

**Министерство здравоохранения
Российской Федерации**

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный
медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П.
Сербского"

На правах рукописи

ПАВЛОВА
Ольга Валерьевна

**Рекомбинантный BDNF. Получение моноклональных антител,
разработка тест-системы иммуноферментного анализа и клинико-
лабораторная диагностика**

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Специальность: 1.5.4. – Биохимия

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
профессор,
доктор медицинских наук
Гурина Ольга Ивановна

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ:

Оглавление	2 стр.
Список сокращений и обозначений	4 стр.
Введение	5 стр.
Глава 1. Обзор литературы	14 стр.
1.1 Нейротрофический фактор мозга (BDNF)	14 стр.
1.2 BDNF при депрессивных расстройствах	23 стр.
1.2.1 Рецепторы TrkB	23 стр.
1.2.2 Взаимосвязь BDNF с другими системами, участвующими в патогенезе депрессий	23 стр.
1.2.3 BDNF и действие антидепрессантов	27 стр.
1.3 Однонуклеотидный полиморфизм гена <i>bdnf</i> Val66Met	29 стр.
1.4 Эпигенетические модификации гена <i>bdnf</i> , связанные с депрессивными расстройствами	34 стр.
1.5 микроРНК, связанные с BDNF и с депрессивными расстройствами	36 стр.
1.6 Связь между периферическим и центральным BDNF	37 стр.
Глава 2. Материалы и методы	45 стр.
2.1 Пациенты	46 стр.
2.2 Животные	46 стр.
2.3 Культуры клеток	47 стр.
2.4 Получение рекомбинантного белка recBDNF	48 стр.
2.4.1 Создание штамма-продуцента recBDNF на основе <i>E.coli</i>	50 стр.
2.4.2 Культивирование штамма-продуцента и анализ интенсивности экспрессии рекомбинантного белка	57 стр.
2.4.3 Препаративное выделение рекомбинантного recBDNF	58 стр.
2.4.4 Проведение аналитического электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга	59 стр.
2.5 Получение поликлональных антител	61 стр.
2.5.1 Иммунизация животных	61 стр.
2.5.2 Очистка поликлональных антител методом иммуноаффинной хроматографии	62 стр.
2.6 Получение моноклональных антител к recBDNF	63 стр.
2.6.1 Иммунизация животных	67 стр.
2.6.2 Процедура слияния	68 стр.
2.6.3 Процедура клонирования	70 стр.
2.6.4 Нарботка моноклональных антител	71 стр.
2.6.5 Очистка моноклональных антител методом аффинной хроматографии	72 стр.
2.7 Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител	74 стр.
2.8 Иммуноморфологический анализ	75 стр.
2.8.1 Иммуногистохимический анализ	76 стр.
2.8.2 Иммуноцитохимический анализ	76 стр.

2.9 Иммуноферментный анализ	77 стр.
2.10 Разработка тест-системы иммуноферментного анализа для количественного определения BDNF	81 стр.
2.11 Статистический анализ	86 стр.
Глава 3. Результаты собственных исследований	87 стр.
3.1 Получение штамма-продуцента recBDNF	87 стр.
3.2 Культивирование штамма-продуцента <i>E.coli</i> и анализ интенсивности экспрессии рекомбинантного белка	88 стр.
3.3 Препаративное выделение рекомбинантного recBDNF	89 стр.
3.4 Получение поликлональных антител к рекомбинантному белку recBDNF	92 стр.
3.4 Получение моноклональных антител к рекомбинантному белку recBDNF	94 стр.
3.5 Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител	100 стр.
3.6 Иммунохимическая специфичность поли- и моноклональных антител	103 стр.
3.7 Разработка тест-системы иммуноферментного анализа	105 стр.
3.8 Количественный анализ BDNF в сыворотках крови пациентов с помощью разработанной тест-системы ИФА	111 стр.
Глава 4. Обсуждение	115 стр.
Выводы	122 стр.
Список литературы	124 стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга.

CREB (cAMP response element-binding protein) – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор.

mBDNF (mature BDNF) – зрелая форма нейротрофического фактора мозга.

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер.

recBDNF (recombinant BDNF) – рекомбинантный белок, содержащий аминокислотную последовательность нейротрофического фактора мозга человека.

ИФА – иммуноферментный анализ.

ПААГ – полиакриламидный гель.

Периферический BDNF – BDNF, содержащийся в периферической крови.

Центральный BDNF – BDNF, содержащийся в центральной нервной системе.

ЦНС – центральная нервная система.

Введение

Актуальность

В настоящее время психическое здоровье человека является одной из наиболее серьёзных проблем, стоящих перед всеми странами, поскольку те или иные нарушения психики возникают у каждого четвёртого человека в мире и, соответственно, количество людей с психическими расстройствами увеличивается из года в год. Более 40% всех хронических заболеваний связаны с психическими расстройствами, при этом значительно возрастает инвалидизация населения, что повышает тяжесть экономического бремени болезней.

