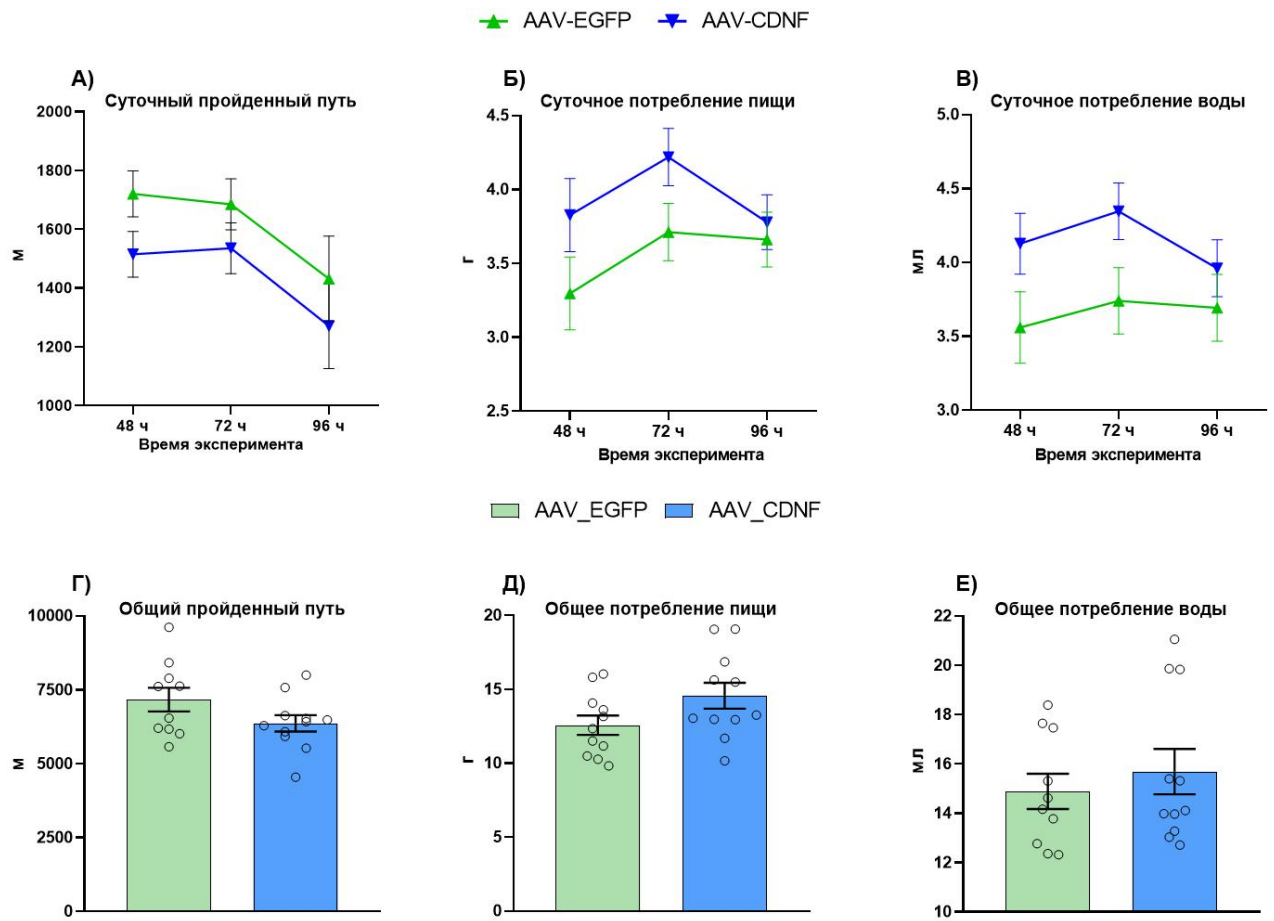


Рис. 19 Эффект сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на ежедневный (A) и общий (Г) пройденный путь, ежедневное (Б) и общее (Д) потребление пищи, ежедневное (B) и общее (E) потребление воды у мышей групп AAV\_CDNF и AAV\_EGFP. (ANOVA для повторных изменений и критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

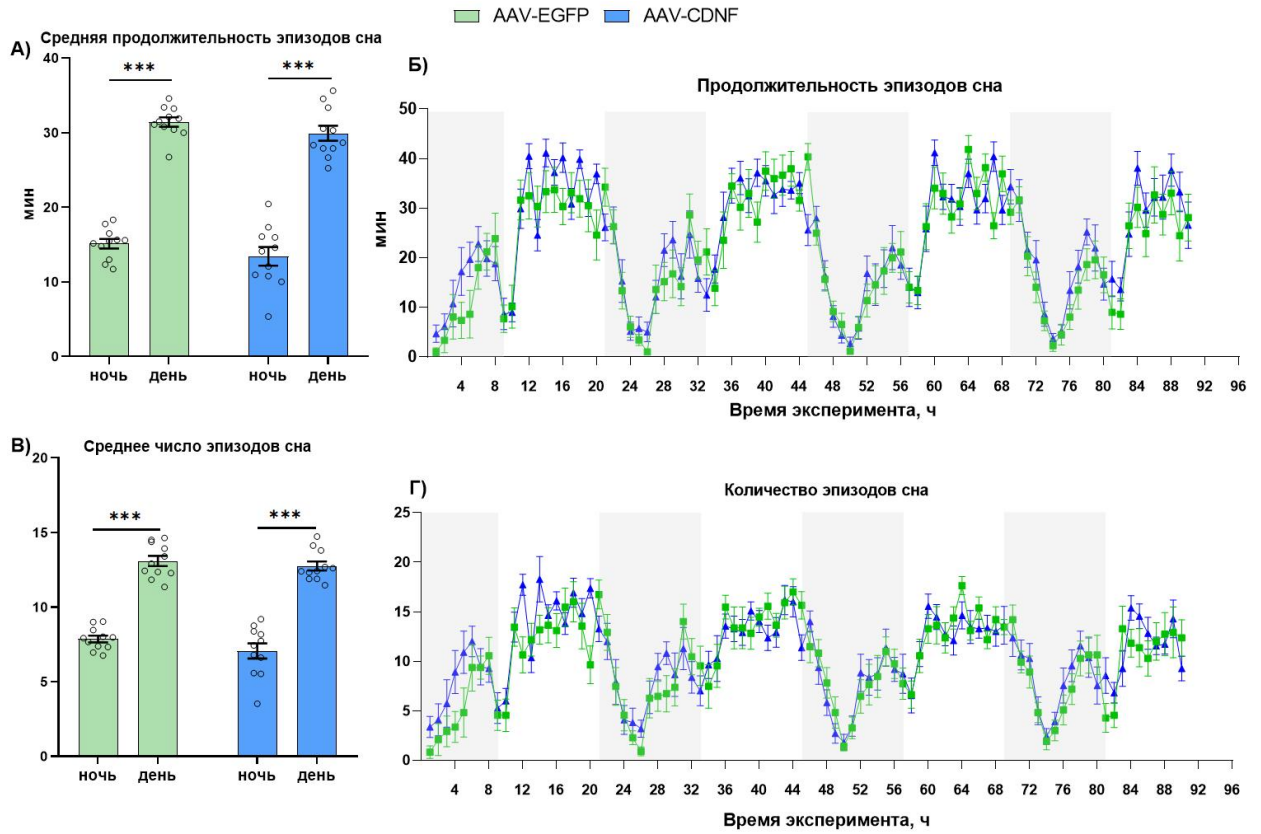


Рис. 19 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе на среднюю продолжительность эпизода сна в течение каждого часа светлой и темной фазы суток у мышей (A),  $*** p < 0.001$  ночь по сравнению с днем. Ежечасная продолжительность сна (B). Среднее число эпизодов сна в течение каждого часа светлой и темной фазы суток у мышей (C),  $*** p < 0.001$  ночь по сравнению с днем. Ежечасное количество эпизодов сна (D). (ANOVA для повторных изменений, *post-hoc* по Фишеру). На графиках с динамикой продолжительности сна и количеством эпизодов сна темная фаза суток закрашена серым цветом. Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

В отличие от экзогенного белка CDNF, эндогенный белок CDNF не вызвал улучшения ассоциативного обучения (Рис. 20). Количество тычков носом, общее время тычков носом и количество полученных пеллет статистически не отличались.

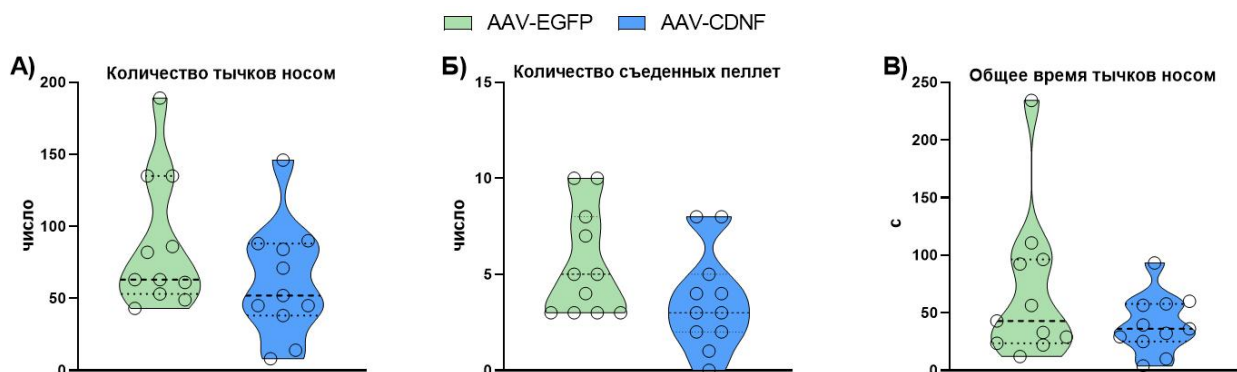


Рис. 20 Эффект сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на ассоциативное обучение в тесте «оперантная стенка» у мышей. Число тычков носом (А), общее время тычков носом (Б) и число полученного вознаграждения (пеллеты (В)). Скрипичные диаграммы отражают ненормальное распределение выборки. (U-критерий Манна-Уитни). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Поведенческое тестирование мышей со сверхэкспрессией белка CDNF в гиппокампе

Сверхэкспрессия белка CDNF не вызвала каких-либо изменений в тесте «открытое поле» (Рис. 21). Так, общий путь, исследованная площадь арены, время в центре, число вертикальных стоек и груминга не отличались. Также не было обнаружено никаких значимых отличий в «приподнятом крестообразном лабиринте» (Рис. 22): не различались общий путь, время в закрытых рукавах, исследованная площадь закрытых рукавов, исследованная площадь открытых рукавов, число выглядывания из закрытых рукавов, время выглядываний из закрытых рукавов, латентное время выглядывания из закрытых и время проведенное в открытых рукавах.

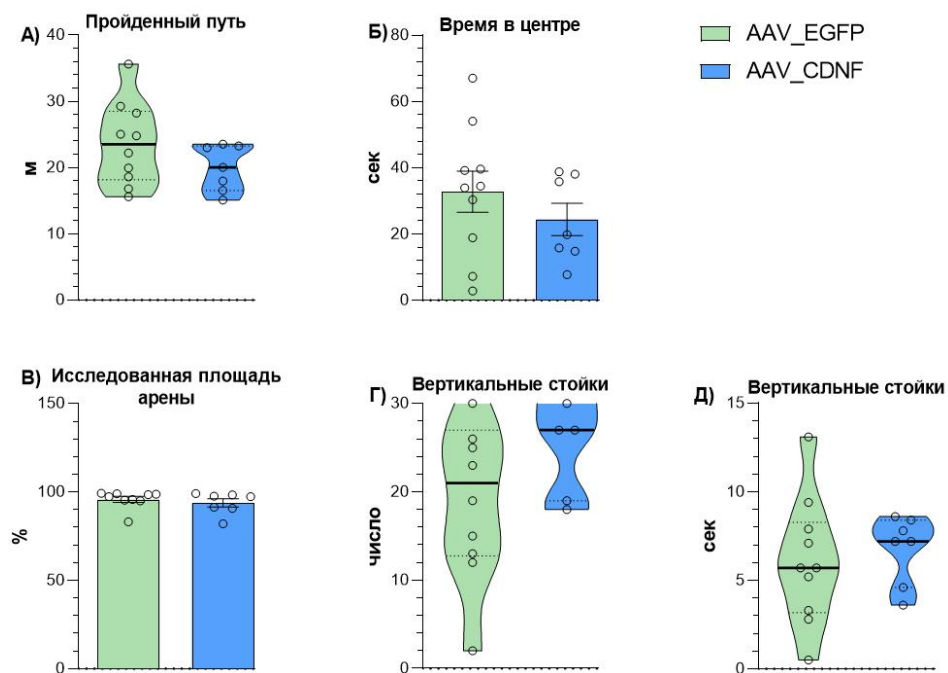


Рис. 21 Эффекты сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе в тесте «открытое поле» у мышей. Пройденный путь (А), исследованная площадь арены (Б), время в центре арены (В), число вертикальных стоек (Г) и число эпизодов груминга (Д). Скрипичные диаграммы отражают ненормальное распределение выборки. (U-критерий Манна-Уитни для ненормального распределения выборки, критерий Стьюдента для нормального распределения выборки). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

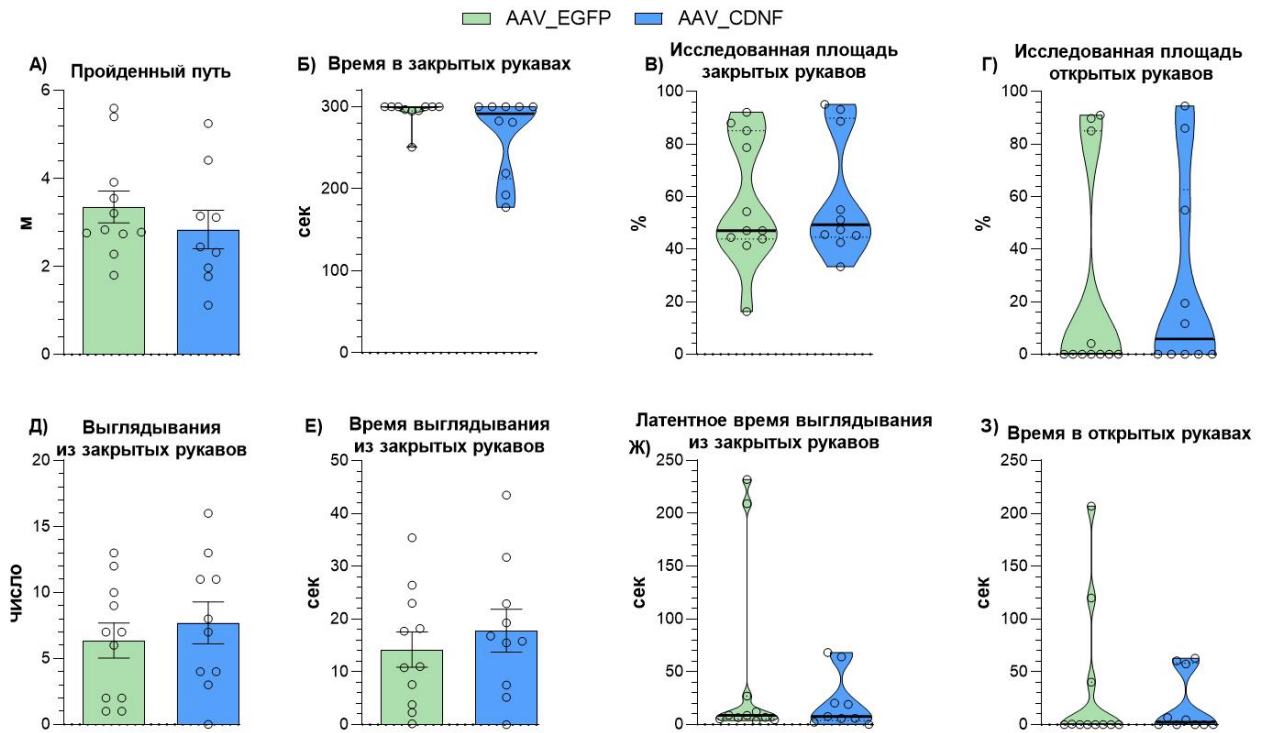


Рис. 22 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе у мышей в приподнятом крестообразном лабиринте. Пройденный путь (А), исследованная площадь открытых рукавов (Б) время, проведенное в открытых рукавах (В), исследованная площадь закрытых (Г), число выглядываний из закрытых рукавов (Д), время выглядываний из закрытых рукавов (Е), латентное время выглядываний из закрытых рукавов (Ж) и время, проведенное в закрытых рукавах (З). Скрипичные диаграммы отражают ненормальное распределение выборки. (U-критерий Манна-Уитни для ненормального распределения выборки, критерий Стьюдента для нормального распределения выборки). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

У животных со сверхэкспрессией белка CDNF возросло время неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» ( $t=2.66$ ;  $df=16$ ;  $p<0.05$ ), что может отражать большую выраженность поведенческого отчаяния. Количество эпизодов неподвижности не отличалось (Рис. 23).

