



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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск - 2026

Работа выполнена в Лаборатории нейрогеномики поведения в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Науменко Владимир Сергеевич**

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
заведующий лабораторией нейрогеномики поведения,
главный научный сотрудник в ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии и генетики
СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Пчелина Софья Николаевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной генетики человека, Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», г. Санкт-Петербург.

Кожевникова Елена Николаевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией моделирования патологий человека, Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г.Новосибирск.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород.

Защита состоится «__» _____ 2026 г. на заседании Диссертационного совета 24.1.239.03 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

А. С. Цыбко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 нервной системы, так и многих других систем организма (Skaper, 2018). НТФ принимают участие в регуляции роста, развития, дифференциации, миграции и выживания клеточных популяций, процессах их адаптации к внешним воздействиям (Bothwell, 2014).

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, запуская нижележащие сигнальные пути, такие как путь регулируемой внеклеточными сигналами киназы (Ras/ERK), путь PLC γ 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 за нейропротекторный и восстановительный эффект в отношении дофаминергических нейронов на моделях болезни Паркинсона у грызунов и приматов (6-OHDA, MPTP) (Airavaara et al., 2012; Garea-Rodríguez et al., 2016). Это послужило основанием для клинических испытаний на людях, где CDNF показал безопасность, но не продемонстрировал значимого терапевтического эффекта (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. 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 классифицируется как НТФ в силу нейропротекторного и восстанавливающего действия, структурно он не похож на какие-либо другие классические НТФ. Кроме того, для CDNF не было идентифицировано собственных рецепторов на клеточной поверхности. Однако позднее обнаружили, что CDNF может связываться с KDEL-рецептором на плазматической мембране через С-концевую KDEL-подобную последовательность (Lindholm and Saarma, 2022).

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 (Popova et al., 2017). Однако спектр действия CDNF, судя по всему, шире дофаминергического. Это поднимает вопрос о его потенциальном влиянии на серотониновую систему – по аналогии с BDNF и GDNF

Таким образом, **целью данной работы** является 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; МАОА; 5-НТ_{1А}, 5-НТ_{2А} и 5-НТ₇ 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 конструктора 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_{1A}, 5-НТ_{2A} и 5-НТ₇ 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 рецепторов серотониновой системы (*Htr1a* и *Htr7*), увеличивает экспрессию генов, а также вызывает тенденцию к увеличению уровня фосфорилирования белков, принимающих участие в процессах нейропластичности (c-Fos и CREB) в среднем мозге. Сверхэкспрессия белка CDNF в гиппокампе оказывает 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 CDFN 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 ретикулума (*Hspa5*, *Xbp1*) и повышением уровня фосфорилирования белков c-Fos и CREB, вовлеченных в механизмы регуляции нейропластичности.
- 3) Эндогенная локальная сверхэкспрессия CDFN 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 ретикулума (*Atf6*, *Hspa5*, *Eif2ak3*, *Ern1*, *Xbp1*), белков-маркеров нейрональной пластичности (c-Fos, CREB) а также ключевых генов серотониновой системы, за исключением гена *Htr1a* рецептора серотонина, уровень мРНК которого снижается.

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 6 работ в рецензируемых изданиях, из них 2 статьи и 4 тезиса конференций. Результаты работы вошли в отчет по гранту РФФИ №19-75-00016.

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.

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 рисунок. Общий объем диссертационного исследования составляет 101 страницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на взрослых (2-3 месяца) самцах мышей линии C57BL/6 на базе ЦКП «SPF виварий» ИЦиГ СО РАН. Одна группа животных получила центральную инъекцию (i.c.v.) 3/10/30 мкг рекомбинантного белка CDNF в левый боковой желудочек мозга (стереотаксические координаты AP: -0.5 мм, ML: -1.0 мм, DV: 2.0 мм), проходила поведенческое тестирование, после чего выводилась из эксперимента. В другом эксперименте животным вводили аденоассоциированные вирусные конструкторы в гиппокамп (AP: -2 мм, ML: -1.5 мм, DV: 2 мм и AP: -2 мм, ML: +1.5 мм, DV: 2 мм) для обеспечения сверхэкспрессии белка CDNF, через 4 недели животные также проходили различные поведенческие тесты, после чего выводились из эксперимента.