Депрессивное расстройство является наиболее распространённым психическим заболеванием во всем мире, которое, в основном, характеризуется подавленным настроением, ангедонией, нарушениями сна и аппетита, а также нарушениями когнитивных и двигательных функций, памяти и нейровегетативными симптомами (Dean J., 2017). Кроме того, депрессии приводят к патофизиологическим нарушениям в работе многих систем организма, что повышает риск развития других болезней (Halaris A., 2017; Gothe F., 2012). Также среди людей, страдающих таким расстройством, наблюдается высокий уровень самоубийств (Rihmer Z., 2018). Основными проблемами при диагностике и лечении депрессий являются гетерогенность самого заболевания, низкая частота ремиссии и ограниченная эффективность антидепрессантной терапии с появлением "резистентной к лечению" депрессией в ряде случаев (Otte C., 2016; Malhi G. S., 2018, Kraus C., 2019, Davies P., 2019). Этиология депрессии, как и в случае с другими психическими расстройствами, невероятно сложна. Поэтому в современной психиатрии как никогда остро стоит проблема поиска биологических маркеров для своевременной диагностики, оценки эффективности терапии и определения новых лекарственных мишеней. Необходимыми характеристиками данных биомаркеров должны являться высокая чувствительность и специфичность

при диагностике заболевания, а также воспроизводимость, надежность, малая инвазивность метода определения (Redei E. E., 2015).

Биологические механизмы, лежащие в основе патогенеза депрессивных расстройств, представляют собой сложный взаимосвязанный комплекс биохимических, генетических и морфологических изменений, с преобладанием какого-либо компонента при разных подтипах этого заболевания (Ушакова В. М., 2020; Иванова С. А., 2018). На молекулярном уровне эти изменения затрагивают системы моноаминергических нейротрансмиттеров, также наблюдаются дисрегуляция в системе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, снижение выработки нейротрофинов, что влияет на нейропластичность и нейрогенез, метаболическая и митохондриальная дисфункции, нарушение иммунного ответа с усилением воспаления, окислительный стресс. Кроме того, свой вклад в патогенез депрессии вносят генетические и эпигенетические факторы. Потенциальные биомаркеры, по возможности, должны отражать данные изменения – протеомные маркеры, факторы роста, цитокины, маркеры воспаления, метаболиты, маркеры окислительного стресса, гормоны и так далее (Lopresti A. L., 2014; Узбеков М. Г., 2016; Woods A. G., 2021; Malik S., 2021).

Одним из ключевых звеньев нейробиологии депрессивных расстройств является снижение нейрогенеза, что сопровождается изменениями структурной и функциональной нейропластичности (Liu W., 2017). Для депрессивных состояний выявлено снижение серого вещества гиппокампа за счет уменьшения количества и размеров нейронов и глии, и меньший объем гиппокампа связан с более тяжелым течением болезни, а также с не леченными формами депрессии (Tartt A. N., 2022; Trifu S. C., 2020). Потенциальными механизмами, лежащими в основе такого нарушения нейрогенеза, являются повышение уровня циркулирующих глюкокортикоидов, эксайтотоксичность глутамата (т.е. возникающий при гиперактивации NMDA- и AMPA-рецепторов патологический процесс, который приводит к повреждению и гибели нейронов), снижение экспрессии нейротрофических факторов и усиление регуляции проапоптотических путей

(Bourin M., 2021). Известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF) способствует росту и развитию многих типов нейронов, а также глиальных клеток, дендритному росту и ветвлению (арборизации), формированию дендритных шипиков, обеспечивает нейротрофическую поддержку, «защищая» нейроны от нейротоксических воздействий в условиях различных видов стресса. Таким образом, снижение уровней BDNF при депрессивных расстройствах могут влиять на нейрогенез и жизнеспособность нейронов некоторых отделов головного мозга (Rana T., 2021).

При депрессивных расстройствах также происходят нарушения в нейронных цепях, ответственных за настроение и когнитивные функции (гиппокамп, префронтальная кора, миндалевидное тело). Процессы обучения и памяти обуславливаются механизмами долгосрочной потенциации (LTP) и долгосрочной депрессии (LTD), индукция которых зависит от совместной активности глутаматергических NMDA- и AMPA-рецепторов, приводящее к изменениям синаптической силы (Luscher C., 2012). BDNF является регулятором синаптической пластичности, при этом он непосредственно модулирует NMDA- и AMPA-рецепторы и контролирует глутамат-, серотонин- и ГАМК-ергические медиаторные системы. Снижение уровня BDNF приводит к нарушениям синаптической пластичности и, соответственно, когнитивным и аффективным дисфункциям, нарушениям циркадного ритма при депрессивных расстройствах (Гуляева Н. В., 2017а; Kowianski P., 2018; Morozova A., 2022). Многочисленные исследования показывают, что прием различных классов антидепрессантов увеличивает экспрессию BDNF в гиппокампе и префронтальной коре, способствуя долгосрочным нейропластическим изменениям и приводя к снижению депрессивной симптоматики у пациентов (Duman R.S., 2021; Zanos P., 2018; Bjorkholm C., 2016). Таким образом, BDNF можно рассматривать в качестве биомаркера развития депрессивных расстройств, и прогностического маркера эффективности лекарственной терапии.