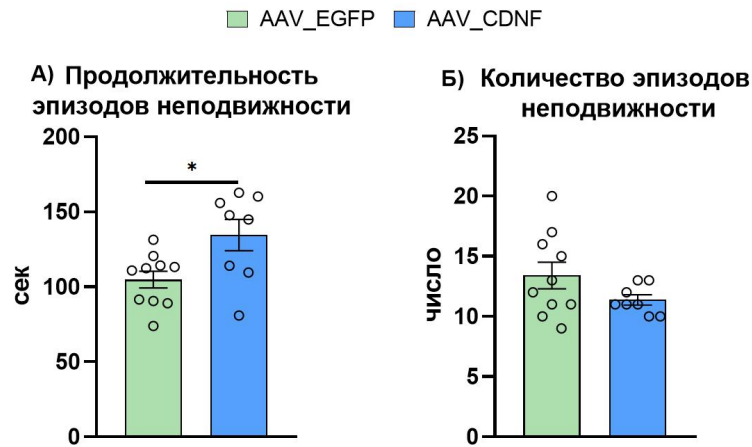


Рис. 23 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе у мышей на время неподвижности (А) и число эпизодов неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» (В). Скрипичные диаграммы отражают ненормальное распределение выборки. (U-критерий Манна-Уитни для ненормального распределения выборки, критерий Стьюдента для нормального распределения выборки). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

Сверхэкспрессия белка CDNF не вызвала изменений в неофобии, врожденном страхе перед новыми объектами, местами или пищей, в тесте на распознавание нового объекта (Рис. 24А), однако положительный эффект на социальный интерес. Так, в трехкамерном тесте повысился индекс социального предпочтения ( $t=2.22$ ;  $df=12$ ;  $p<0.05$ ) (Рис. 24Б). В подтверждение данного эффекта в тесте «резидент-интродер» выросло количество ( $U=19$ ;  $p<0.05$ ; Рис. 25В) и продолжительность ( $U=16$ ;  $p<0.05$ ; Рис. 25Г) контактов между животными.

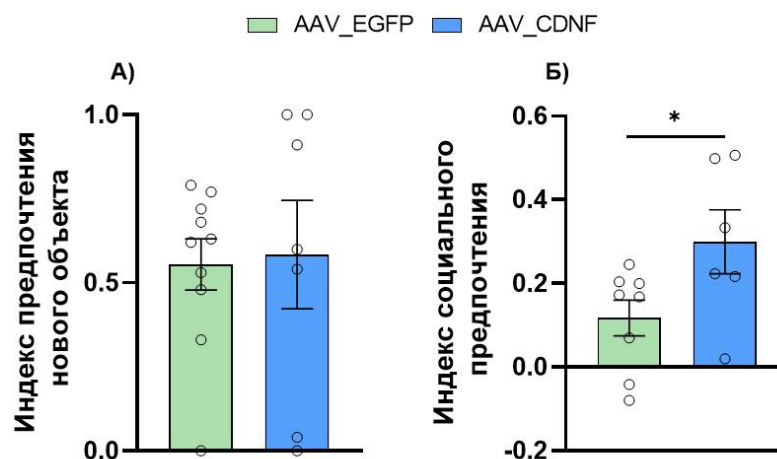


Рис. 24 Эффект сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе у мышей на неофобию в тесте распознавание нового объекта (А) и индекс социального предпочтения в трехкамерном социальном тесте (Б). (критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

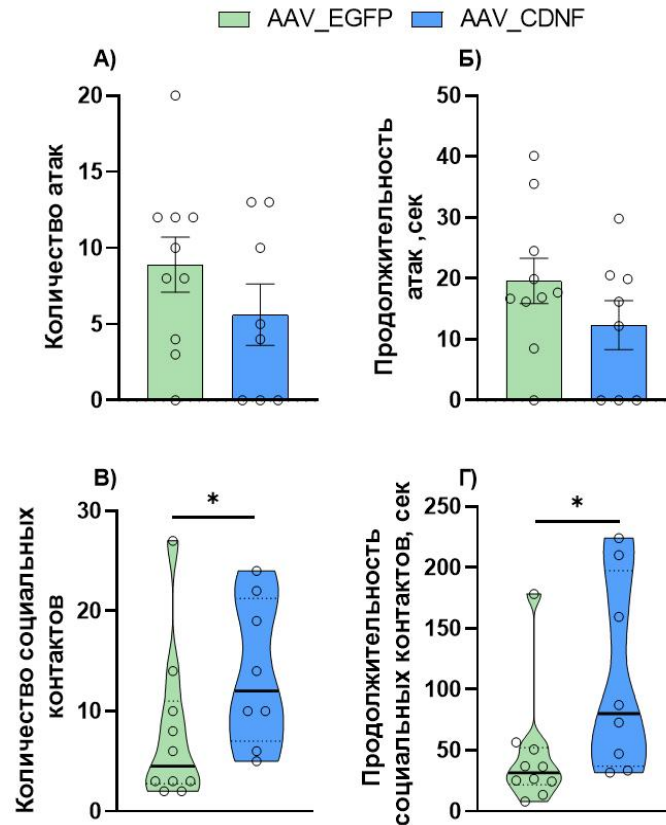


Рис. 25 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе у мышей на социальные взаимодействия в тесте «резидент-интродер». Количество (А) и продолжительность (Б) атак, количество (В) и длительность обнюхиваний (Г).  $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой. Скрипичные диаграммы отражают ненормальное распределение выборки. (U-критерий Манна-Уитни для ненормального распределения выборки, критерий Стьюдента для нормального распределения выборки). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

Введение вирусного конструкта AAV-Syn-CDNF-EGFP не оказало эффекта на пространственное обучение в водном лабиринте Морриса (Рис. 26). Дистанция (расстояние до платформы в каждый момент времени) (Рис. 26А), также как и пройденный путь (Рис. 26Б) и время нахождения платформы (Рис. 26В) не отличались между опытной и контрольной группами. К пятому дню животные одинаково проводили больше времени в целевом секторе по сравнению с противоположным ( $F_{1,32}=48.05$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 26Г) и со случайным (25%) ( $F_{1,32}=25.29$ ;  $p < 0.001$ ; Рис. 26Г), однако на это не влиял факт сверхэкспрессии CDNF. Как мы видим, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не оказала такого эффекта на пространственное обучение, как инъекция белка CDNF внутрь желудочка. По-видимому, эффект CDNF зависит и от способа доставки и от типа обучения.

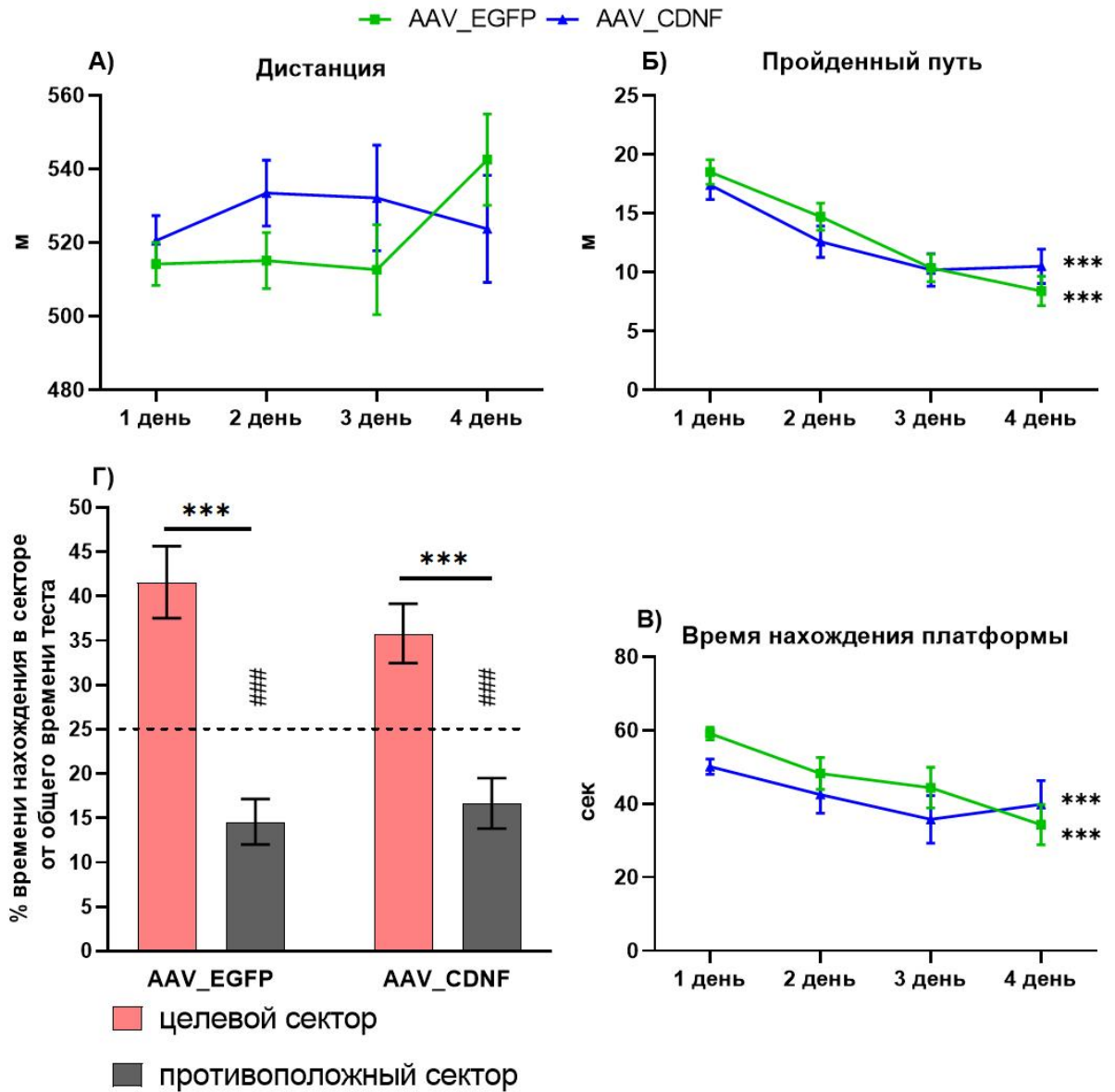


Рис. 26 Эффект сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на пространственное обучение в водном лабиринт Морриса у мышей. Кумулятивная дистанция до платформы (А), пройденный путь (Б), \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с первым днем (ANOVA для повторных изменений, *post-hoc* по Фишеру); время нахождения платформы (В), \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с первым днем (ANOVA для повторных изменений, *post-hoc* по Фишеру); % времени нахождения в целевом секторе на 5-ый день от общего времени теста (Г) \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с противоположным сектором, ###  $p < 0.001$  по сравнению с 25% (случайный сектор) (критерий Стьюдента с коррекцией Бонферонни). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

**Влияние сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе мышей на ферменты метаболизма серотонина и экспрессию его рецепторов**

Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не вызвала изменений в уровне мРНК и белка фермента синтеза серотонина и его транспортера (Рис. 27 А-Г), а также фермента катаболизма MAOA (Рис. 27 Д,Е) в среднем мозге.