Поведенческое тестирование. С помощью установки PhenoMaster (TSE Systems, Германия) автоматически регистрировались такие физиологические показатели животных как: общая двигательная активность, потребление пищи и воды, время сна. В течение трех дней у животных исследовали когнитивные способности с помощью теста «Оперантная стенка».

Для исследования тревожного поведения были проведены тесты «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». С помощью тестов «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание» оценивали выраженность поведенческого отчаяния. Тест «Распознавание нового объекта» проводили для оценки исследовательского поведения и неофобии, страха перед новым. С помощью «Трехкамерного социального теста» и теста «Резидент-интродер» оценивали социальный интерес и агрессию у животных. С помощью теста «Оперантная стенка»

исследовали ассоциативное обучение, а с помощью теста «Водный лабиринт Морриса» пространственное обучение.

Генно-инженерные и молекулярные методы. Для обеспечения сверхэкспрессии белка CDNF в нейронах животных *in vivo* был создан аденоассоциированный вирусный конструкт AAV-Syn-CDNF-EGFP, а также AAV-Syn-EGFP в качестве контроля. Промотор Syn1 обеспечивал конститутивную длительную сверхэкспрессию белка CDNF в нейронах.

Для количественной оценки уровня мРНК исследуемых генов проводился ПЦР с детекцией в режиме реального времени (real-time PCR). В качестве внешнего экзогенного стандарта для контроля ПЦР использовалась серия разведений геномной ДНК, которая амплифицировалась в отдельных пробирках и была использована для построения калибровочной кривой, в качестве внутреннего стандарта использовалась кДНК гена *Polr2a*

Для оценки уровня белка исследуемых генов проводился Вестерн блот-анализ. Уровни целевого белка были нормализованы на уровень белка GAPDH и представлены в процентах от значений контрольных животных. Определение уровня серотонина и его метаболита проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для визуального подтверждения сверхэкспрессии CDNF срезы гиппокампа проинкубировали с антителами к CDNF, а также с антителами к кальретикулину для подтверждения локализации белка в ЭПР и проводили последующий анализ с использованием конфокального микроскопа.

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 Н-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.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффекты i.c.v. инъекции рекомбинантного белка CDNF на поведение у мышей

У мышей через 48 ч после *i.c.v.* введения CDNF (3 мкг) отмечалось временное увеличение суточного пройденного пути ($F_{3,21} = 3.17$; $p < 0.05$), однако в последующие дни и по общему показателю за весь эксперимент значимых различий не выявлено. Потребление воды и пищи не изменилось, но снизилась масса тела ($F_{3,28} = 3.17$; $p < 0.01$). Выявлено взаимодействие «инъекция $\times$ время» по продолжительности сна ($F_{192,1792} = 1.18$; $p = 0.05$), так через 48 ч в светлую фазу средняя длина эпизода сна была меньше у опытной группы, а общая продолжительность эпизодов сна оказалась снижена ($F_{3,54} = 5.53$; $p < 0.01$). Таким образом, CDNF вызывает достоверные, но обратимые нарушения сна.

CDNF улучшил ассоциативное обучение: на 3-й день теста «оперантная стенка» у опытных мышей возросли число тычков носом ($H = 8.2$; $p < 0.05$) и количество полученных пеллет ($H = 8.764$; $p < 0.05$; Рис. 1А). В «открытом поле» двигательная активность не изменилась, но животные получившие 30 мкг CDNF дольше находились в центре арены ($F_{3,27} = 3.83$; $p < 0.05$; Рис. 1Б), что указывает на анксиолитический эффект. Это подтвердилось в приподнятом крестообразном лабиринте – увеличились время в открытых рукавах ($F_{3,27} = 3.11$; $p < 0.05$) и исследованная площадь арены ($F_{3,27} = 3.37$; $p < 0.05$; Рис. 1В), а также снизился латентный период первого выглядывания ($F_{3,27} = 6.85$; $p < 0.01$). В тесте принудительного плавания ANOVA не выявил статистически-значимых различий ($F_{3,24} = 2.53$; $p = 0.08$). Однако применение post-hoc теста Даннетта выявило снижение времени неподвижности у животных получивших 30 мкг (Рис. 1Г). Таким образом,

i.c.v. введение CDNF оказывает анксиолитический эффект, а в максимальной дозе 30 мкг уменьшает выраженность поведенческого отчаяния.