Степень разработанности: Для определения уровня BDNF в отдельных областях мозга (гиппокамп, префронтальная кора) исследователи использовали метод Вестерн-иммуноблота или гибридизации *in situ* у экспериментальных животных с различными моделями стресса (Nibuya M., 1995; Rasmusson A. M., 2002). С развитием научных методов изменялись подходы к измерениям, в последующих работах применяли метод иммуноферментного анализа (ИФА) для определения концентрации BDNF как в мозговой ткани, так и в сыворотке крови экспериментальных животных (Blugeot A., 2011). Также проводились посмертные определения уровня BDNF в тканях мозга пациентов, как с помощью Вестерн-иммуноблота, так и иммуноферментного анализа (Karege F., 2005). Дальнейшие исследования были направлены на прижизненное определение уровней белка в сыворотке или плазме крови пациентов при депрессивных расстройствах, а также при генетических вариациях *bdnf*, TrkB и для оценки эффективности терапии с использованием иммуноферментного анализа (Aydemir C., 2006; Okamoto T., 2008; Huang T.-L., 2008). Тест-системы ИФА BDNF были первоначально разработаны в 1990-х годах на основе двух видов поликлональных антител в виде сэндвич-варианта (Nawa H., 1995) и непрямого вида ИФА с использованием моноклональных антител (Kolbeck R., 1999). Также были созданы тест-системы сэндвич-варианта ИФА для определения про-BDNF и mBDNF на основе поли- и моноклональных антител и рекомбинантных белков про- и mBDNF, используемых в качестве стандартных антигенов (Lim Y., 2015). На сегодняшний момент существует большое разнообразие коммерческих наборов иммуноферментного анализа BDNF в сыворотке крови, в основном, представленные зарубежными фирмами США (R&D Systems, Invitrogen, SigmaAldrich, Abcam) и Китая (Cloud-Clone Corp. Wuhan).

Учитывая неоднородность результатов проведенных исследований по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями, а также существующую сложность при закупке зарубежных наборов ИФА, необходимо было создать собственную тест-систему

иммуноферментного анализа для количественного определения BDNF в сыворотке крови.

Цель: Разработка высокочувствительного метода определения BDNF в сыворотке крови человека и изучение диагностических возможностей тест-системы при психических расстройствах.

Задачи

1. Разработать простой и эффективный способ получения рекомбинантного препарата BDNF, позволяющего выделять белок, иммунохимически идентичный нативному, необходимый для создания иммуноферментной тест-системы.
2. Получить поликлональные антитела при иммунизации лабораторных животных рекомбинантным BDNF и моноклональные антитела к рекомбинантному белку с помощью гибридомной технологии.
3. Создать и апробировать в клинко-лабораторной практике иммуноферментную тест-систему анализа BDNF в сыворотке крови, пригодную для практического здравоохранения.
4. Провести скрининг с использованием тест-системы ИФА BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими расстройствами и оценить диагностическую значимость разработанной тест-системы.

Научная новизна

1. Впервые показано, что рекомбинантный BDNF, являющийся белком слияния и содержащий аминокислотную последовательность зрелого BDNF и тиоредоксина, обладает идентичными нативному белку иммунохимическими свойствами.

2. Разработаны модифицированные протоколы иммунизации, что позволило преодолеть иммунологическую толерантность, обусловленную межвидовой идентичностью BDNF, и получить антитела, специфически распознающие нативный антиген в иммуноферментном анализе.

3. Впервые создан и стандартизован сэндвич-вариант твердофазного ИФА для определения концентрации BDNF в сыворотке крови человека на основе рекомбинантного препарата BDNF и полученных к нему антител.

Научная и практическая значимость

1. Разработанная тест-система иммуноферментного анализа BDNF характеризуется высоким уровнем технологичности. Все антительные компоненты системы получены при иммунизации животных рекомбинантным BDNF, что позволяет их стандартизовать и накапливать в необходимых количествах.

2. Данная тест-система позволяет воспроизводимо, специфично и достоверно осуществлять количественный мониторинг уровня BDNF в сыворотке крови при психических заболеваниях.

3. Разработанная тест-система может быть использована в клинико-лабораторной практике:

- Для определения «скрытых» форм депрессии;
- Для прогнозирования суицидального поведения.

Методология и методы исследования: В работе последовательно проведен анализ источников литературы, обоснована актуальность, сформулирована цель и задачи исследования. Для получения рекомбинантного белка recBDNF использовали методы: ПЦР-амплификация, молекулярное клонирование, различные виды электрофореза. После наращивания культур генно-модифицированных клеток *E. coli* чистый белок выделяли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Препараты рекомбинантного белка исследовали с помощью аналитического диск-электрофореза и электрофореза с

последующим иммуноблотом. Для получения гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к recBDNF, использовали общепризнанную схему слияния и культивирования G. Köler и C. Milstein. Моноклональные антитела из асцитической жидкости и культуральной среды выделяли с помощью аффинной хроматографии на протеин А-агарозе. При получении чистого препарата поликлональных антител из полиспецифических антисывороток использовали метод иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе. Анализ специфичности антител проводили методами электрофореза с последующим иммуноблотом, иммуногисто- и цитохимического методов, иммуноферментного анализа. При оценке параметров валидации разработанной тест-системы ИФА рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, коэффициент вариации. Результаты ИФА с использованием тест-системы при скрининге сывороток крови пациентов и условно здоровых доноров обрабатывали с помощью статистических тестов: непарный t-тест, непараметрический тест Манна-Уитни, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клонирование вставки, кодирующей последовательность mBDNF человека, в вектор pET32a и последующая экспрессия в штамме *E. coli* (BL21[DE3]) позволяет выделять рекомбинантный BDNF, иммунохимически идентичный нативному антигену.
2. Тест-система твердофазного сэндвич-варианта ИФА для количественного определения концентрации BDNF в сыворотке крови человека, разработанная на основе рекомбинантного BDNF и антител, полученных к нему, является стандартизованной, специфичной, достоверной и воспроизводимой.