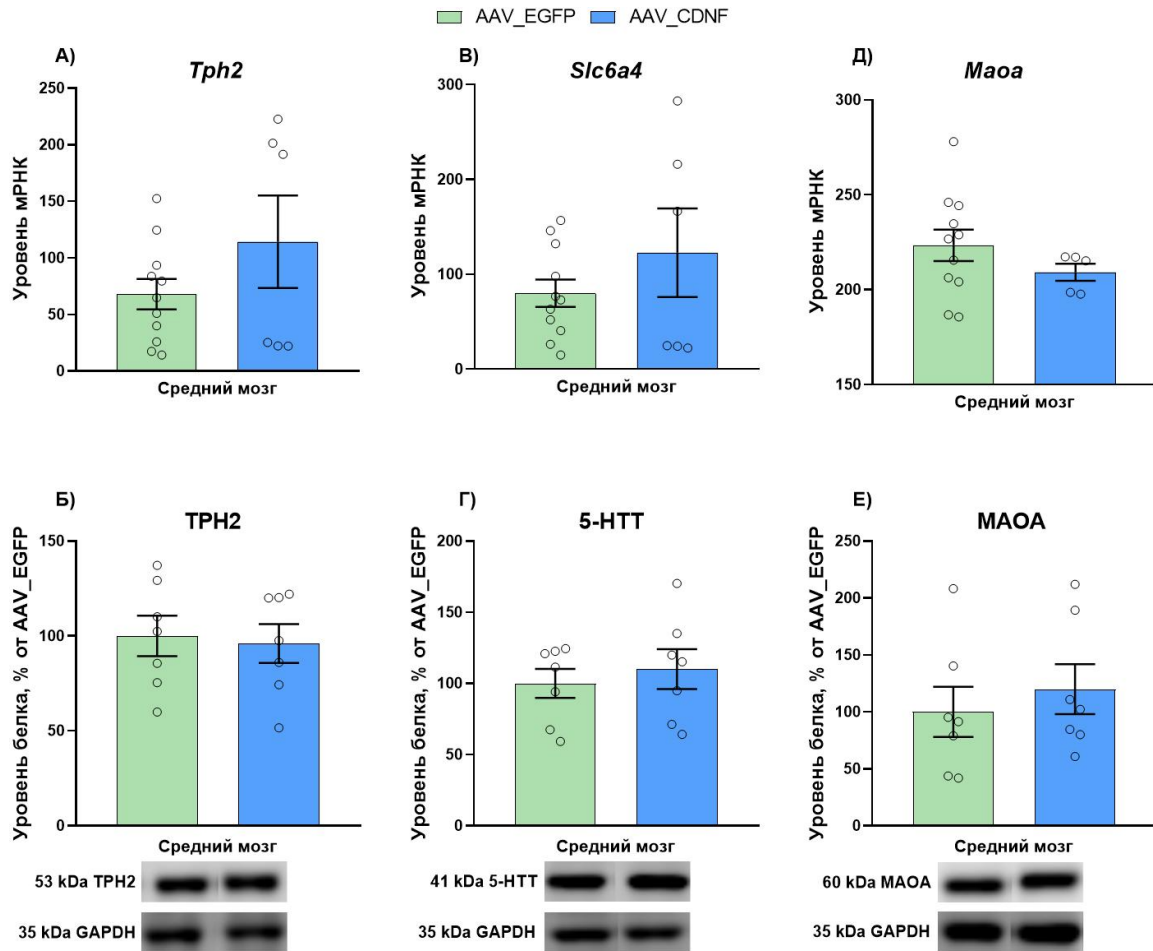


Рис. 27 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе на уровни мРНК генов *Trh2* (А), *Slc6a4* (кодирует белок 5-НТТ) (В), *Maoa* (Д), и уровни белка TRH2 (Б), 5-НТТ(Г), MAOA (Е) в исследованных структурах у мышей. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. (критерий Стьюдента) Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не вызвала масштабных изменений в экспрессии генов серотониновой системы, за исключением уменьшения уровня мРНК гена *Htr1a* ( $t=2.468$ ;  $df=16$ ;  $p<0.05$ ; Рис. 27А), что, однако, не отразилось в уровне белка 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора. Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не повлияла на экспрессию генов синтеза и распада серотонина в среднем мозге, однако обнаруженные изменения в поведении могут быть опосредованы уменьшением уровня мРНК *Htr1a* в гиппокампе.

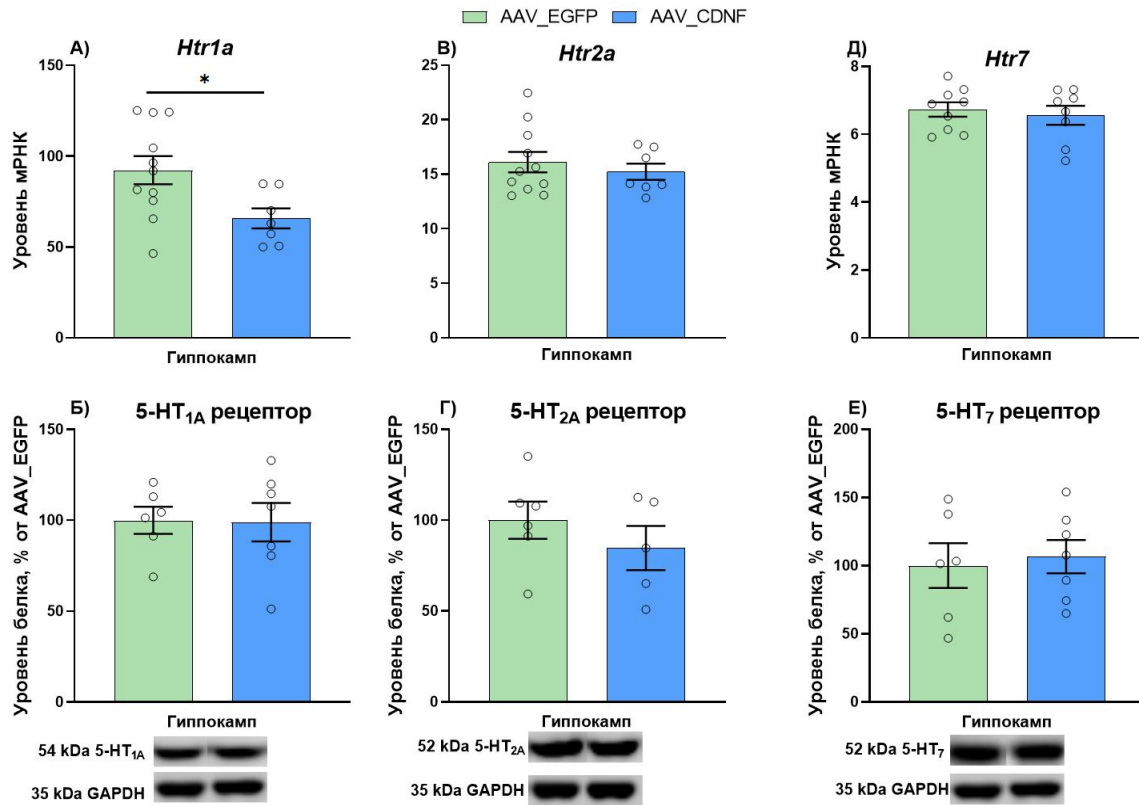


Рис. 28 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе на уровни мРНК генов *Htr1a* (А), *Htr2a* (В), *Htr7* (Д), и уровни белка 5-НТ<sub>1А</sub> рецептора (Б), 5-НТ<sub>2А</sub> рецептора (Г) и 5-НТ<sub>7</sub> рецептора (Е) в исследованных структурах мозга у мышей. Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. \* $p < 0.05$  (критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Влияние сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе мышей на гены нейропластичности

В отличие от инъекции белка CDNF, его сверхэкспрессия в гиппокампе не вызывала изменений в уровне мРНК генов раннего ответа *Fos* и *Creb1*, уровне их белков, а также фосфорилировании этих белков (Рис. 29).

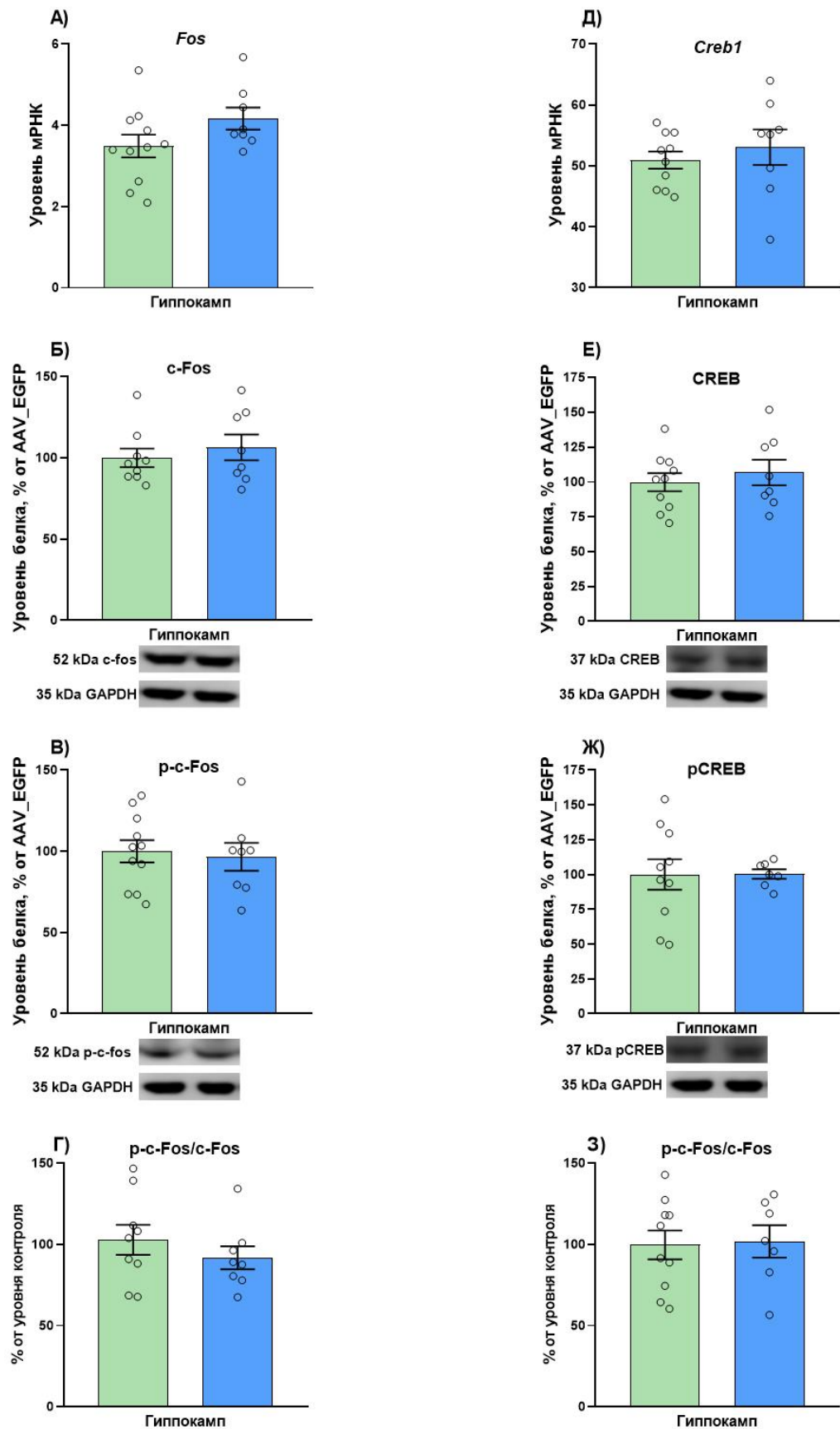
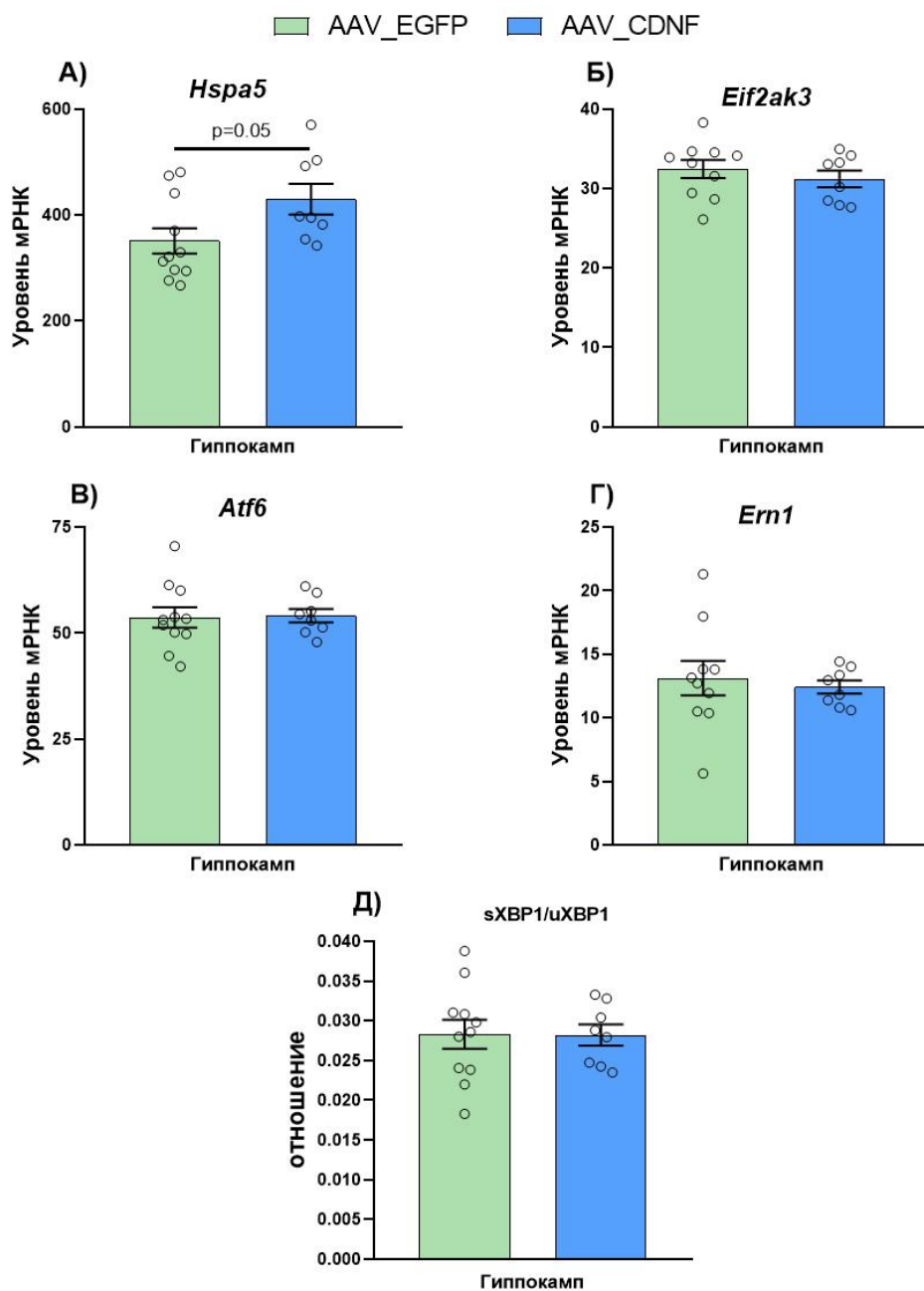


Рис. 29 Эффекты сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе у мышей на уровне мРНК генов *Fos* (А), *Creb1* (Д), белков *c-Fos* (Б) *CREB* (Е), их фосфорилированных форм (В, Ж) и их отношение (Г, З). Уровни белка представлены в относительных единицах, нормализованных на

соответствующий уровень белка GAPDH. Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена *Polr2a*. (критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .

### Влияние сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе мышей на гены UPR

Введение вирусного конструкта AAV-Syn-CDNF-EGFP вызвало увеличение уровня мРНК *Hspa5* ( $t=2.10$ ;  $df=17$ ;  $p=0.05$ ; Рис. 31А), экспрессия же других генов, связанных с UPR, осталась без изменений (Рис. 31). Таким образом, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не вызвала таких разнонаправленных изменений в уровнях мРНК генов, участвующих в реакции UPR, как в случае i.c.v. инъекции белка CDNF.