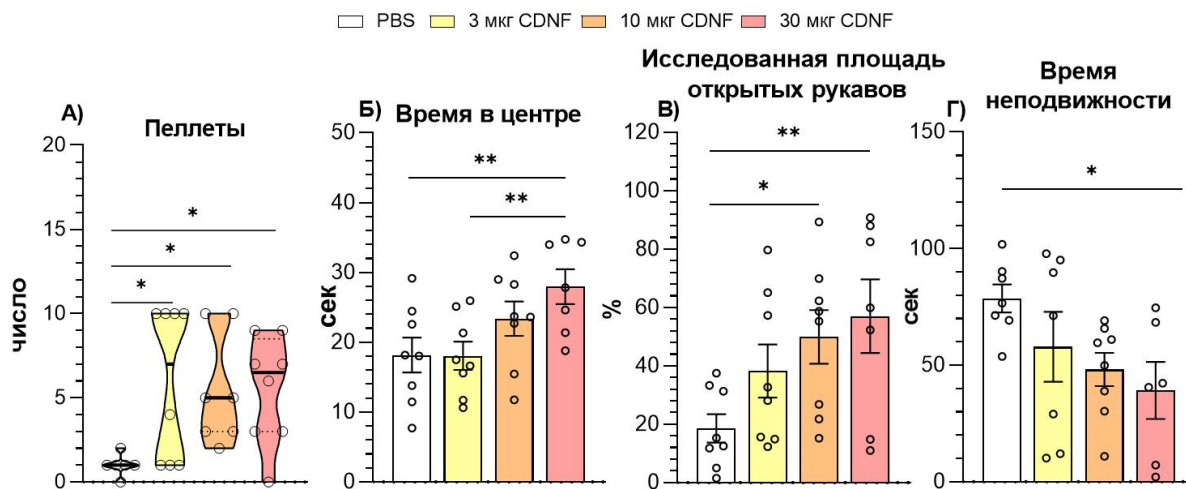


Рис. 1 Эффекты центрального введения белка CDNF в тестах «оперантная стенка» (А), «открытое поле» (Б), «приподнятый крестообразный лабиринт» (В), «принудительное плавание» (Г). (А) $*p < 0.05$ – по сравнению с PBS (критерий Краскела-Уоллиса со множественным сравнением по Данну). (Б,В) $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишеру). (Г) $*p < 0.05$ (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Даннету).

Влияние i.c.v. введения белка CDNF на обмен серотонина, экспрессию его ферментов метаболизма и рецепторов, экспрессию генов нейропластичности, а также уровень мРНК генов UPR у мышей

Однократная инъекция мышам белка CDNF увеличила уровень метаболизма 5-НТ, что отразилось в возросшем соотношении 5-ГИУК/5-НТ (Рис. 2А) в среднем мозге ($F_{3,28} = 4.11$; $p < 0.05$), фронтальной коре ($F_{3,27} = 3.27$; $p < 0.05$) и гиппокампе ($F_{3,28} = 5.98$; $p < 0.01$). Мы обнаружили значительные изменения в уровне мРНК 5-НТ рецепторов в исследуемых структурах. Так, уровень мРНК 5-НТ_{1A} рецептора увеличился ($F_{3,23} = 13.05$; $p < 0.001$; Рис. 2Б) во фронтальной коре после введения CDNF во всех дозах по сравнению с контролем. Мыши, получившие 10 или 30 мкг белка CDNF, имели более низкий уровень мРНК 5-НТ₇ рецептора в гиппокампе ($F_{3,28} = 5.66$; $p < 0.01$; Рис. 2Б). Однако эти результаты не сопровождались существенными изменениями в уровне белка исследуемых 5-НТ-рецепторов. При этом в среднем мозге наблюдалось увеличение уровня белка MAOA, но только у мышей, получивших 30 мкг CDNF ($F_{3,23} = 4.427$; $p < 0.05$). Таким образом, инъекция CDNF

вызвала значительные изменения в уровне мРНК рецепторов серотонина, а также увеличила уровень белка фермента катаболизма 5-НТ у экспериментальных животных.