3. Уровни BDNF в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями снижены по сравнению с контрольной группой условно здоровых доноров. При этом самые низкие показатели BDNF обнаружались в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе, что может служить возможным предиктором склонности к суицидальному поведению.

Степень достоверности и апробация результатов: Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Используемые методы соответствуют поставленным задачам. Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на исследовании достаточного количества образцов исследуемой и контрольной групп. Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена иммунохимическими и биохимическими методами, проведенным статистическим анализом. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований.

Основные материалы и результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: VI Междисциплинарная конференция «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», 2022, Москва; Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2022, Москва.

Апробация результатов исследования проведена на заседании Проблемного совета по фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в разработке плана исследования и экспериментов, в подборе методов, необходимых

для достижения поставленных цели и задач, получении, статистической обработке и интерпретации экспериментальных данных, подготовке и публикации статей в научно-практических журналах, личное участие в апробации результатов исследования, представление результатов на научно-практических конференциях.

Внедрение полученных результатов исследования: Результаты диссертационной работы по определению концентраций нейротрофического фактора мозга в сыворотке крови пациентов с психическими заболеваниями внедрены в научно-исследовательскую практику на базе кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова и на базе лаборатории биофизики НИТУ МИСИС.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в Web of Science, Scopus, и 2 тезиса на научно-практических конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 5 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, отражающей результаты собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы (240 источников из них 10 отечественных и 230 зарубежных авторов). Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован автором лично.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Нейротрофический фактор мозга (BDNF)

BDNF является членом семейства нейротрофинов, которое включает фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3 (NT3) и нейторофин-4 (NT4). BDNF широко экспрессируется в центральной и периферической нервной системе, в основном, нейронами, а также астроцитами и микроглиальными клетками.

Синтез BDNF происходит в коре головного мозга, гиппокампе, миндалине и других отделах ЦНС (Phillips C., 2017). За пределами центральной нервной системы BDNF обнаруживается в сыворотке и плазме крови, в тромбоцитах и мегакариоцитах (Chacon-Fernandez P., 2016), эндотелии сосудов (Pius-Sadowska E., 2017), в мышцах и в некоторых других органах (Yu Iu E. C., 2022; Le Blanc J., 2020).

Ген *bdnf* расположен на 11 хромосоме и имеет сложную структуру, состоящую из 11 экзонов (I–IX, Vh и VIIIh), девять из которых имеют функциональные промоторы (экзоны I–VII и IX) и индуцируют ткане-специфичную экспрессию различных транскриптов BDNF, кодирующих один и тот же белок (рисунок 1.1).

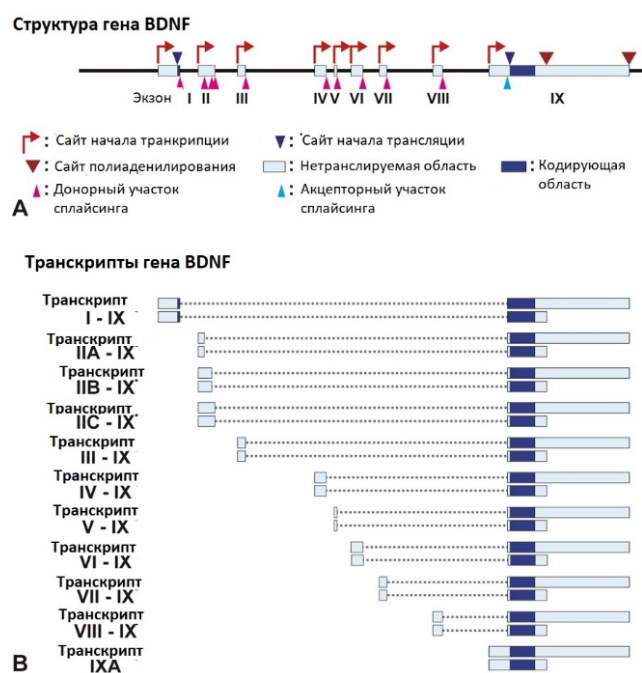


Рисунок 1.1. Структура гена BDNF и его транскрипты.

Известно, что экзоны V и VIII человеческого гена *bdnf* уникальны для человека, экзон I имеет 91% сходства последовательностей у человека и грызунов, экзон IV имеет 52% сходства последовательности с геном грызунов, и кодирующая последовательность расположена в экзоне IX как у человека, так и у грызунов (Keifer J., 2021). Эти отдельные промоторы могут регулировать сложную пространственно-временную экспрессию гена в ответ на различные стимулы посредством альтернативного сплайсинга, а также способствовать вовлечению множества регуляторных факторов транскрипции. Так, например, активация Ca^{2+} -каналов с регулируемым напряжением L-типа (L-VGCC) и NMDA-рецепторов опосредует внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию, и при деполяризации мембраны нейронов промотор I связывается с кальций-чувствительным фактором транскрипции CREB (cAMP response element-binding protein, цАМФ-зависимый транскрипционный фактор), что приводит к его активации и транскрипции BDNF (рисунок 1.2).