*Рис. 31 Эффекты сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе у мышей на уровни мРНК генов Hspa5 (кодирует белок GRP78) (А), Eif2ak3 (кодирует белок PERK) (Б), Atf6 (В) и Ern1 (кодирует белок IRE1) (Г), а также отношение уровня мРНК сплайсированной формы гена Xbp1 к несплайсированной форме (Д). Уровень мРНК представлен как число копий гена, отнесенное на 100 копий гена Polr2a. (критерий Стьюдента). Данные представлены как  $M \pm SEM$ .*

## Глава 4 Обсуждение результатов

Полученные данные показывают, что при однократном центральном введении экзогенный CDNF не вызывает существенных физиологических нарушений – потребление воды, пищи, двигательная активность животных остается в пределах нормы. Однако, снижение времени сна в дневную фазу у животных из группы, получившей 3 мкг CDNF, без изменения числа эпизодов сна, как и изменений в общей двигательной активности животных, свидетельствует о нарушении цикла сон/бодрствование. Вместе с тем, изучение продолжительности сна за сутки за все время эксперимента демонстрирует наиболее сильный эффект в первый день тестирования. Ранее нами было показано, что однократное центральное введение CDNF в дозе 10 мкг не имело долговременных (через 10 суток) эффектов на сон/бодрствование. Однако, эффект был замечен в первые сутки эксперимента (Eremin et al., 2019). Это выгодно отличает CDNF от другого нейротрофического фактора – GDNF. Последний также рассматривается в качестве перспективного средства терапии болезни Паркинсона (Huttunen and Saarna, 2019). Хроническое введение CDNF в скорлупу стриатума пациентов с БП не вызвало сильных побочных эффектов, связанных с самим НТФ (Huttunen et al., 2023). При введении рекомбинантного белка GDNF в желудочки мозга у животных и людей наблюдались многочисленные побочные эффекты, в том числе связанные с нарушением пищевого поведения и цикла сон/бодрствование (Allen et al., 2013). Несмотря на то, что мы наблюдаем снижение веса у животных в данной работе, через 10 дней он стабилизируется (Eremin et al., 2019), таким образом, наши данные показывают, что в отличие от GDNF, CDNF гораздо безопаснее при центральном введении.

При этом сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе никоим образом не повлияла ни на потребление воды и пищи, ни на циклы сна/бодрствования. Что также говорит об отсутствии нежелательных побочных эффектов. Например, сверхэкспрессия белка GDNF на сегодняшний день, также не вызывает негативных эффектов, однако этому предшествовали множество работ, где было показана важность количества эндогенного или экзогенного белка (Matlik et al., 2018; Marshall, 2023 ).

В тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» животные, получившие инъекцию белка CDNF, больше времени проводили в центре арены и открытых рукавах, что свидетельствует об антитревожном эффекте. В тесте «принудительного плавания» у экспериментальных животных снижалось время неподвижности, что в нашем случае говорит о снижении поведенческого отчаяния. В этом аспекте эффекты CDNF очень схожи с действием других классических НТФ. Центральное введение BDNF мышам линии ASC (генетическая модель депрессивно-подобного поведения) снижало время неподвижности в тесте

«подвешивание за хвост» даже спустя 17 дней после введения, что говорит об антидепрессивном эффекте. Также важно отметить, что введение BDNF не повлияло на поведение не депрессивной родительской линии CBA (Naumenko et al., 2012).

Интересные результаты были получены в тесте «Оперантная стенка». Однократное введение CDNF в каждой из концентраций значительно улучшало эффективность выполнения задачи животными. Мыши совершали большее число тычков носом, а также получали большее количество пеллет. Поскольку «Оперантная стенка» представляет собой тест на ассоциативное обучение, на основе полученных данных можно сделать вывод, что однократная инъекция рекомбинантного белка CDNF улучшает когнитивные способности животных. Важно отметить, что, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не оказала такого положительного эффекта на ассоциативное обучение.

Обучение является фундаментальным процессом для всех живых организмов, поскольку помогает адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Одним из его ключевых регуляторов является нейротрансмиттер серотонин. 5-НТ система является одной из самых экспансивных нейротрансмиттерных систем, отвечающей за многие физиологические функции и паттерны поведения: агрессия, пищевое поведение, половое поведение, сон/бодрствование, температура, обучение и память (Berger et al., 2009; Artigas, 2015). Большинство тел серотонинергических нейронов находятся в дорсальном и медиальном ядрах шва, но они посылают аксоны почти ко всем областям мозга, включая, кору, лимбическую систему, средний и задний мозг (Charnay and Léger, 2010). Плейотропные поведенческие эффекты 5-НТ опосредованы по меньшей мере 14 подтипами 5-НТ рецепторов. Эти рецепторы распределены практически по всему мозгу и регулируют многие физиологические процессы посредством различных, иногда противоположных сигнальных путей (Vacqué-Cazenave et al., 2020).

5-НТ<sub>1A</sub> рецептор является одним из наиболее изученных подтипов серотониновых рецепторов благодаря его влиянию на поведение. Например, 5-НТ<sub>1A</sub> рецептор принимает участие в механизмах тревожности, депрессии (Pорова and Naumenko, 2013), а также в когнитивных процессах, которые нарушаются при некоторых психических расстройствах (Ögren et al., 2008; Millan et al., 2012). 5-НТ<sub>1A</sub> рецепторы широко распространены по всей ЦНС и присутствуют как в пре-, так и в постсинаптических окончаниях. Пресинаптически 5-НТ<sub>1A</sub> рецепторы расположены исключительно на телах и дендритах 5-НТ нейронов в дорсальном и срединном ядрах шва (Riad et al., 2000) и функционируют в качестве ауторецепторов, которые ингибируют активность 5-НТ нейронов.

При помощи ВЭЖХ анализа мы обнаружили, что в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе значительно повышается индекс катаболизма 5-НТ после однократного центрального введения белка CDNF.

Известно, что 5-НТ в области префронтальной коры принимает участие в регуляции внимания. В частности, острое истощение серотонина у людей улучшает контроль внимания (Scholes et al., 2007). В работах, где исследовали влияние агониста 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора на формирование памяти страха, показано, что постсинаптическая активация рецептора ухудшает кодирование памяти о нежелательном опыте (Stiedl et al., 2015). В целом, большинство исследований сходится на том, что, общее снижение префронтальной активности 5-НТ<sub>1A</sub> рецепторов при одновременном повышении уровня самого 5-НТ полезно для внимания (Puig and Gullledge, 2011).

Известно, что введение нейротрофического фактора BDNF в средний мозг или в желудочки мозга у крыс повышает уровни 5-ГИУК в гиппокампе, стриатуме, коре и черной субстанции (Siuciak et al., 1996). Аналогично, было увеличено соотношение 5-ГИУК/5-НТ, что свидетельствует о повышенном обмене 5-НТ (Homberg et al., 2014). Не смотря на увеличение уровня мРНК гена *Htr1a* во фронтальной коре после инъекции CDNF, экспрессия самого 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора не изменилась. И хотя уровень мРНК 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора во фронтальной коре снизился у экспериментальных животных, получивших инъекцию CDNF, уровень белка не изменился. Можно предположить, что введение CDNF привело к некоторому снижению функциональной активности данного рецептора. Так, например, в зависимости от генотипа животных центральное введение BDNF может снижать функциональную активность 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора (Vazovkina et al., 2021). Вместе с увеличением уровня мРНК MAOA в коре все это могло оказать «растормаживающий» эффект на обмен 5-НТ и усилить секрецию данного нейромедиатора в проекционных областях, следствием чего стало накопление там метаболита 5-ГИУК и существенное повышение индекса катаболизма. Согласно литературным данным, увеличение обмена серотонина в коре улучшает когнитивные способности животных и человека (Puig et al., 2011). Можно предположить, что именно этот факт повлиял на улучшение ассоциативного обучения в тесте «Оперантная стенка» животных, получивших инъекцию рекомбинантного белка CDNF в нашем эксперименте.

5-НТ<sub>7</sub> рецепторы вовлечены в механизмы депрессивно-подобного поведения и тревожности. Кроме того, есть доказательства их участия в процессы обучения и запоминания (Leopoldo et al., 2011). Интересно, что исследования с использованием мышей, нокаутированных по 5-НТ<sub>7</sub> рецептору, выявили его значительную роль в гиппокамп-зависимой памяти (Roberts et al., 2004; Sarkisyan and Hedlund, 2009). Введение антагониста 5-НТ<sub>7</sub> рецепторов SB-269970 ускорило элиминацию реакции пассивного избегания (Eriksson et al.,

2008), а введение антагониста 5-HT<sub>1A</sub> рецептора NAD-299 и агониста 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>7</sub> рецепторов 8-OH-DPAT способствовало более долгому сохранению реакции пассивного избегания (Eriksson et al., 2008). На модели болезни Альцгеймера показано, что 30-дневное последовательное центральное введение агониста 5-HT<sub>7</sub> рецептора AS19 улучшало распознавание в тесте «новый объект», а также реакцию пассивного избегания (Shahidi et al., 2018). В нашей работе мы обнаружили уменьшение уровня мРНК 5-HT<sub>7</sub> рецептора в гиппокампе после введения рекомбинантного белка CDNF. При этом уровень метаболизма 5-HT в данной структуре, наоборот, был увеличен, что могло скомпенсировать уменьшение уровня мРНК 5-HT<sub>7</sub> рецептора. Изменения в динамике потребления воды и пищи, вероятнее всего, вызваны послеоперационной адаптацией. Вместе с этим серотонин может быть непричастен к колебаниям продолжительности сна у мышей, получивших CDNF, поскольку в гипоталамусе, основной структуре ответственной за регуляцию цикла сон/бодрствование, нами не выявлено изменений в обмене 5-HT и экспрессии ключевых генов 5-HT системы. Вероятно, здесь могут быть задействованы иные, нейрогуморальные механизмы, требующие отдельного исследования.

Выявленные нами эффекты CDNF на обучение и обмен 5-HT позволяют сравнить его с эффектами других, классических НТФ. Инъекция BDNF в желудочек мозга снижала уровень мРНК 5-HT<sub>1A</sub> рецептора, но повышала уровень мРНК 5-HT<sub>2A</sub> рецепторов во фронтальной коре. Вместе с этим снижалась тревожность и увеличивалось число социальных контактов у мышей линии AKR (Naumenko et al., 2014). На другой линии мышей, ASC, также было показано, что BDNF увеличивал экспрессию рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> подтипов во фронтальной коре и гиппокампе. У этих же мышей снижалась выраженность каталепсии и депрессивно-подобного поведения (Naumenko et al., 2012). Введение в желудочек мозга мышей другого НТФ – GDNF, привело к росту уровня мРНК 5-HT<sub>2A</sub> рецептора во фронтальной коре и одновременно снижению мРНК 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> рецепторов в гиппокампе мышей ASC, но не родительской линии CBA (Naumenko et al., 2013). Стоит, однако, отметить сильное влияние генотипа животных на эффекты, оказываемые BDNF и GDNF.

Хорошо известно, что BDNF, благодаря способности регулировать нейропластичность и высвобождение нейротрансмиттеров в гиппокампе (Wang and Holsinger, 2018), способствует долгосрочному хранению памяти (Nelson and Alkon, 2015), усиливая рост и реорганизацию дендритных шипиков в ответ на изменение активности нейронов (Phillips et al., 2014). Во многих работах было показано позитивное влияние, которое оказывает BDNF на пространственное (Nelson, Alkon, 2015) и ассоциативное (Andero and Ressler, 2012) обучение у животных. Известно, что и GDNF способен улучшать пространственное обучение животных (Naumenko et al., 2014). Таким образом, эффекты введения белка CDNF во многом схожи с

эффектами других НТФ: увеличение метаболизма 5-НТ, улучшение ассоциативного поведения, антитревожное воздействие.

С другой стороны, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе, не привела к улучшению ассоциативного обучения в тесте «оперантная стенка». В водном лабиринте Морриса, экспериментальные и контрольные животные одинаково справились с задачей. При этом, в аналогичной работе, но с использованием мышей линии ASC, генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению, было продемонстрировано улучшение пространственного обучения после введения конструктора AAV-Syn-CDNF-EGFP в гиппокамп (Каминская и др., 2023). Можно заключить, что если увеличение экспрессии CDNF в гиппокампе и может оказать положительный эффект на обучение и пространственную память, то это в значительной степени зависит от генотипа животных. Стоит отметить, что при центральном введении CDNF белок способен охватить множество структур и хорошо диффундирует в ткань, тем самым его эффекты гораздо шире, чем при локальной сверхэкспрессии. Также не следует исключать, возможные структурные различия экзо- и эндогенного CDNF. Эндогенный CDNF заякорен в просвете ЭПР, где и выполняет свои функции при нормальных условиях. Экзогенный же CDNF секретируется из просвета ЭПР и из клетки в условиях нарушения гомеостаза. Кроме того, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе повысила уровень белка не на порядки, а всего в 1.5 раза, что могло оказаться недостаточным для оказания значительного эффекта. Известно, что в гиппокампе пожилого человека количество CDNF измеряется примерно  $2-9 \cdot 10^2$  пг/мг белка (Virachit et al., 2019), можно предположить, что в гиппокампе мыши количество CDNF примерно такого же порядка. В данной работе мы вводили внутрь желудочка мозга  $3-30 \cdot 10^6$  пг CDNF, что превышает физиологическое количество CDNF на 4-5 порядков. Такая разница в концентрации могла существенно повлиять на полученные результаты.

В результате работы нами впервые показан достаточно неожиданный эффект сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на социальное поведение: увеличение социального интереса в «трехкамерном тесте» и в тесте «резидент-интродер». Ранее единственным упоминанием того, что CDNF может быть вовлечен в регуляцию социального поведения, была работа на рыбках *Danio rerio* с нокаутом *Cdnf*. В упомянутом исследовании было показано, что нокаут *Cdnf* приводил к снижению социального предпочтения, а также нарушал формирование косяков, так как рыбы держались на большем расстоянии от своих соседей (Chen et al., 2020). В контексте других НТФ и социального поведения известно немного. Так, например, работами нашей лаборатории было показано, что сверхэкспрессия белка BDNF во фронтальной коре мышей BTBR – модели аутизма – приводит к увеличению социального интереса (Kaminskaya et al., 2024), чего, однако, не происходит при внутрижелудочковой инъекции рекомбинантного

BDNF (Ilchibaeva et al., 2023). На мышах также недавно было показано нарушение консолидации памяти социального распознавания при блокировании BDNF-сигналинга в обонятельных луковицах (de Castro et al., 2024).

C-Fos, CREB являются генами раннего ответа и участвуют в сигнальном каскаде, связывающем внеклеточные стимулы с внутриклеточными событиями, они важны в процессах пролиферации, дифференциации и выживании нейронов (Velazquez et al., 2015; Redmond and Ghosh, 2005; Mabb and Ehlers, 2018). Мы обнаружили значительное увеличение уровня мРНК гена *Fos* во всех исследованных структурах после i.c.v. инъекции рекомбинантного белка CDNF. Важно отметить и то, что мы обнаружили увеличение соотношения фосфорилированных форм CREB и c-Fos в среднем мозге, что отражает долговременный эффект CDNF на нейропластичность, подобный проявляемому другими НТФ (Naumenko et al., 2013b). Так, например, известно, что CDNF способствует пролиферации и миграции нейрональных стволовых клеток и нейробластов в субвентрикулярной зоне гиппокампа у крыс после ишемии (Liu et al., 2022). Возможно, что именно усиление фосфорилирования белков раннего ответа привело к активации серотонинергических нейронов в среднем мозге, и стимулировало выброс серотонина, о чем мы можем судить по изменениям в индексе катаболизма 5-НТ. Локальная сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не вызвала таких изменений в уровне CREB и c-Fos, что скорее всего говорит, о различных механизмах действия эндогенного и экзогенного CDNF. Также известно, что при нормальных условиях CDNF находится преимущественно в просвете ЭПР, где участвует в поддержании гомеостаза белков, но может секретироваться при стрессе (Voutilainen et al., 2015). В данной работе клетки не подвергались каким-либо стрессирующим воздействиям, так что сверхэкспрессирующийся CDNF в гиппокампе оставался исключительно внутри нейронов и не мог действовать внеклеточно.