Увеличение отношения сплайсированной формы гена *Xbp1* к несплайсированной говорит об активации пути UPR. После введения рекомбинантного белка CDNF данное соотношение 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. 2Б), во фронтальной коре снижался уровень мРНК *Atf6* ($F_{3,24} = 6.89$; $p < 0.01$), в гиппокампе снижался уровень мРНК *Eif2ak3* ($F_{3,28} = 8.96$; $p < 0.001$) и *Ern1* ($F_{3,28} = 4.27$; $p < 0.01$). Таким образом, CDNF оказывает структуроспецифический эффект на гены каскада UPR.

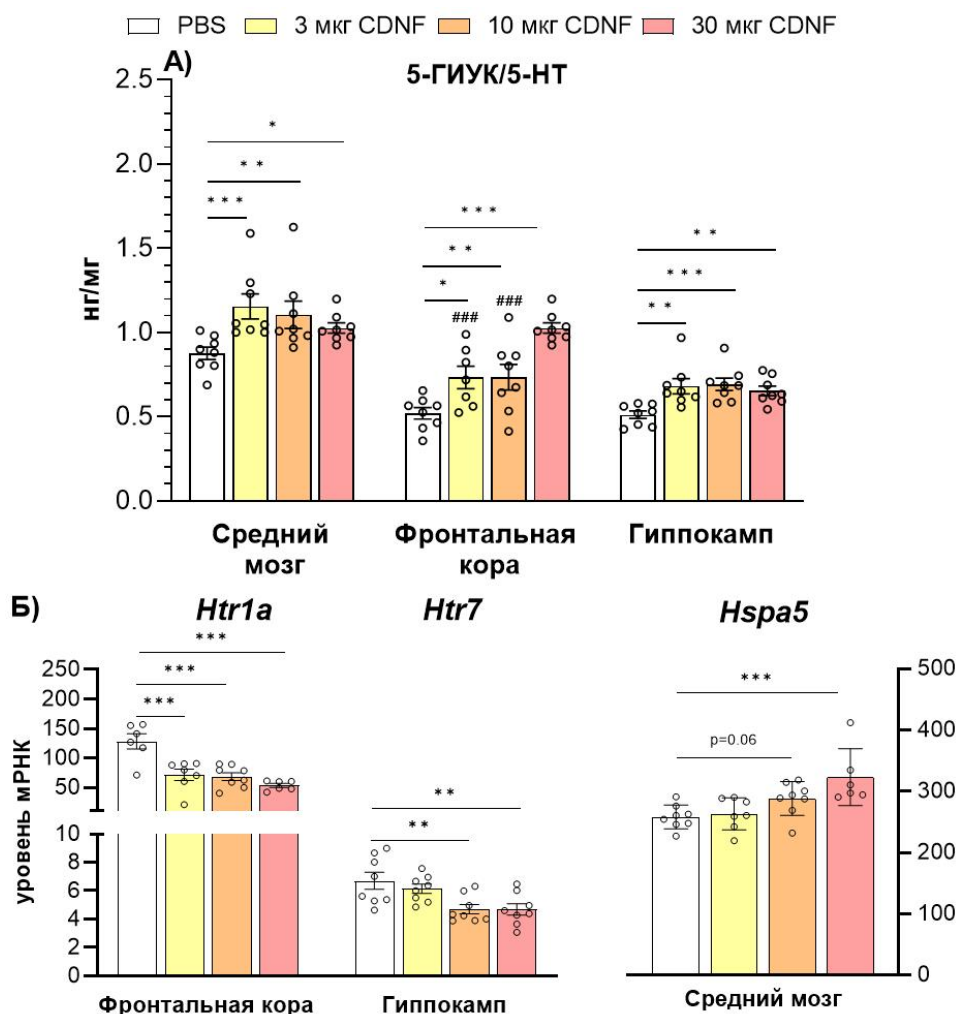


Рис. 2 Эффекты центрального введения белка CDNF на уровень метаболизма серотонина (А), а также экспрессию основных генов серотониновой системы и гены UPR (Б). ### $p < 0.001$ – по сравнению с 30 мкг CDNF; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишери).