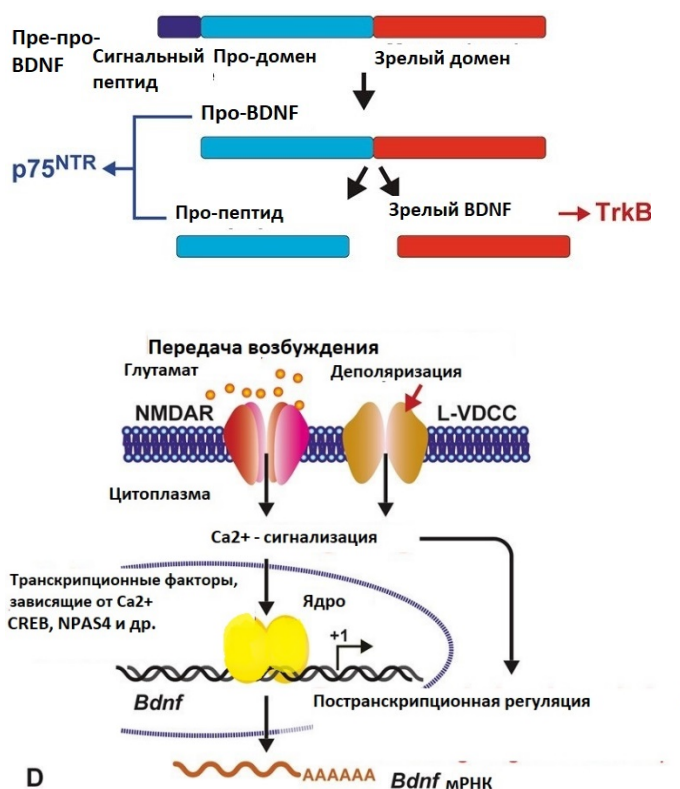


Рисунок 1.2. Схема синтеза BDNF

Для промотора II не были обнаружены чувствительные к кальцию элементы, но он регулируется корепрессорами и ферментами, модифицирующими гистоны. Транскрипционный контроль промотора IV, который индуцируется различными стимулами, осуществляется множеством факторов транскрипции, часть из которых индуцируются активностью, например, нейронный белок домена PAS 4 (NPAS4), специфичный для миоцитов энхансерный фактор 2 (MEF2), CREB и ядерный фактор NFkB (Colucci-D'Amato L., 2020). Сам белок BDNF также может модулировать экспрессию своей мРНК после связывания и активации рецептора TrkB, и эти процессы регулируются CREB и CREB-связывающим белком (CBP) (Esvald E.-E., 2020).

Эпигенетические механизмы позволяют клеткам изменять экспрессию своих генов в ответ на сигналы окружающей среды без каких-либо изменений последовательности ДНК. В настоящее время хорошо описаны два эпигенетических процесса, регулирующих доступность факторов транскрипции к промоторам и связанным с ними регуляторным областям, позволяя изменять экспрессию генов на уровне транскрипции: метилирование ДНК и модификации гистонов. При подавлении транскрипции метилирование ДНК приводит к рекрутированию транскрипционно-репрессивных комплексов в промоторные области. Снижение метилирования ДНК может способствовать диссоциации этих комплексов, усиливая транскрипцию. Например, в базальных условиях культивируемые нейроны крыс содержали сайты CpG, которые были метилированы по промотору IV. Подавление экспрессии экзона IV *bdnf* происходило за счет метил-CpG-связывающего белка MeCP2 и связанных с ним корепрессоров транскрипции в этом промоторе. В условиях деполяризации метилирование ДНК снижалось, сопровождаясь диссоциацией комплекса репрессии и связыванием активатора транскрипции (CREB), что приводило к увеличению экспрессии экзона IV *bdnf* (Martinowich K., 2003). Деметилирование промотора *bdnf* IX, также индуцированное активностью нейронов, было связано с другим белком – GaDD45b (GADD - белок, индуцируемый блокировкой роста и

повреждением ДНК, growth arrest and DNA-damage-inducible 45), что приводило к усилению нейрогенеза в гиппокампе, исследованное на мышинных моделях (Ma D. K., 2009).

Модификации гистонов - это посттрансляционный процесс, при котором химические группы переносятся на N-концы гистонов, что регулирует доступность хроматина и соответственно, экспрессию генов. Например, метилирование на гистоне H3 (H3K27) обычно связано с репрессией транскрипции, тогда как ацетилирование на гистоне H3 и H4 связано с активацией транскрипции гена данного белка (Boulle F., 2012; Zheleznyakova G. Y., 2016).