Интересно отметить влияние CDNF на экспрессию генов UPR. Как говорилось ранее GRP78 представляет собой хорошо экспрессирующийся резидентный белок ЭПР, ответственный за транспорт вновь синтезированных белков из цитозоля в ЭПР АДФ/АТФ-зависимым способом. В условиях гомеостаза GRP78 связан с сенсорами ATF6, IRE1 $\alpha$ , PERK и блокирует дальнейшую трансдукцию сигнала UPR (Löhelaïd et al., 2024). Считается, что CDNF регулирует и направляет передачу сигналов UPR для выживания и регенерации клеток, снижая передачу сигналов UPR и модулируя пути UPR, которые важны для нейропротекторной, противовоспалительной и антиапоптотической функции CDNF (Eesmaa et al., 2022). При этом, большинство работ показывают, как изменяется уровень CDNF и белков UPR в условиях стресса ЭПР, индуцированным туникамицином, тапсигаргином, 6-OHDA (Eesmaa et al., 2022; Parkkinen et al., 2023). Нами обнаружено, что центральное введение CDNF влияет на уровень мРНК генов UPR вне модели какой-либо патологии, что раньше не было показано. С одной

стороны, увеличение уровня мРНК сплайсированной формы ХВР1 говорит об активации пути UPR, но нужно помнить, что это не всегда ведет к гибели клетки. В данном случае, можно предположить, что клетки адаптируются к возросшей синтетической активности (т.к. белок ХВР1 выполняет и функцию шаперона), и, следовательно, эти изменения носят правильный адаптивный характер. И инъекция белка CDNF и его сверхэкспрессия в гиппокампе повысила уровень мРНК *Hspa5* (кодирует белок GRP78), что также можно назвать положительным эффектом, так как GRP78 является основным белком-шапероном, критически важным для контроля других белков ЭПР.

Таким образом, продемонстрирован анксиолитический, антидепрессивный и прокогнитивный эффекты однократной центральной инъекции белка CDNF, которые сопровождались значительными изменениями в метаболизме 5-НТ, а также изменениями в транскрипции ключевых генов, вовлеченных в рецепцию и метаболизм 5-НТ. Эти эффекты очень похожи на те, которые оказывает, известный нейротрофин, BDNF при введении в желудочек мозга (Siuciak et al., 1996; Naumenko et al., 2012; Tikhonova and Kulikov, 2012; Naumenko et al., 2014) или при введении в гиппокамп (Deltheil et al., 2008). При этом увеличивается уровень фосфорилирования белков c-Fos и CREB, которые принимают участие в процессах нейропластичности. С другой стороны, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе вызвала лишь некоторые изменения в уровне мРНК и уровне белка, что, однако, это привело к улучшению социального поведения. Тот факт, что сверхэкспрессия белка CDNF и его инъекция влияют на гены и поведение по-разному, вероятно опосредован многообразными механизмами, через которые CDNF может влияет на клетки: одна форма действует преимущественно снаружи клетки, другая только изнутри.

Наблюдаемый различный эффект при введении рекомбинантного CDNF и его сверхэкспрессии в составе AAV-конструкта не является изолированным феноменом, а, напротив, хорошо вписывается в общую парадигму регуляции нейротрофических факторов. Подобный дуализм эффектов, обусловленный способом доставки, ранее был продемонстрирован для других НТФ. Так, экзогенное введение BDNF в желудочки мозга оказывает антидепрессантный и прокогнитивный эффекты, тогда как его сверхэкспрессия в гиппокампе может приводить к парадоксальному усилению тревожности за счет активации альтернативных сигнальных путей, связанных с незрелой формой про-BDNF (Teng et al., 2010; Naumenko et al., 2012, 2014). Схожие закономерности описаны и для GDNF: двукратное увеличение эндогенного уровня белка улучшает координацию без побочных эффектов, в то время как хроническая сверхэкспрессия GDNF приводит к гипериннервации и нарушению синаптической пластичности (Matlik et al., 2018). В случае CDNF ключевую роль, по-видимому, играет разница в концентрационных порогах и клеточной локализации. При i.c.v. инъекции

белок взаимодействует с KDEL-рецепторами на плазматической мембране, активируя внеклеточные сигнальные каскады (ERK/Akt) и проникая внутрь клетки путем эндоцитоза (Maciel et al., 2021; Wires et al., 2021). Напротив, локальная сверхэкспрессия в гиппокампе приводит лишь к полуторакратному увеличению уровня белка (что значительно ниже концентраций, достигаемых при *i.c.v.* введении) и, как следствие, не инициирует выраженный мембранный сигналинг. В данном случае CDNF выполняет преимущественно шаперонную функцию в просвете ЭПР, способствуя адаптивному фолдингу и модулируя экспрессию генов UPR, но не оказывая генерализованного влияния на нейропластичность и метаболизм 5-НТ. Таким образом, различные биологические ответы на экзогенный и эндогенный CDNF отражают фундаментальную гетерогенность механизмов его действия, что необходимо учитывать при интерпретации экспериментальных данных и разработке терапевтических стратегий.

Тут возникает важный вопрос: каким образом центральное введение CDNF, белка действующего преимущественно в ЭПР, может иметь столько экзогенных эффектов, и как же он проникает в клетку? Как известно, что CDNF на своем С-конце имеет последовательность лизин-тирозин-глутамин-лейцин (KTEL), которая очень схожа на классическую последовательность удержания белков в просвете ЭПР лизин-аспарагин-глутамин-лейцин (KDEL) (Henderson et al., 2013). Семейство рецепторов KDEL участвуют в возвращении белков из аппарата Гольджи обратно в ЭПР, предотвращая их секрецию. Было показано, что внутрибрюшинное введение CDNF улучшало гемодинамические показатели сердца крыс при инфаркте (Maciel et al., 2021). В этой же работе показали, что гептапептиды KDEL, имитирующие лиганды рецептора KDEL, устраняют защитные эффекты CDNF, что позволяет предположить участие рецепторов KDEL в процессе проникновения CDNF в клетку (Maciel et al., 2021). Таким образом рецепторы KDEL, находящиеся на клеточной поверхности кардиомиоцитов, могут быть рецепторами для CDNF и на других типах клеток, поскольку его собственные рецепторы до сих не идентифицированы (Maciel et al., 2021). Известно, что при нейродегенеративных заболеваниях количество KDEL-рецепторов на мембране клетки также возрастает, что создает для CDNF, имеющего KTEL мотив, возможность связаться с KDEL-рецептором и проникнуть в клетку (Wires et al., 2021; Truchta et al., 2018). Известно, что MANF может влиять на воспалительные реакции и противодействовать гибели клеток путем связывания с рецептором нейропластина на плазматической мембране. К сожалению, связывание с этим рецептором было специфичным только для MANF, но не для CDNF (Yagi et al., 2020), и результат действия MANF через нейропластин был довольно ограниченным. Есть и другой возможный механизм проникновения в клетку. CDNF имеет нейтральный заряд при  $pH=7.7$ , но он приобретает небольшой положительный заряд в крови, ЭПР и аппарате Гольджи, так как они имеют более кислую среду. Таким образом, у положительно заряженного

экзогенного CDNF более вероятно взаимодействие с плазматической мембраной и его проникновение в клетку, поскольку клеточная мембрана имеет отрицательный заряд (Nishino et al., 2020; Löhelaïd et al., 2024).

Известно, что БП сопровождается рядом не моторных симптомов, включая проблемы с кишечником, депрессию, нарушения сна, anosмию, боль и когнитивные нарушения (Huttunen et al., 2023). Доступные в настоящее время лекарственные препараты, а также интракраниально доставляемый GDNF и член его семейства нейтурин не оказывают влияния на не моторные симптомы. По неопубликованным данным CDNF облегчает депрессивное поведение в модели БП на обезьянах, так что вполне возможно, что CDNF может также лечить и не моторные симптомы БП (Löhelaïd et al., 2024). Также ведутся разработки молекулы, содержащей фрагменты CDNF, которая бы проникала через гемато-энцефалический барьер мозга и оказывала терапевтический эффект (Löhelaïd et al., 2024). Полученные нами результаты вместе с предыдущими данными об участии CDNF в развитии кишечных нейронов у мышей (Chalazonitis et al., 2020) и нейротрансмиттерных систем головного мозга у *Danio rerio* (Chen et al., 2020) демонстрируют, что CDNF имеет больше общего с классическими НТФ, чем считалось ранее. Кроме того, наши данные подтверждают, что рекомбинатный CDNF является безопасным для введения в мозг, обладает антитревожным и прокогнитивным эффектом, что еще раз указывает на его эффективность в лечении немоторных симптомов как БП, так и других нейродегенеративных заболеваний.

## Заключение

В настоящей работе впервые проведен комплексный анализ эффектов дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) на поведение, серотониновую систему, процессы нейропластичности и стресс ЭПР у мышей в зависимости от способа его доставки.

Экзогенный CDNF (однократное *i.c.v.* введение) оказывает многокомпонентное положительное действие: улучшает ассоциативное обучение, снижает уровень тревожности и облегчает состояние поведенческого отчаяния. Эти эффекты сопряжены с усилением катаболизма серотонина в ряде ключевых структур (фронтальная кора, гиппокамп, средний мозг), модуляцией экспрессии генов его рецепторов (снижение *Htr1a* и *Htr7*), а также с активацией каскадов UPR (увеличение сплайсинга *Xbp1*) и нейропластичности (тенденция к повышению фосфорилирования *c-Fos/CREB*). При этом *i.c.v.* введение CDNF характеризуется благоприятным профилем безопасности, вызывая лишь временные и незначительные побочные эффекты (краткосрочное нарушение сна и небольшая потеря веса), что выгодно отличает его от GDNF.

Эндогенный CDNF (локальная сверхэкспрессия в гиппокампе) демонстрирует иной, более специфический спектр эффектов. Он усиливает социальный интерес (что может быть связано со снижением мРНК *Htr1a*), однако одновременно приводит к парадоксальному усилению поведенческого отчаяния. В отличие от экзогенного введения, сверхэкспрессия CDNF не вызывает активации генов UPR и нейропластичности, что, вероятно, обусловлено принципиально разными механизмами: экзогенный белок, попадая в желудочки, может взаимодействовать с KDEL-рецепторами на плазматической мембране и оказывать системное внеклеточное действие, тогда как эндогенный белок преимущественно локализован в просвете ЭПР и выполняет шаперонную функцию в условиях отсутствия стресса.

Таким образом, CDNF вовлечен в регуляцию ассоциативного обучения, социального поведения и тревожности. Полученные результаты расширяют представление о роли CDNF и открывают перспективы для его использования в качестве средства для коррекции немоторных нарушений (когнитивных, аффективных, социальных) при нейродегенеративных заболеваниях, однако требуют дальнейшего изучения для уточнения механизмов его действия и решения вопроса о безопасности при эндогенной сверхэкспрессии.

## Выводы

- 1) Однократное интрацеребровентрикулярное введение рекомбинантного белка CDNF мышам C57BL/6 оказывает антитревожное действие, улучшает ассоциативное обучение и снижает выраженность поведенческого отчаяния. При этом введение CDNF приводит к снижению веса, а в малых дозах (3 мкг) вызывает кратковременные нарушения сна. На молекулярном уровне данные эффекты сопровождаются усилением обмена серотонина: достоверным повышением уровня его метаболита 5-ГИУК во фронтальной коре и увеличением индекса катаболизма (5-ГИУК/5-НТ) в среднем мозге, гиппокампе и фронтальной коре, а также снижением уровня мРНК генов рецепторов *Htr1a* во фронтальной коре и *Htr7* в гиппокампе без изменения уровня соответствующих белков;
- 2) Интрацеребровентрикулярное введение CDNF вызывает значительное увеличение уровня мРНК гена раннего ответа Fos во всех исследованных структурах мозга (средний мозг, гиппокамп, фронтальная кора, гипоталамус), а также тенденцию к усилению фосфорилирования белков c-Fos и CREB в среднем мозге, что свидетельствует об активации процессов нейропластичности. Кроме того, CDNF оказывает структуроспецифическое действие на гены каскада реакции на несвернутые белки (UPR): в среднем мозге и фронтальной коре повышается отношение сплайсированной и несплайсированной форм мРНК *Xbp1*, в среднем мозге также возрастает уровень мРНК *Hspa5* (кодирует GRP78) и *Eif2ak3* (кодирует PERK), что может указывать на адаптивную модуляцию протеостаза;
- 3) Индукция сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе с помощью аденоассоциированного вирусного вектора увеличивает социальный интерес у мышей C57BL/6, но одновременно с этим растет и выраженность поведенческого отчаяния. На молекулярном уровне выявленные изменения сопровождаются снижением уровня мРНК гена *Htr1a* в гиппокампе без существенных изменений в уровне мРНК и белка других исследованных генов 5-НТ системы;
- 4) В отличие от экзогенного введения белка, сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе не вызывает статистически значимых изменений в уровне мРНК генов-маркеров стресса ЭПР, а также не влияет на уровень мРНК, белка и фосфорилирование факторов нейропластичности (c-Fos и CREB) в данной структуре;
- 5) CDNF играет важную роль в регуляции поведенческой и нейрональной пластичности, однако реализуемые эффекты принципиально различаются в зависимости от способа воздействия (экзогенное введение или эндогенная сверхэкспрессия) и места

введения. Экзогенный CDNF, введенный в желудочки мозга, оказывает анксиолитическое и прокогнитивное действие, вовлекая 5-HT систему и механизмы нейропластичности, тогда как локальная сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе усиливает социальный интерес, но сопровождается парадоксальным усилением выраженности поведенческого отчаяния.