После инъекции CDNF у мышей изменился уровень мРНК некоторых генов, связанных с нейропластичностью. Так, например, уровень мРНК *Fos* увеличился в исследованных структурах ($F_{3,26} = 4.27$; $p < 0.05$ в среднем мозге; $F_{3,21} = 5.66$; $p < 0.01$ во фронтальной коре; $F_{3,28} = 8.57$; $p < 0.001$ в гиппокампе; $F_{3,26} = 4.41$; $p < 0.01$ в гипоталамусе, соответственно; Рис. 3А). Уровни фосфорилирования белков c-Fos ($F_{3,21} = 2.66$; $p = 0.07$; Рис. 2Б) и CREB ($F_{3,21} = 2.84$; $p = 0.06$; Рис. 2Б) имели тенденцию к росту в среднем мозге с эффектом только при максимальных дозах CDNF. Можно предположить, что именно фосфорилирование CREB и c-Fos сыграло роль в улучшении уровня ассоциативного обучения у мышей.

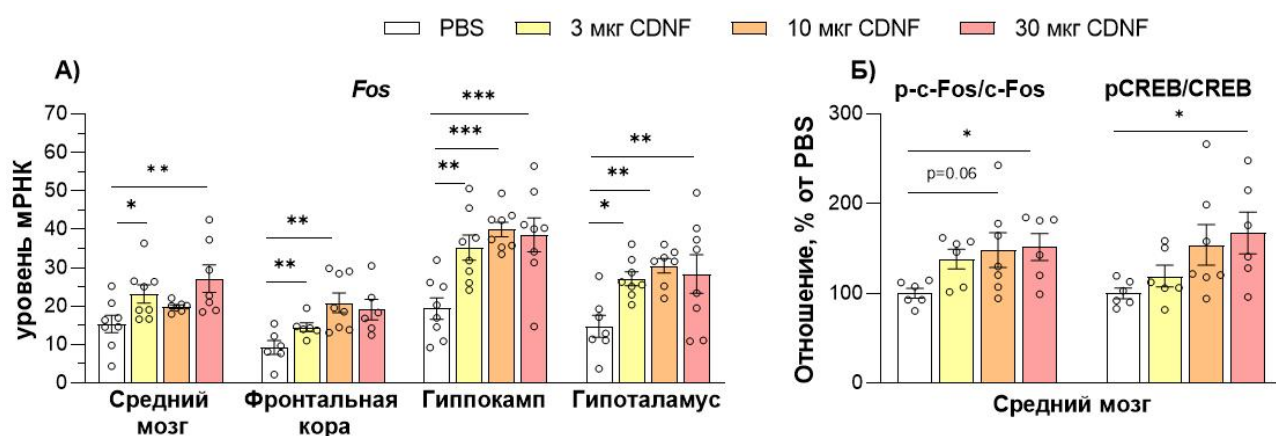


Рис. 3 Эффекты центрального введения белка CDNF на уровень мРНК *Fos* (А) и уровень фосфорилирования белков c-Fos и CREB. (А) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Фишери). (Б) * $p < 0.05$ – по сравнению с PBS (Однофакторный ANOVA, post-hoc по Даннету)

Влияние сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на поведение мышей

Тестирование мышей в установке PhenoMaster показало, что сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе не повлияла ни на двигательную активность, ни на потребление пищи и воды. В отличие от i.c.v. инъекции белка CDNF, его сверхэкспрессия в гиппокампе не вызвала каких-либо нарушений в циркадных ритмах. Также, эндогенный CDNF не вызвал улучшения ассоциативного обучения, а также пространственного обучения в водном лабиринте Морриса у экспериментальных животных. Сверхэкспрессия белка CDNF не повлияла и на тревожное поведение в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». При этом у животных со сверхэкспрессией CDNF в гиппокампе возросло время неподвижности

($t=2.656$; $df=16$; $p<0.05$) в тесте «подвешивание за хвост», что может отражать большую выраженность поведенческого отчаяния.