На синтез BDNF могут влиять микроРНК (miRNAs), которые представляют собой небольшие одноцепочечные некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, регулирующие экспрессию генов после транскрипции путем связывания с мРНК. Существует регуляторная петля отрицательной обратной связи между BDNF и микроРНК, т.е. BDNF обычно оказывает стимулирующее действие на экспрессию микроРНК в нейронах-мишенях, в то время как микроРНК обычно ингибируют экспрессию BDNF. Эта петля отрицательной обратной связи поддерживается в состоянии равновесия в нормальных клетках (Keifer J., 2015).

Кроме того, экспрессия BDNF регулируется на посттранскрипционном уровне путем ферментативного расщепления про-BDNF в зрелый белок BDNF. Здесь надо отметить влияние функционального полиморфизма в гене *bdnf*, приводящего к замене валина (Val) на метионин (Met) в позиции 66 в продоме BDNF, на сортировку про-BDNF и его внутриклеточный транспорт, что в свою очередь нарушает регулируемую активностью нейронов секрецию про-BDNF и может приводить к снижению уровней зрелого BDNF (Chen Z.-Y., 2004). При этом, аллель Met может быть связана с нарушением эпизодической памяти и уменьшением объема гиппокампа (Egan M. F., 2003).

BDNF первоначально синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме в качестве белка-предшественника (пре-про-BDNF, ~27 кДа) (Lessmann V., 2003),

затем пептид расщепляется с образованием про-BDNF, формы-предшественника нейротрофина, состоящей из про-домена (129 аминокислот) и зрелого домена (118 аминокислот, 13 кДа) (Hempstead B. L., 2015). Зрелая форма BDNF представляет собой нековалентно связанный гомодимер 27 кДа с субъединицами приблизительно 13,5 кДа (рисунок 1.3).

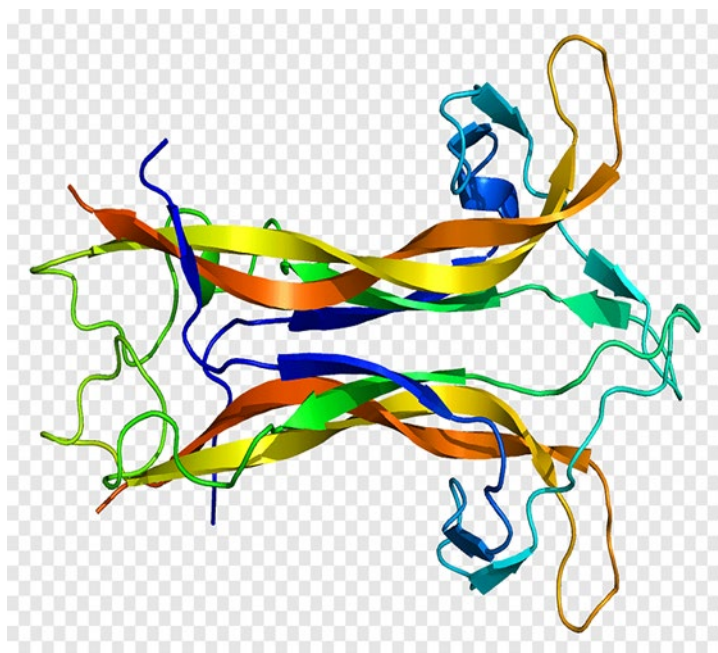


Рисунок 1.3. Зрелая форма BDNF.

Затем про-BDNF транспортируется в комплекс Гольджи, где происходит сортировка и упаковка в везикулы. Везикулярный про-BDNF либо протеолитически расщепляется внутриклеточно с помощью ферментов (фурин, проконвертазы) с образованием зрелого BDNF (mBDNF) (Zhang X.-Y., 2020), либо секретируется как про-BDNF, а затем расщепляется во внеклеточном пространстве ферментами (металлопротеиназами и плазмином) с образованием mBDNF (Wang M., 2021). Везикулярная секреция может включать как про-BDNF, так и зрелую форму белка, причем количество секретируемого mBDNF зависит от типа и активности конвертаз (Mowla S. J., 2001). В зависимости от типа клеток секреция BDNF может быть конститутивной или зависимой от активности (Lessmann V., 2003). В нейронах про-BDNF и зрелая форма BDNF высвобождаются после

деполяризации клеточной мембраны. Такой многоступенчатый процесс синтеза и созревания поддерживает динамический баланс между различными формами BDNF, а также объясняет их роль в регуляции некоторых физиологических процессов, при этом про- и зрелая формы BDNF часто оказывают противоположные действия.

В мозге взрослого человека содержится, в основном, зрелая форма BDNF, при этом по оценке *in vitro* на долю про-BDNF приходится всего 10,8% от общей экспрессии этого белка (Anastasia A., 2013). Следует отметить, что соотношение экспрессии про-BDNF к зрелой его форме в значительной степени зависит от стадии развития: в раннем постнатальном развитии про-BDNF экспрессируется больше, чем зрелого BDNF, но к подростковому и взрослому возрасту увеличение экспрессии ферментов расщепления приводит к усилению образования зрелого BDNF (Yang J., 2009). Такая смена про-BDNF на его зрелую форму в подростковом возрасте может сочетаться с большим риском развития психических заболеваний, так как именно в этом возрасте происходят физиологические изменения в организме и взросление, что сопровождается значительным хроническим стрессом, с различной ответной реакцией в зависимости от пола. Гормональный статус может в значительной степени влиять на экспрессию BDNF и/или TrkB. Было показано, что BDNF-синтезирующие нейроны содержат рецепторы эстрогена в переднем мозге в совместной локализации с TrkB. Кроме того, ген *bdnf* содержит последовательность, близкую по гомологии к элементу ответа на эстроген (ERE), которая может служить сайтом связывания рецепторных комплексов эстроген-лиганд для стабилизации ДНК при транскрипции, что делает экспрессию BDNF чувствительной к колебаниям доступности эстрогена и, следовательно, к стадии менструального цикла (Sohrabji F., 2006). Вероятно, смена про-BDNF на его зрелую форму в подростковом и юношеском возрасте приводит к тому, что женщины именно в это время более уязвимы к многочисленным психическим заболеваниям, вызываемым стрессом.