## Список литературы

1. Каминская Я.П., Ильчибаева Т.В., Хоцкин Н.В., Науменко В.С., Цыбко А.С. Влияние сверхэкспрессии дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) в гиппокампе на поведение мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению // Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 8. – С. 1313-1336. – DOI: 10.31857/S0320972523080031.
2. Молчанова А.И., Балезина О.П., Гайдуков А.Е. Продомен BDNF тормозит квантовую секрецию медиатора в моторных синапсах мыши при участии сортилина и аденозиновых A1-рецепторов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2024. – Т. 110. – № 2. – С. 196-215. – DOI: 10.31857/S0869813924020045.
3. Airaksinen M.S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value // Nat Rev Neurosci. – 2002. – Vol. 3. – No. 5. – P. 383-394. – DOI: 10.1038/nrn812.
4. Airavaara M., Harvey B.K., Voutilainen M.H., Shen H., Chou J., Lindholm P., Lindahl M., Tuominen R.K., Saarma M., Hoffer B., Wang Y. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice // Cell Transplant. – 2012. – Vol. 21. – No. 6. – P. 1213-1223. – DOI: 10.3727/096368911X600948.
5. Ali N.H., Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., et al. The molecular pathway of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in Parkinson's disease: the way of new inroads // Mol Neurobiol. – 2024. – Vol. 61. – No. 5. – P. 2469-2480. – DOI: 10.1007/s12035-023-03727-8.
6. Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K., Barua N.U., Patel N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration // Pharmacol Ther. – 2013. – Vol. 138. – No. 2. – P. 155-175. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.004.
7. Andero R., Ressler K.J. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic // Genes Brain Behav. – 2012. – Vol. 11. – No. 5. – P. 503-512. – DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00801.x.
8. Appenzeller-Herzog C., Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold // Biochim Biophys Acta. – 2008. – Vol. 1783. – No. 4. – P. 535-548. – DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.11.010.
9. Arancibia D., Zamorano P., Andrés M.E. CDNF induces the adaptive unfolded protein response and attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cell death // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2018. – Vol. 1865. – No. 11 Pt A. – P. 1579-1589. – DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.08.012.
10. Arrieta A., Blackwood E.A., Stauffer W.T., Santo Domingo M., Bilal A.S., Thuerauf D.J., Pentoney A.N., Aivati C., Sarakki A.V., Doroudgar S., Glembotski C.C. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ER-resident chaperone that protects against reductive stress in

- the heart // *J Biol Chem.* – 2020. – Vol. 295. – No. 22. – P. 7566-7583. – DOI: 10.1074/jbc.RA120.013345.
11. Artigas F. Developments in the field of antidepressants, where do we go now? // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2015. – Vol. 25. – No. 5. – P. 657-670. – DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.04.013.
  12. Ateaque S., Merkouris S., Barde Y.A. Neurotrophin signalling in the human nervous system // *Front Mol Neurosci.* – 2023. – Vol. 16. – Art. 1225373. – DOI: 10.3389/fnmol.2023.1225373.
  13. Bach S.V., Bauman A.J., Hosein D., et al. Distinct roles of Bdnf I and Bdnf IV transcript variant expression in hippocampal neurons // *Hippocampus.* – 2024. – Vol. 34. – No. 5. – P. 218-229. – DOI: 10.1002/hipo.23600.
  14. Bacqué-Cazenave J., Bharatiya R., Barrière G., Delbecque J.P., Bouguiyou N., Di Giovanni G., Cattaert D., De Deurwaerdère P. Serotonin in animal cognition and behavior // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – No. 5. – Art. 1649. – DOI: 10.3390/ijms21051649.
  15. Bai M., Vozdek R., Hnízda A., Jiang C., Wang B., Kuchar L., Li T., Zhang Y., Wood C., Feng L., Dang Y., Ma D.K. Conserved roles of *C. elegans* and human MANFs in sulfatide binding and cytoprotection // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9. – No. 1. – Art. 897. – DOI: 10.1038/s41467-018-03355-0.
  16. Barker R.A., Saarma M., Svendsen C.N., et al. Neurotrophic factors for Parkinson's disease: current status, progress, and remaining questions. Conclusions from a 2023 workshop // *J Parkinson's Dis.* – 2024. – Vol. 14. – No. 8. – P. 1659-1676. – DOI: 10.1177/1877718X241301041.
  17. Bartova L., Lanzenberger R., Rujescu D., Kasper S. Reply to: "The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence" // *Mol Psychiatry.* – 2023. – Vol. 28. – No. 8. – P. 3153-3154. – DOI: 10.1038/s41380-023-02093-0.
  18. Bathina S., Thome J., Das U.N. An imbalance in the pro/mature BDNF ratio occurs in multiple brain regions during normal ageing in wild-type mice // *J Mol Neurosci.* – 2023. – Vol. 73. – P. 469-484. – DOI: 10.1007/s12031-023-02135-8.
  19. Bazovkina D., Naumenko V., Bazhenova E., Kondaurova E. Effect of central administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on behavior and brain monoamine metabolism in new recombinant mouse lines differing by 5-HT1A receptor functionality // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – No. 21. – Art. 11987. – DOI: 10.3390/ijms222111987.
  20. Bekinschtein P., von Bohlen O. Editorial: Cellular and molecular mechanisms of neurotrophin function in the nervous system // *Front Cell Neurosci.* – 2020. – Vol. 14. – Art. 101. – DOI: 10.3389/fncel.2020.00101.

21. Berger M., Gray J.A., Roth B.L. The expanded biology of serotonin // *Annu Rev Med.* – 2009. – Vol. 60. – P. 355-366. – DOI: 10.1146/annurev.med.60.042307.110802.
22. Bergmann T.J., Fregno I., Fumagalli F., Rinaldi A., Bertoni F., Boersema P.J., Picotti P., Molinari M. Chemical stresses fail to mimic the unfolded protein response resulting from luminal load with unfolded polypeptides // *J Biol Chem.* – 2018. – Vol. 293. – No. 15. – P. 5600-5612. – DOI: 10.1074/jbc.RA117.001484.
23. Bespalov M.M., Sidorova Y.A., Tumova S., et al. Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin // *J Cell Biol.* – 2011. – Vol. 192. – No. 1. – P. 153-169. – DOI: 10.1083/jcb.201009136.
24. Bockaert J., Bécamel C., Chaumont-Dubel S., Claeysen S., Vandermoere F., Marin P. Novel and atypical pathways for serotonin signaling // *Fac Rev.* – 2021. – Vol. 10. – Art. 52. – DOI: 10.12703/r/10-52.
25. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling // *F1000Res.* – 2016. – Vol. 5. – Art. F1000 Faculty Rev-1885. – DOI: 10.12688/f1000research.8434.1.
26. Brown M.K., Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases // *Front Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – Art. 263. – DOI: 10.3389/fphys.2012.00263.
27. Carlomagno F., Moccia M., Federico G., Santoro M. Mechanisms of RET-mediated signal transduction // *Endocr Relat Cancer.* – 2024. – Vol. 32. – No. 1. – Art. e240131. – DOI: 10.1530/ERC-24-0131.
28. Carter M., Shieh J. Chapter 2 – Animal Behavior // *Guide to Research Techniques in Neuroscience (2nd ed.)* / Eds. M. Carter, J. Shieh. – Academic Press, 2015. – P. 39-71. – DOI: 10.1016/B978-0-12-800511-8.00002-2.
29. Chagraoui A., Thibaut F., De Deurwaerdère P. 5-HT<sub>6</sub> receptors: contemporary views on their neurobiological and pharmacological relevance in neuropsychiatric disorders // *J Recept Signal Transduct Res.* – 2025. – Vol. 45. – No. 1. – P. 112-128. – DOI: 10.1080/19585969.2025.2502028.
30. Chalazonitis A., Li Z., Pham T.D., Chen J., Rao M., Lindholm P., Saarma M., Lindahl M., Gershon M.D. Cerebral dopamine neurotrophic factor is essential for enteric neuronal development, maintenance, and regulation of gastrointestinal transit // *J Comp Neurol.* – 2020. – Vol. 528. – No. 14. – P. 2420-2444. – DOI: 10.1002/cne.24901.
31. Chao M.V., Rajagopal R., Lee F.S. Neurotrophin signalling in health and disease // *Clin Sci (Lond).* – 2006. – Vol. 110. – No. 2. – P. 167-173. – DOI: 10.1042/CS20050163.
32. Charnay Y., Léger L. Brain serotonergic circuitries // *Dialogues Clin Neurosci.* – 2010. – Vol. 12. – No. 4. – P. 471-487. – DOI: 10.31887/DCNS.2010.12.4/ycharnay.
33. Chen L., Feng L., Wang X., Du J., Chen Y., Yang W., Zhou C., Cheng L., Shen Y., Fang S., Li J., Shen Y. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is involved in inflammation by

- negatively regulating the NF- $\kappa$ B pathway // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – Art. 8133. – DOI: 10.1038/srep08133.
34. Chen Y.C., Baronio D., Semenova S., Abdurakhmanova S., Panula P. Cerebral dopamine neurotrophic factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior // *J Neurosci.* – 2020. – Vol. 40. – No. 32. – P. 6146-6164. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2636-19.2020.
  35. Cheng L., Zhao H., Zhang W., Liu B., Liu Y., Guo Y., Nie L. Overexpression of conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) in astrocytes alleviates endoplasmic reticulum stress-induced cell damage and inflammatory cytokine secretion // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – Vol. 435. – No. 1. – P. 34-39. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.029.
  36. Choi J.M., Hong J.H., Chae M.J., Ngyuen P.H., Kang H.S., Ma H.I., Kim Y.J. Analysis of mutations and the association between polymorphisms in the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and Parkinson disease // *Neurosci Lett.* – 2011. – Vol. 493. – No. 3. – P. 97-101. – DOI: 10.1016/j.neulet.2011.02.013.
  37. Costa R.O., Perestrela T., Almeida R.D. PROneurotrophins and CONSequences // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55. – P. 2934-2951. – DOI: 10.1007/s12035-017-0505-7.
  38. Cryan J.F., Mombereau C., Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2005. – Vol. 29. – No. 4-5. – P. 571-625. – DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.
  39. Dahiya S., Rani V., Kaur R., et al. The intricate relationship of Trk receptors in brain diseases and disorders // *Mol Neurobiol.* – 2025. – Vol. 62. – No. 11. – P. 14883-14922. – DOI: 10.1007/s12035-025-05058-2.
  40. de Castro C.M., Almeida-Santos A.F., Mansk L.M.Z., Jaimes L.F., Cammarota M., Pereira G.S. BDNF-dependent signaling in the olfactory bulb modulates social recognition memory in mice // *Neurobiol Learn Mem.* – 2024. – Vol. 208. – Art. 107891. – DOI: 10.1016/j.nlm.2024.107891.
  41. Deltheil T., Guiard B.P., Cerdan J., David D.J., Tanaka K.F., Reperant C., Guilloux J.P., Coudore F., Hen R., Gardier A.M. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice // *Neuropharmacology.* – 2008. – Vol. 55. – No. 6. – P. 1006-1014. – DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.001.
  42. Dolgacheva L.P., et al. Serotonergic regulation in Alzheimer's disease // *Int J Mol Sci.* – 2025. – Vol. 26. – No. 11. – Art. 5218. – DOI: 10.3390/ijms26115218.
  43. Eesmaa A., Yu L.Y., Göös H., Danilova T., Nöges K., Pakarinen E., Varjosalo M., Lindahl M., Lindholm P., Saarma M. CDNF interacts with ER chaperones and requires UPR sensors to promote neuronal survival // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23. – No. 16. – Art. 9489. – DOI: 10.3390/ijms23169489.

44. Eremin D., Ilchibaeva T., Khotskin N., Naumenko V., Tsybko A. Effect of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) on the behavior and expression of the key genes of the brain serotonin system in C57Bl6/J mice // *IBRO Reports*. – 2019. – Vol. 6. – Suppl. – P. S58. – DOI: 10.1016/j.ibror.2019.07.192.
45. Eriksson T.M., Golkar A., Ekström J.C., Svenningsson P., Ogren S.O. 5-HT<sub>7</sub> receptor stimulation by 8-OH-DPAT counteracts the impairing effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation on contextual learning in mice // *Eur J Pharmacol*. – 2008. – Vol. 596. – No. 1-3. – P. 107-110. – DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.08.026.
46. Garea-Rodríguez E., Eesmaa A., Lindholm P., Schlumbohm C., König J., Meller B., Kriegstein K., Helms G., Saarma M., Fuchs E. Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in a nonhuman primate model of Parkinson's disease // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – No. 2. – Art. e0149776. – DOI: 10.1371/journal.pone.0149776.
47. Gavioli E., et al. The history of nerve growth factor: from molecule to drug // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – No. 6. – Art. 635. – DOI: 10.3390/biom14060635.
48. Ghemrawi R., Khair M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21. – No. 17. – Art. 6127. – DOI: 10.3390/ijms21176127.
49. Goodman K.M., Sjögren R., Sjöström L., et al. Architecture and regulation of a GDNF-GFR $\alpha$ 1 synaptic adhesion assembly // *Nat Commun*. – 2023. – Vol. 14. – No. 1. – Art. 7551. – DOI: 10.1038/s41467-023-43148-8.
50. Grimm D., Kay M.A., Kleinschmidt J.A. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6 // *Mol Ther*. – 2003. – Vol. 7. – No. 6. – P. 839-850. – DOI: 10.1016/s1525-0016(03)00095-9.
51. Grimm L., Holinski-Feder E., Teodoridis J., et al. Analysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products // *Hum Genet*. – 1998. – Vol. 103. – No. 5. – P. 579-589. – DOI: 10.1007/s004390050869.
52. Hartman J.H., Richie C.T., Gordon K.L., Mello D.F., Castillo P., Zhu A., Wang Y., Hoffer B.J., Sherwood D.R., Meyer J.N., Harvey B.K. MANF deletion abrogates early larval *Caenorhabditis elegans* stress response to tunicamycin and *Pseudomonas aeruginosa* // *Eur J Cell Biol*. – 2019. – Vol. 98. – No. 5-8. – Art. 151043. – DOI: 10.1016/j.ejcb.2019.05.002.
53. Hellman M., Arumae U., Yu L.Y., Lindholm P., Peranen J., Saarma M., Permi P. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286. – No. 4. – P. 2675-2680. – DOI: 10.1074/jbc.M110.146738.

54. Hellman M., Peränen J., Saarma M., Permi P. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of the human mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor // *Biomol NMR Assign.* – 2010. – Vol. 4. – No. 2. – P. 215-217. – DOI: 10.1007/s12104-010-9251-8.
55. Henderson M.J., Richie C.T., Airavaara M., Wang Y., Harvey B.K. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288. – No. 6. – P. 4209-4225. – DOI: 10.1074/jbc.M112.400648.
56. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2012. – Vol. 13. – No. 2. – P. 89-102. – DOI: 10.1038/nrm3270.
57. Hetz C., Papa F.R. The unfolded protein response and cell fate control // *Mol Cell.* – 2018. – Vol. 69. – No. 2. – P. 169-181. – DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.017.
58. Hogan C., Dupuis-Coronas S., Bousquet M.P., et al. The RET G691S polymorphism is a risk factor for pancreatic cancer // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – No. 61. – P. 103582-103595. – DOI: 10.18632/oncotarget.21978.
59. Homberg J.R., Molteni R., Calabrese F., Riva M.A. The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2014. – Vol. 43. – P. 35-47. – DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.012.
60. Houlton J., Abumaria N., Harkness L., et al. Therapeutic potential of neurotrophins for repair after brain injury: a helping hand from biomaterials // *Front Neurosci.* – 2019. – Vol. 13. – Art. 790. – DOI: 10.3389/fnins.2019.00790.
61. Huttunen H.J., Booms S., Sjögren M., Kerstens V., Johansson J., Holmnäs R., Koskinen J., Kuleskaya N., Fazio P., Woolley M., et al. Intraputamenal cerebral dopamine neurotrophic factor in Parkinson's disease: a randomized, double-blind, multicenter phase 1 trial // *Mov Disord.* – 2023. – Vol. 38. – No. 7. – P. 1209-1222. – DOI: 10.1002/mds.29426.
62. Huttunen H.J., Saarma M. CDNF protein therapy in Parkinson's disease // *Cell Transplant.* – 2019. – Vol. 28. – No. 4. – P. 349-366. – DOI: 10.1177/0963689719840290.
63. Ibáñez C.F., Andressoo J.O. Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system // *Neurobiol Dis.* – 2017. – Vol. 97. – Pt B. – P. 80-89. – DOI: 10.1016/j.nbd.2016.01.021.
64. Ilchibaeva T., Tsybko A., Lipnitskaya M., Eremin D., Milutinovich K., Naumenko V., Popova N. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mechanisms of autistic-like behavior in BTBR mice: crosstalk with the dopaminergic brain system // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11. – No. 5. – Art. 1482. – DOI: 10.3390/biomedicines11051482.