Сверхэкспрессия белка CDNF оказала положительный эффект на социальный интерес у мышей. Так, в трехкамерном тесте повысился индекс социального предпочтения ($t=2.221$; $df=12$; $p<0.05$; Рис. 4А). В подтверждение данного эффекта в тесте «резидент-интродер» выросло количество ($U=19$; $n=18$; $p<0.05$; Рис. 4В) и продолжительность контактов ($U=16$; $n=18$; $p<0.05$; Рис. 4Г) между животными.

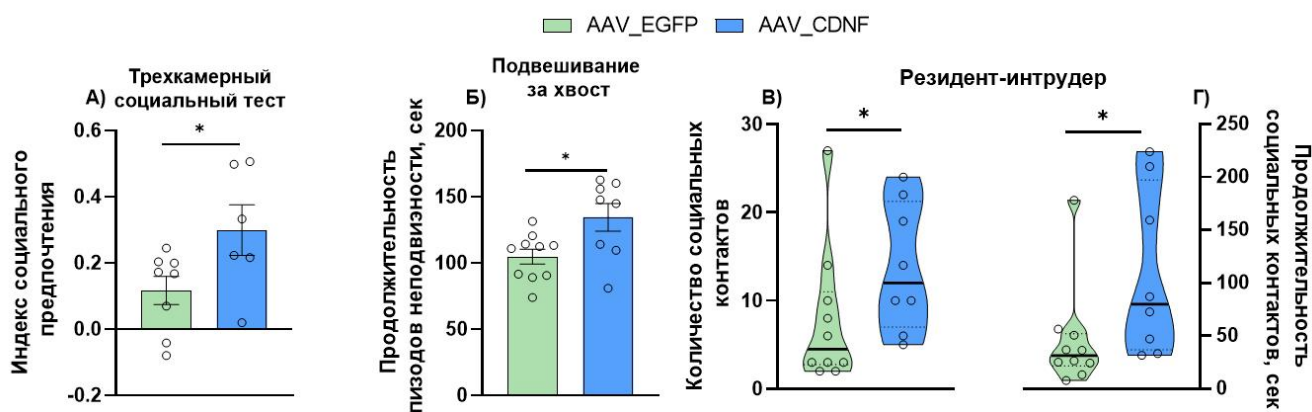


Рис. 4 Влияние сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на поведение мышей в «трехкамерном социальном» тесте (А), в тесте «подвешивание за хвост» (Б) и в тесте «резидент-интродер» (В, Г). * $p<0.05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента)

Влияние сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на экспрессию ключевых генов серотониновой системы, генов UPR, а также генов нейропластичности у мышей

Инъекция аденоассоциированного вирусного конструктора AAV-Syn-CDNF-EGFP в гиппокампы мышей вызвала сверхэкспрессию CDNF как на уровне мРНК ($t=15.79$; $df=16$; $p<0.001$) (Рис. 5А), так и на уровне белка ($t=4.63$; $df=13$; $p<0.001$) (Рис. 5Б). Кроме того, было показано, что экспрессируемый CDNF ко-локализуется с кальретикулином, являющимся белком-маркером ЭПР.

Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе мышей 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. 5 В), что, однако, не отразилось в уровне белка 5-HT_{1A} рецептора. Сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе мышей 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. В отличие от i.c.v. 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.

Введение вирусного конструктора AAV-Syn-CDNF-EGFP у мышей вызвало увеличение уровня мРНК *Hspa5* ($t=2.107$; $df=17$; $p=0.0503$), экспрессия же других генов, связанных с UPR, осталась без изменений (Рис. 5Г). 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.