Про-BDNF опосредует свои биологические действия посредством связывания с рецепторами нейротрофина p75 совместно с сортилином. Активация такого рецепторного комплекса приводит к уменьшению сложности и плотности дендритных шипиков, к индукции долгосрочной депрессии (LTD) и апоптозу нейронов (Guo J., 2016; Li H., 2020). Зрелая форма BDNF связывается с тропомиозиновыми тирозинкиназными рецепторами (TrkB) с более высокой аффинностью, а также может связываться с рецептором нейротрофина p75 с меньшим сродством. Рецепторы TrkB представляют собой мембранные белки, которые образуют димеры при связывании с лигандом. В нервной системе млекопитающих существует несколько изоформ этого рецептора: полноразмерный вариант (TrkB.FL) и несколько усеченных вариантов, наиболее распространенным из которых является TrkB.T1. TrkB.FL локализован на нейронах и является единственным вариантом, содержащим три внутриклеточных сайта фосфорилирования в остатках тирозина, который опосредует нейропротекторные и нейротрофические функции BDNF. TrkB.T1 имеет внеклеточный домен, гомологичный TrkB.FL, но не имеет внутриклеточного домена киназы, локализуется в основном на астроцитах, особенно во взрослом возрасте, реже – на нейронах, где может образовывать гетеродимеры с TrkB.FL, действуя как отрицательный регулятор данного рецептора (Prowse N., 2021). При этом активация BDNF-TrkB запускает сигнальные каскады, которые приводят к разнообразным клеточным ответам: модуляция синаптической пластичности, связанная с глутаматными NMDA- и AMPA-рецепторами, усиление роста и ветвления дендритов нейронов гиппокампа, антиапоптотическая и провоспалительная активность, регуляция синтеза белка во время дифференцировки нейронов, а также экспрессия генов раннего ответа и синтез белков цитоскелета нейронов (Zagrebelsky M., 2020; Kowianski P., 2018).

Можно выделить три внутриклеточных сигнальных пути, через которые опосредуется действие комплекса BDNF-TrkB: 1 – путь фосфолипазы C- γ (PLC- γ), приводящий к активации протеинкиназы C (PKC), 2 – путь митоген-активируемой

протеинкиназы (МАРК), которая может активировать GTP-азы (гуанозинтрифосфатгидролазы) семейства генов Ras и Rho, приводя к последующим эффектам, 3 – путь фосфатидилинозитол-3' ОН-киназы (PI3K), которая может активировать путь Akt(протеинкиназы)-mTOR (мишень рапамицина млекопитающих).

Путь, связанный с PI3K/Akt, оказывает антиапоптотическую активность и способствует выживанию нейронов, модулирует синаптическую пластичность, зависящую от активности NMDA-рецепторов, и регулирует транспорт синаптических белков. Каскад PI3K/Akt/mTOR усиливает рост и ветвление дендритов за счет регуляции синтеза белка и развития цитоскелета (Kumar V., 2005). Этот путь играет ключевую роль в долгосрочном поддержании синаптической пластичности посредством трансляции и транспорта синаптических белков (Yoshii A., 2007).

Сигнальный каскад МАРК/Ras (Rho) регулирует синтез белка во время дифференцировки нейронов, а также необходим для активации CREB (cAMP response element-binding protein) и сигнального пути киназ ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase). Этот путь имеет решающее значение не только для экспрессии генов раннего ответа (например, cFos), но и для синтеза белков цитоскелета (например, Arc и cypin), для роста и ветвления дендритов в нейронах гиппокампа (Kwon M., 2011).

Путь, связанный с активацией PLC-γ, приводит к выработке диацилглицерина (DAG) и инозитола 1,4,5-трисфосфата (IP3) и увеличению внутриклеточного кальция, и в результате к активации САМК киназ и протеинкиназы С (РКС). Известно, что РКС-зависимый путь повышает синаптическую пластичность, влияя на локализацию АМРА-рецепторов в синапсах и увеличивая высвобождение глутамата на пресинаптическом уровне. А повышение внутриклеточного кальция приводит к увеличению активности Ca^{2+} -чувствительной аденилциклазы (АС), которая участвует в CREB-зависимой транскрипции и необходима для образования

синаптических комплексов PSD-95-TrkB, поддерживая таким образом позднюю фазу LTP (Yoshii A., 2010).