65. Jauhar S., Arnone D., Baldwin D.S., et al. A leaky umbrella has little value: evidence clearly indicates the serotonin system is implicated in depression // *Mol Psychiatry*. – 2023. – Vol. 28. – No. 8. – P. 3149-3152. – DOI: 10.1038/s41380-023-02095-y.
66. Jääntti M., Harvey B.K. Trophic activities of endoplasmic reticulum proteins CDNF and MANF // *Cell Tissue Res*. – 2020. – Vol. 382. – No. 1. – P. 83-100. – DOI: 10.1007/s00441-020-03263-0.
67. Kaminskaya Y.P., Ilchibaeva T.V., Shcherbakova A.I., Allayarova E.R., Popova N.K., Naumenko V.S., Tsybko A.S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the frontal cortex enhances social interest in the BTBR mouse model of autism // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – Vol. 89. – No. 8. – P. 1509-1518. – DOI: 10.1134/S0006297924080091.
68. Kaneyasu T., et al. MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells // *Stem Cells*. – 2023. – Vol. 41. – No. 7. – P. 684-696. – DOI: 10.1002/stem.1486.
69. Kanwore K., Kanwore K., Gao X., et al. Testosterone upregulates glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and promotes neuroinflammation to enhance glioma cell survival and proliferation // *Inflamm Regen*. – 2023. – Vol. 43. – No. 1. – Art. 52. – DOI: 10.1186/s41232-023-00296-8.
70. Kemppainen S., Lindholm P., Galli E., Lahtinen H.M., Koivisto H., Hamalainen E., Saarma M., Tanila H. Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice // *Behav Brain Res*. – 2015. – Vol. 291. – P. 1-11. – DOI: 10.1016/j.bbr.2015.05.002.
71. Kim Y.J., Park J.H., Lee S.H., et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and its role in attenuating renal fibrosis: a review // *Korean J Intern Med*. – 2025. – Vol. 40. – No. 2. – P. 219-229. – DOI: 10.3904/kjim.2023.246.
72. Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test // *J Neurosci Methods*. – 2010. – Vol. 191. – No. 1. – P. 26-31. – DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
73. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting // *J Neurosci Methods*. – 2008. – Vol. 170. – No. 2. – P. 345-351. – DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
74. Lahiri D.K. The seeds of its regulation: Natural antisense transcripts as single-gene control switches in neurodegenerative disorders // *Ageing Res Rev*. – 2024. – Vol. 102. – Art. 102336. – DOI: 10.1016/j.arr.2024.102336.
75. Leopoldo M., Lacivita E., Berardi F., Perrone R., Hedlund P.B. Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system

- disorders // *Pharmacol Ther.* – 2011. – Vol. 129. – No. 2. – P. 120-148. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.013.
76. Leppänen V.M., Bespalov M.M., Runeberg-Roos P., et al. The structure of GFR $\alpha$ 1 domain 3 reveals new insights into GDNF binding and RET activation // *EMBO J.* – 2017. – Vol. 36. – No. 12. – P. 1717-1730. – DOI: 10.15252/embj.201695903.
77. Li Q., et al. Induction of Bdnf from promoter I following electroconvulsive seizures contributes to structural plasticity in neurons of the piriform cortex // *Brain Stimulation.* – 2022. – Vol. 15. – No. 2. – P. 427-433. – DOI: 10.1016/j.brs.2022.02.003.
78. Lindahl M., Chalazonitis A., Palm E., Pakarinen E., Danilova T., Pham T.D., Setlik W., Rao M., Vöikar V., Huotari J., et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor deficiency leads to degeneration of enteric neurons and altered brain dopamine neuronal function in mice // *Neurobiol Dis.* – 2020. – Vol. 134. – Art. 104696. – DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104696.
79. Lindahl M., Danilova T., Palm E., Lindholm P., Vöikar V., Hakonen E., Ustinov J., Andressoo J.O., Harvey B.K., Otonkoski T., et al. MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic  $\beta$  cells // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 7. – No. 2. – P. 366-375. – DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.023.
80. Lindholm P., Saarma M. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism // *Mol Psychiatry.* – 2022. – Vol. 27. – P. 1310-1321. – DOI: 10.1038/s41380-021-01394-6.
81. Lindholm P., Voutilainen M.H., Laurén J., Peränen J., Leppänen V.M., Andressoo J.O., Lindahl M., Janhunen S., Kalkkinen N., Timmusk T., et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo // *Nature.* – 2007. – Vol. 448. – No. 7149. – P. 73-77. – DOI: 10.1038/nature05957.
82. Lindström R., Lindholm P., Kallijärvi J., Yu L.Y., Piepponen T.P., Arumäe U., Saarma M., Heino T.I. Characterization of the structural and functional determinants of MANF/CDNF in *Drosophila* in vivo model // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – No. 9. – Art. e73928. – DOI: 10.1371/journal.pone.0073928.
83. Liu X., Ren H., Peng A., Cheng H., Chen J., Xia X., Liu T., Wang X. The effect of RADA16-I and CDNF on neurogenesis and neuroprotection in brain ischemia-reperfusion injury // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23. – No. 3. – Art. 1436. – DOI: 10.3390/ijms23031436.
84. Löhelaid H., Saarma M., Airavaara M. CDNF and ER stress: pharmacology and therapeutic possibilities // *Pharmacol Ther.* – 2024. – Vol. 254. – Art. 108594. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2024.108594.
85. Lu B., Pang P.T., Woo N.H. The yin and yang of neurotrophin action // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 603-614. – DOI: 10.1038/nrn1726.

86. Mabb A.M., Ehlers M.D. Arc ubiquitination in synaptic plasticity // *Semin Cell Dev Biol.* – 2018. – Vol. 77. – P. 10-16. – DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.09.009.
87. Maciel L., de Oliveira D.F., Mesquita F., Souza H.A.D.S., Oliveira L., Christie M.L.A., Palhano F.L., Campos de Carvalho A.C., Nascimento J.H.M., Foguel D. New cardiomyokine reduces myocardial ischemia/reperfusion injury by PI3K-AKT pathway via a putative KDEL-receptor binding // *J Am Heart Assoc.* – 2021. – Vol. 10. – No. 1. – Art. e019685. – DOI: 10.1161/JAHA.120.019685.
88. Maier H.B., Neyazi M., Neyazi A., Hillemacher T., Pathak H., Rhein M., Bleich S., Goltseker K., Sadot-Sogrin Y., Even-Chen O., et al. Alcohol consumption alters Gdnf promoter methylation and expression in rats // *J Psychiatr Res.* – 2020. – Vol. 121. – P. 1-9. – DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.10.020.
89. Man H.Y., Wang Q., Lu W.Y., Ju W., Ahmadian G., Liu L., D'Souza S., Wong T.P., Taghibiglou C., Lu J., et al. Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons // *Neuron.* – 2003. – Vol. 38. – No. 4. – P. 611-624. – DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00228-9.
90. Marshall P. Finding an optimal level of GDNF overexpression: insights from dopamine cycling // *Cell Mol Neurobiol.* – 2023. – Vol. 43. – No. 7. – P. 3179-3189. – DOI: 10.1007/s10571-023-01375-z.
91. Matlik K., Vöikar V., Vilenius C., Kuleskaya N., Andressoo J.O. Two-fold elevation of endogenous GDNF levels in mice improves motor coordination without causing side-effects // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – No. 1. – Art. 11861. – DOI: 10.1038/s41598-018-29988-1.
92. Matlik K., Yu L.Y., Eesmaa A., Hellman M., Lindholm P., Peränen J., Galli E., Anttila J., Saarna M., Permi P., et al. Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity // *Cell Death Dis.* – 2015. – Vol. 6. – No. 12. – Art. e2032. – DOI: 10.1038/cddis.2015.371.
93. Mei J.M., Niu C.S. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation // *Neurol Sci.* – 2014. – Vol. 35. – No. 8. – P. 1275-1280. – DOI: 10.1007/s10072-014-1700-1.
94. Mei M., Zhai C., Li X., Zhou Y., Peng W., Ma L., Wang Q., Iverson B.L., Zhang G., Yi L. Characterization of aromatic residue-controlled protein retention in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* // *J Biol Chem.* – 2017. – Vol. 292. – No. 50. – P. 20707-20719. – DOI: 10.1074/jbc.M117.812107.
95. Millan M.J., Agid Y., Brüne M., Bullmore E.T., Carter C.S., Clayton N.S., Connor R., Davis S., Deakin B., DeRubeis R.J., et al. Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics,

- causes and the quest for improved therapy // *Nat Rev Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11. – No. 2. – P. 141-168. – DOI: 10.1038/nrd3628.
96. Miranda-Lourenço C., Ribeiro-Rodrigues L., Fonseca-Gomes J., et al. Challenges of BDNF-based therapies: from common to rare diseases // *Pharmacol Res.* – 2020. – Vol. 162. – Art. 105281. – DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105281.
97. Mizobuchi N., Hoseki J., Kubota H., Toyokuni S., Nozaki J.I., Naitoh M., Koizumi A., Nagata K. ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element // *Cell Struct Funct.* – 2007. – Vol. 32. – No. 1. – P. 41-50. – DOI: 10.1247/csf.07001.
98. Mol P., Soman S., Rajan R., et al. A network map of GDNF/RET signaling pathway in physiological and pathological conditions // *J Cell Commun Signal.* – 2023. – Vol. 17. – No. 3. – P. 1089-1095. – DOI: 10.1007/s12079-023-00726-1.
99. Montaña-Rodríguez A.R., Schorling T., Andressoo J.O. Striatal GDNF neurons chemoattract RET-positive dopamine axons at seven times farther distance than medium spiny neurons // *Cells.* – 2024. – Vol. 13. – No. 12. – Art. 1059. – DOI: 10.3390/cells13121059.
100. Nadella R., Voutilainen M.H., Saarma M., Gonzalez-Barrios J.A., Leon-Chavez B.A., Jiménez J.M., Jiménez S.H., Escobedo L., Martinez-Fong D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra // *J Neuroinflammation.* – 2014. – Vol. 11. – Art. 209. – DOI: 10.1186/s12974-014-0209-0.
101. Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Morozova M.V., Popova N.K. Effects of brain-derived and glial cell line-derived neurotrophic factors on startle response and disrupted prepulse inhibition in mice of DBA/2J inbred strain // *Neurosci Lett.* – 2013a. – Vol. 550. – P. 115-118. – DOI: 10.1016/j.neulet.2013.06.056.
102. Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Semenova A.A., Tsybko A.S., Il'chibaeva T.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders // *J Neurosci Res.* – 2013b. – Vol. 91. – No. 12. – P. 1628-1638. – DOI: 10.1002/jnr.23286.
103. Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Il'chibaeva T.V., Popova N.K. On the role of 5-HT(1A) receptor gene in behavioral effect of brain-derived neurotrophic factor // *J Neurosci Res.* – 2014. – Vol. 92. – No. 8. – P. 1035-1043. – DOI: 10.1002/jnr.23381.
104. Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains // *Neuroscience.* – 2012. – Vol. 214. – P. 59-67. – DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.031.

105. Nelson T.J., Alkon D.L. Molecular regulation of synaptogenesis during associative learning and memory // *Brain Res.* – 2015. – Vol. 1621. – P. 239-251. – DOI: 10.1016/j.brainres.2014.11.054.
106. Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Y.B. Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis // *Int J Dev Biol.* – 2012. – Vol. 56. – No. 5. – P. 385-391. – DOI: 10.1387/ijdb.113475dn.
107. Nishino M., Matsuzaki I., Musangile F.Y., Takahashi Y., Iwahashi Y., Warigaya K., Kinoshita Y., Kojima F., Murata S.I. Measurement and visualization of cell membrane surface charge in fixed cultured cells related with cell morphology // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15. – No. 7. – Art. e0236373. – DOI: 10.1371/journal.pone.0236373.
108. Norisada J., Hirata Y., Amaya F., Kiuchi K., Oh-hashii K. A comparative analysis of the molecular features of MANF and CDNF // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – No. 1. – Art. e0146923. – DOI: 10.1371/journal.pone.0146923.
109. Numakawa T., Kajihara R. The role of brain-derived neurotrophic factor as an essential mediator in neuronal functions and the therapeutic potential of its mimetics for neuroprotection in neurologic and psychiatric disorders // *Molecules.* – 2025. – Vol. 30. – No. 4. – Art. 848. – DOI: 10.3390/molecules30040848.
110. Ogren S.O., Eriksson T.M., Elvander-Tottie E., D'Addario C., Ekström J.C., Svenningsson P., Meister B., Kehr J., Stiedl O. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory // *Behav Brain Res.* – 2008. – Vol. 195. – No. 1. – P. 54-77. – DOI: 10.1016/j.bbr.2008.02.023.
111. Palgi M., Greco D., Lindström R., Auvinen P., Heino T.I. Gene expression analysis of *Drosophila* Manf mutants reveals perturbations in membrane traffic and major metabolic changes // *BMC Genomics.* – 2012. – Vol. 13. – Art. 134. – DOI: 10.1186/1471-2164-13-134.
112. Parajulee A., Kim K. Structural studies of serotonin receptor family // *BMB Rep.* – 2023. – Vol. 56. – No. 10. – P. 527-536. – DOI: 10.5483/BMBRep.2023-0147.
113. Parkash V., Lindholm P., Peränen J., Kalkkinen N., Oksanen E., Saarma M., Leppänen V.M., Goldman A. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional // *Protein Eng Des Sel.* – 2009. – Vol. 22. – No. 4. – P. 233-241. – DOI: 10.1093/protein/gzn080.
114. Parkkinen I., Their A., Asghar M.Y., Sree S., Jokitalo E., Airavaara M. Pharmacological regulation of endoplasmic reticulum structure and calcium dynamics: importance for neurodegenerative diseases // *Pharmacol Rev.* – 2023. – Vol. 75. – No. 5. – P. 959-978. – DOI: 10.1124/pharmrev.122.000701.
115. Petrova P., Raibekas A., Pevsner J., Vigo N., Anafi M., Moore M.K., Peaire A.E., Shridhar V., Smith D.I., Kelly J., et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor

- with selectivity for dopaminergic neurons // *J Mol Neurosci.* – 2003. – Vol. 20. – No. 2. – P. 173-188. – DOI: 10.1385/jmn:20:2:173.
116. Phillips C., Baktir M.A., Srivatsan M., Salehi A. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – Art. 170. – DOI: 10.3389/fncel.2014.00170.
117. Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain // *Biochemistry (Moscow).* – 2017. – Vol. 82. – No. 3. – P. 308-317. – DOI: 10.1134/S0006297917030099.
118. Popova N.K., Kulikov A.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kulikova E.A., Krasnov I.B., Shenkman B.S., Bazhenova E.Y., Sinyakova N.A., Naumenko V.S. Risk neurogenes for long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system // *Mol Neurobiol.* – 2015. – Vol. 51. – No. 3. – P. 1443-1451. – DOI: 10.1007/s12035-014-8821-7.
119. Popova N.K., Naumenko V.S. 5-HT<sub>1A</sub> receptor as a key player in the brain 5-HT system // *Rev Neurosci.* – 2013. – Vol. 24. – No. 2. – P. 191-204. – DOI: 10.1515/revneuro-2012-0082.
120. Puig M.V., Gullledge A.T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits // *Mol Neurobiol.* – 2011. – Vol. 44. – No. 3. – P. 449-464. – DOI: 10.1007/s12035-011-8214-0.
121. Radi E., Formichi P., Battisti C., Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *J Alzheimers Dis.* – 2014. – Vol. 42. – Suppl. 3. – P. S125-S152. – DOI: 10.3233/JAD-132738.
122. Raymond J.R., Mukhin Y.V., Gelasco A., et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction // *Pharmacol Ther.* – 2001. – Vol. 92. – No. 2-3. – P. 179-212. – DOI: 10.1016/s0163-7258(01)00169-3.
123. Redmond L., Ghosh A. Regulation of dendritic development by calcium signaling // *Cell Calcium.* – 2005. – Vol. 37. – No. 5. – P. 411-416. – DOI: 10.1016/j.ceca.2005.01.009.
124. Riad M., Garcia S., Watkins K.C., Jodoin N., Doucet E., Langlois X., el Mestikawy S., Hamon M., Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain // *J Comp Neurol.* – 2000. – Vol. 417. – No. 2. – P. 181-194.
125. Richman C., Rashid S., Prashar S., Mishra R., Selvaganapathy P.R., Gupta B.P. C. elegans MANF homolog is necessary for the protection of dopaminergic neurons and ER unfolded protein response // *Front Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – Art. 544. – DOI: 10.3389/fnins.2018.00544.
126. Roberts A.J., Krucker T., Levy C.L., Slanina K.A., Sutcliffe J.G., Hedlund P.B. Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning // *Eur J Neurosci.* – 2004. – Vol. 19. – No. 7. – P. 1913-1922. – DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03288.x.