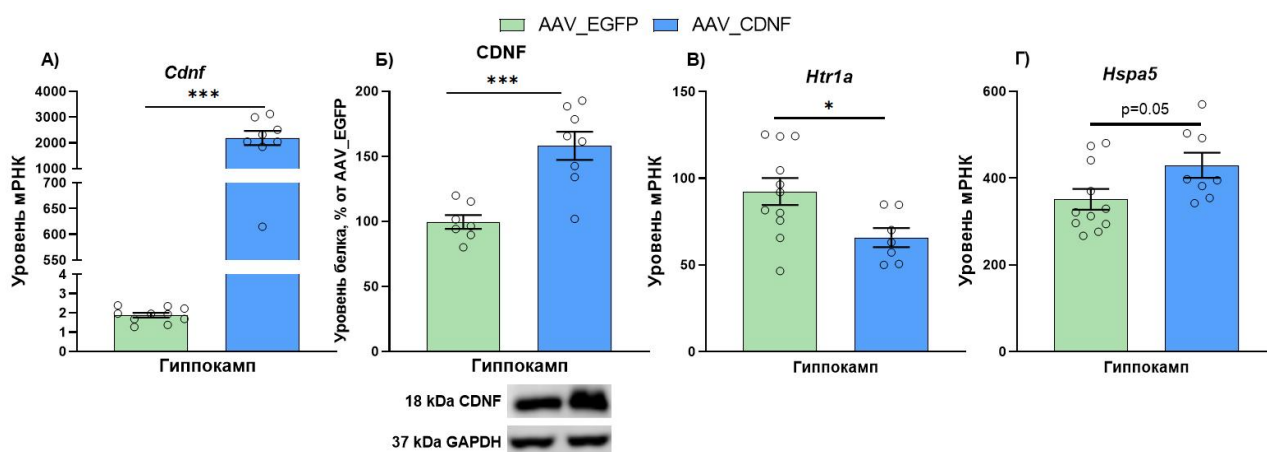


Рис. 5 Влияние сверхэкспрессии CDNF в гиппокампе на экспрессию ключевых генов серотониновой системы, генов UPR. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента).

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 неоторных нарушений (когнитивных, аффективных, социальных) при нейродегенеративных заболеваниях. Однако требуются дальнейшие исследования для уточнения механизмов действия CDNF 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 развернутые 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) Таким образом, 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-НТ систему и механизмы нейропластичности, тогда как локальная сверхэкспрессия CDNF в гиппокампе усиливает социальный интерес, но сопровождается парадоксальным усилением депрессивно-подобного поведения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации по теме работы в рецензируемых журналах:

1. **Eremin D.V.**, Kaminskaya Y.P., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.S., Tsybko A.S. Overexpression of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the hippocampus enhances social interest in C57BL/6J mice. *Neurochemical Journal*. 2025. Vol. 19. P. 374–386. doi: 10.1134/S1819712425700424. IF (JCR): 0.5. WoS, Scopus, РИНЦ.
2. Tsybko A., **Eremin D.**, Ilchibaeva T., Khotskin N., Naumenko V. CDNF Exerts Anxiolytic, Antidepressant-like, and Procognitive Effects and Modulates Serotonin Turnover and Neuroplasticity-Related Genes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. Vol. 25. No. 19: 10343. doi: 10.3390/ijms251910343. IF (JCR): 4.9. WoS, Scopus.

Тезисы конференций по теме работы:

1. **Еремин Д.В.**, Хоцкин Н.В., Науменко В.С., Цыбко А.С. Влияние сверхэкспрессии белка CDNF в гиппокампе на серотониновую систему мозга и поведение у мышей. *Международный конгресс CRISPR-2023*. Материалы международного конгресса. Санкт-Петербург, 2023. С. 67–68.
2. Цыбко А.С., **Ерёмин Д.В.**, Хоцкин Н.В., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. Рекомбинантный белок CDNF как потенциальное средство коррекции поведенческих нарушений при нейродегенеративных заболеваниях. *V Национальный конгресс по регенеративной медицине*. Москва, 2022. Гены и Клетки. 2022. Т. 17. № 3. С. 249.
3. **Eremin D.V.**, Khotskin N.V., Naumenko V.S., Tsybko A.S. Effects of central administration of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) on the behavior and serotonin system in the mouse brain. *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)*. Abstracts the Thirteenth International Multiconference. Novosibirsk, 2022. С. 934.
4. **Еремин Д.В.**, Цыбко А.С. Эффекты центрального введения дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) на поведение и метаболизм серотонина в мозге мышей. *58-я Международная научная студенческая конференция*. Материалы 58-й Международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 2020. С. 129.