127. Rodnyy A.Y., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Popova N.K., Kudlay D.A., Naumenko V.S. The brain serotonin system in autism // *Rev Neurosci.* – 2023. – Vol. 35. – No. 1. – P. 1-20. – DOI: 10.1515/revneuro-2023-0055.
128. Ruiz C.R., Shi J., Schecterson L., et al. Transcript specificity in BDNF-regulated protein synthesis // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 76 Pt C. – P. 657-663. – DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.004.
129. Samaddar S., Redhwan M.A.M., Eraiah M.M., Koneri R. Neurotrophins in peripheral neuropathy: exploring pathophysiological mechanisms and emerging therapeutic opportunities // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2025. – Vol. 24. – No. 2. – P. 91-101. – DOI: 10.2174/0118715273327121240820074049.
130. Sargin D., Jeoung H.S., Goodfellow N.M., Lambe E.K. Serotonin regulation of the prefrontal cortex: cognitive relevance and the impact of developmental perturbation // *ACS Chem Neurosci.* – 2019. – Vol. 10. – No. 7. – P. 3078-3093. – DOI: 10.1021/acchemneuro.9b00073.
131. Sarkisyan G., Hedlund P.B. The 5-HT<sub>7</sub> receptor is involved in allocentric spatial memory information processing // *Behav Brain Res.* – 2009. – Vol. 202. – No. 1. – P. 26-31. – DOI: 10.1016/j.bbr.2009.03.011.
132. Sawada M., Sun W., Hayes P., Leskov K., Boothman D.A., Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria // *Nat Cell Biol.* – 2003. – Vol. 5. – No. 4. – P. 320-329. – DOI: 10.1038/ncb950. (статья отозвана)
133. Scholes K.E., Harrison B.J., O'Neill B.V., Leung S., Croft R.J., Pipingas A., Phan K.L., Nathan P.J. Acute serotonin and dopamine depletion improves attentional control: findings from the stroop task // *Neuropsychopharmacology.* – 2007. – Vol. 32. – No. 7. – P. 1600-1610. – DOI: 10.1038/sj.npp.1301262.
134. Schwarz D.S., Blower M.D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – Vol. 73. – No. 1. – P. 79-94. – DOI: 10.1007/s00018-015-2052-6.
135. Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Chrétien M., Murphy R.A. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 379. – No. 3. – P. 247-250. – DOI: 10.1016/0014-5793(95)01520-5.
136. Sereno D., Müller W.E.G., Bausen M., Elkhooly T.A., Markl J.S., Wiens M. An evolutionary perspective on the role of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF): at the crossroads of poriferan innate immune and apoptotic pathways // *Biochem Biophys Rep.* – 2017. – Vol. 11. – P. 161-173. – DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.02.009.
137. Shahidi S., Asl S.S., Komaki A., Hashemi-Firouzi N. The effect of chronic stimulation of serotonin receptor type 7 on recognition, passive avoidance memory, hippocampal long-term

- potentiation, and neuronal apoptosis in the amyloid  $\beta$  protein treated rat // *Psychopharmacology*. – 2018. – Vol. 235. – No. 5. – P. 1513-1525. – DOI: 10.1007/s00213-018-4862-3.
- 138.Siuciak J.A., Boylan C., Fritsche M., Altar C.A., Lindsay R.M. BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration // *Brain Res*. – 1996. – Vol. 710. – No. 1-2. – P. 11-20. – DOI: 10.1016/0006-8993(95)01289-3.
- 139.Skaper S.D. Neurotrophic factors: an overview // *Methods Mol Biol*. – 2018. – Vol. 1727. – P. 1-17. – DOI: 10.1007/978-1-4939-7571-6\_1.
- 140.Sousa-Victor P., Neves J., Cedron-Craft W., Ventura P.B., Liao C.Y., Riley R.R., Soifer I., van Bruggen N., Kolumam G.A., Villeda S.A., et al. MANF regulates metabolic and immune homeostasis in ageing and protects against liver damage // *Nat Metab*. – 2019. – Vol. 1. – No. 2. – P. 276-290. – DOI: 10.1038/s42255-018-0023-6.
- 141.Stansberry W.M., et al. Neurotrophic factors in the physiology of motor neurons and their role in the pathobiology and therapeutic approach to amyotrophic lateral sclerosis // *Front Mol Neurosci*. – 2023. – Vol. 16. – Art. 1238453. – DOI: 10.3389/fnmol.2023.1238453.
- 142.Steinbusch H.W.M., Dolatkah M.A., Hopkins D.A. Anatomical and neurochemical organization of the serotonergic system in the mammalian brain and in particular the involvement of the dorsal raphe nucleus in relation to neurological diseases // *Prog Brain Res*. – 2021. – Vol. 261. – P. 41-81. – DOI: 10.1016/bs.pbr.2021.02.003.
- 143.Stepanova P., Srinivasan V., Lindholm D., Voutilainen M.H. Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) protects against quinolinic acid-induced toxicity in in vitro and in vivo models of Huntington's disease // *Sci Rep*. – 2020. – Vol. 10. – No. 1. – Art. 19045. – DOI: 10.1038/s41598-020-75439-1.
- 144.Stiedl O., Pappa E., Konradsson-Geuken Å., Ögren S.O. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory // *Front Pharmacol*. – 2015. – Vol. 6. – Art. 162. – DOI: 10.3389/fphar.2015.00162.
- 145.Sui L., Wang J., Li B.M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex // *Learn Mem*. – 2008. – Vol. 15. – No. 10. – P. 762-776. – DOI: 10.1101/lm.1067808.
- 146.Sun Z.P., Gong L., Huang S.H., Geng Z., Cheng L., Chen Z.Y. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells // *J Neurochem*. – 2011. – Vol. 117. – No. 1. – P. 121-132. – DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07179.x.
- 147.Tang T., Li Y., Jiao Q., Du X., Jiang H. Cerebral dopamine neurotrophic factor: a potential therapeutic agent for Parkinson's disease // *Neurosci Bull*. – 2017. – Vol. 33. – No. 5. – P. 568-575. – DOI: 10.1007/s12264-017-0123-4.

148. Teng K.K., Felice S., Kim T., Hempstead B.L. Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges // *Dev Neurobiol.* – 2010. – Vol. 70. – No. 5. – P. 350-359. – DOI: 10.1002/dneu.20768.
149. Teng K.K., Hempstead B.L. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems // *Cell Mol Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – No. 1. – P. 35-48. – DOI: 10.1007/s00018-003-3099-3.
150. Tikhonova M., Kulikov A.V. Antidepressant-like effects of central BDNF administration in mice of antidepressant sensitive catalepsy (ASC) strain // *Chin J Physiol.* – 2012. – Vol. 55. – No. 4. – P. 284-293. – DOI: 10.4077/CJP.2012.BAA041.
151. Trychta K.A., Bäck S., Henderson M.J., Harvey B.K. KDEL receptors are differentially regulated to maintain the ER proteome under calcium deficiency // *Cell Rep.* – 2018. – Vol. 25. – No. 7. – P. 1829-1840.e6. – DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.055.
152. Tsybko A.S., Ilchibaeva T.V., Kulikov A.V., Kulikova E.A., Krasnov I.B., Sychev V.N., Shenkman B.S., Popova N.K., Naumenko V.S. Effect of microgravity on glial cell line-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor gene expression in the mouse brain // *J Neurosci Res.* – 2015. – Vol. 93. – No. 9. – P. 1399-1404. – DOI: 10.1002/jnr.23600.
153. Velazquez F.N., Caputto B.L., Boussin F.D. c-Fos importance for brain development // *Aging (Albany NY).* – 2015. – Vol. 7. – No. 12. – P. 1028-1029. – DOI: 10.18632/aging.100862.
154. Virachit S., Mathews K.J., Cottam V., et al. Levels of glial cell line-derived neurotrophic factor are decreased, but fibroblast growth factor 2 and cerebral dopamine neurotrophic factor are increased in the hippocampus in Parkinson's disease // *Brain Pathol.* – 2019. – Vol. 29. – No. 6. – P. 813-825. – DOI: 10.1111/bpa.12730.
155. von Bohlen und Halbach O., Klausch M. The neurotrophin system in the postnatal brain – an introduction // *Biology.* – 2024. – Vol. 13. – No. 8. – Art. 558. – DOI: 10.3390/biology13080558.
156. Voutilainen M.H., Arumäe U., Airavaara M., Saarma M. Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease // *FEBS Lett.* – 2015. – Vol. 589. – No. 24 Pt A. – P. 3739-3748. – DOI: 10.1016/j.febslet.2015.09.031.
157. Voutilainen M.H., De Lorenzo F., Stepanova P., Bäck S., Yu L.Y., Lindholm P., Pörsti E., Saarma M., Männistö P.T., Tuominen R.K. Evidence for an additive neurorestorative effect of simultaneously administered CDNF and GDNF in hemiparkinsonian rats: implications for different mechanism of action // *eNeuro.* – 2017. – Vol. 4. – No. 1. – Art. ENEURO.0117-16.2017. – DOI: 10.1523/ENEURO.0117-16.2017.
158. Walter P., Ron D. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8. – No. 7. – P. 519-529. – DOI: 10.1038/nrm2199.

159. Wang R., Holsinger R.M.D. Exercise-induced brain-derived neurotrophic factor expression: therapeutic implications for Alzheimer's dementia // *Ageing Res Rev.* – 2018. – Vol. 48. – P. 109-121. – DOI: 10.1016/j.arr.2018.10.002.
160. Wires E.S., Trychta K.A., Kennedy L.M., Harvey B.K. The function of KDEL receptors as UPR genes in disease // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – No. 11. – Art. 5436. – DOI: 10.3390/ijms22115436.
161. Yagi T., Asada R., Kanekura K., Eesmaa A., Lindahl M., Saarma M., Urano F. Neuroplastin modulates anti-inflammatory effects of MANF // *iScience.* – 2020. – Vol. 23. – No. 12. – Art. 101810. – DOI: 10.1016/j.isci.2020.101810.
162. Yan Y., Rato C., Rohland L., Preissler S., Ron D. MANF antagonizes nucleotide exchange by the endoplasmic reticulum chaperone BiP // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10. – No. 1. – Art. 541. – DOI: 10.1038/s41467-019-08450-4.
163. Yoon S.B., Park Y.H., Choi S.A., Yang H.J., Jeong P.S., Cha J.J., Lee S., Lee S.H., Lee J.H., Sim B.W., et al. Real-time PCR quantification of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) using a universal primer method // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14. – No. 7. – Art. e0219978. – DOI: 10.1371/journal.pone.0219978.
164. You H., Lu B. Diverse functions of multiple Bdnf transcripts driven by distinct Bdnf promoters // *Biomolecules.* – 2023. – Vol. 13. – No. 4. – Art. 655. – DOI: 10.3390/biom13040655.
165. Zhang G.L., Wang L.H., Liu X.Y., Zhang Y.X., Hu M.Y., Liu L., Fang Y.Y., Mu Y., Zhao Y., Huang S.H., et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) has neuroprotective effects against cerebral ischemia that may occur through the endoplasmic reticulum stress pathway // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19. – No. 7. – Art. 1905. – DOI: 10.3390/ijms19071905.
166. Zhang X.L., Chen X., Wang Y., et al. Dopamine regulates colonic glial cell-derived neurotrophic factor secretion through cholinergic dependent and independent pathways // *Br J Pharmacol.* – 2023. – Vol. 180. – No. 24. – P. 3154-3171. – DOI: 10.1111/bph.16234.
167. Zhang Y., Xiang Y., Wang X., Zhu L., Li H., Wang S., Pan X., Zhao H. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects microglia by combining with AKT and by regulating FoxO1/mTOR signaling during neuroinflammation // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 109. – P. 2278-2284. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.028.
168. Zhao H., Cheng L., Liu Y., Zhang W., Maharjan S., Cui Z., Wang X., Tang D., Nie L. Mechanisms of anti-inflammatory property of conserved dopamine neurotrophic factor: inhibition of JNK signaling in lipopolysaccharide-induced microglia // *J Mol Neurosci.* – 2014. – Vol. 52. – No. 2. – P. 186-192. – DOI: 10.1007/s12031-013-0120-7.

169. Zhivkovich M., Ermolaeva E.V., Soboleva A.V., Samoiloa E.M., Chudakova D.A., Baklaushev V.P. Brain neurotrophic factor BDNF: new data, functions and questions // *Genes & Cells*. – 2024. – Vol. 19. – No. 1. – P. 61-84. – DOI: 10.17816/gc623163.
170. Zhou W., Chang L., Fang Y., Du Z., Li Y., Song Y., Hao F., Lv L., Wu Y. Cerebral dopamine neurotrophic factor alleviates A $\beta$  25-35-induced endoplasmic reticulum stress and early synaptotoxicity in rat hippocampal cells // *Neurosci Lett*. – 2016. – Vol. 633. – P. 40-46. – DOI: 10.1016/j.neulet.2016.09.008.