Также передача сигналов BDNF-TrkB может модулировать нейротрансмиссию. Например, непосредственно влияя на экспрессию субъединиц глутаматных рецепторов и Ca^{2+} -зависимых белков или индуцируя синтез различных белков (антиапоптотических, регулирующих энергетический метаболизм и др.), BDNF модифицирует глутаматную сигнализацию (Гуляева Н.В., 2017б). Кроме того, существует взаимосвязь BDNF и серотонинергической системой: взаимодействие нейротрофина с TrkB на серотонинергических нейронах приводит к изменению регуляции триптофан-5-гидроксилазы и увеличению внутриклеточного серотонина, что в свою очередь усиливает серотонинергическую передачу через 5-HT-4,-6,-7 рецепторы, которые связаны с аденилатциклазой и протеинкиназой А (PKA). Возникающее в результате увеличение фосфорилирования CREB приводит к синтезу BDNF (Martinowich K., 2008). Активация комплекса BDNF-TrkB может повышать синаптическую эффективность, способствуя долговременному потенцированию (LTP) за счет увеличения проводимости NMDA-рецепторов, а также за счет фосфорилирования их субъединиц (AMPA-рецепторы), что влияет на рециклирование и локализацию этих рецепторов в постсинаптических участках. Кроме того, BDNF может способствовать передаче возбуждения косвенно, ослабляя тормозную нейротрансмиссию, например, уменьшая поверхностную экспрессию ГАМК-рецепторов (Gottmann K., 2009; Bjorkholm C., 2016).

BDNF синтезируется дофаминовыми нейронами и участвует в поддержании и защите нейронов дофаминергической системы мозга от нейротоксических агентов. Было показано, что BDNF улучшает выживаемость дофаминовых нейронов в культуре, регулирует уровень мРНК и самого D1-рецептора, а также экспрессию D5-рецептора в астроцитах стриатума (Favalli G., 2012). BDNF, синтезируемый дофаминовыми нейронами, отвечает за индуцирование нормальной экспрессии D3-рецептора дофамина в прилежащем ядре как во время развития, так и во взрослом

возрасте посредством контроля специфических генов дофамина (Sokoloff P., 2002). Кроме того, BDNF является модулятором дофаминергической функции и вызывает поведенческую сенсibilизацию, контролируя экспрессию D1- и D3-рецепторов в лимбической системе (Guillin O., 2007) и регулируя тонус пресинаптического дофамина посредством функциональных изменений в высвобождении и поглощении дофамина в нигростриатальной системе проводящих путей (Bosse K. E., 2012). Считается, что активация сигнального каскада, который связывает передачу сигналов дофамина с выработкой BDNF и ростом нейронов, происходит за счет мобилизации внутриклеточного кальция, который увеличивает экспрессию BDNF, что ускоряет морфологическое созревание и дифференцировку нейронов стриатума, как показано в мозге взрослой крысы (Hasbi A., 2009).

1.2 BDNF при депрессивных расстройствах

1.2.1 Рецепторы TrkB

Снижение уровней TrkB может лежать в основе патогенеза депрессий. Изменения уровней TrkB могут быть связаны с мутациями в гене рецептора, экспрессией различных форм рецептора (полноразмерная и усеченная), снижением фосфорилирования тирозина в рецепторах TrkB, дисфункцией в компонентах сигнального пути TrkB-BDNF (Tsai S.-J., 2004; Avdoshina V., 2013; Aizawa S., 2015).

1.2.2 Взаимосвязь BDNF с другими системами, участвующими в патогенезе депрессий

Учитывая важную роль BDNF в процессах нейрогенеза, модулировании нейро- и синаптической пластичности в тех отделах мозга, которые связаны с аффективными и когнитивными функциями, в условиях различного вида стрессов адекватные уровни BDNF обеспечивают трофическую поддержку и зависимую от активности пластичность нейронов, которая необходима для поддержания

базальной функции нейронов и нейрональных сетей, и для выработки адаптивных реакций на эндогенные и экзогенные стрессорные воздействия.

Стрессовое воздействие различного вида действия и силы приводит к гиперактивности гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковой оси и повышению уровня циркулирующих глюкокортикоидов. В физиологических условиях одним из биологических механизмов, обеспечивающих усиленную нейротрофическую поддержку при повышении глюкокортикоидов, может являться усиление секреторной аутофагии через ко-шаперон FK506-связывающий белок 51 (FKBP51), что приводит к накоплению матриксной металлопротеиназы 9. Этот фермент расщепляет про-BDNF до его зрелой формы, и такое внеклеточное увеличение mBDNF оказывает стимулирующее действие на синаптическую пластичность (Martinelli S., 2021). При длительном стрессе, генетической предрасположенности возможно нарушение этого механизма адаптации, при этом происходит снижение уровней BDNF в ткани головного мозга. Так, например, при моделировании различных видов острого и хронического стресса на экспериментальных животных было обнаружено, что повышенный уровень глюкокортикоидов снижает экспрессию BDNF в гиппокампе (Duman R. S., 2006). С другой стороны, глюкокортикоидные рецепторы непосредственно влияют на функцию рецептора TrkB, связываясь с ним и снижая дальнейшую передачу комплекса BDNF-TrkB в условиях повышенного уровня глюкокортикоидов (Kunugi H., 2010). В конечном счете, все эти процессы приводят к атрофии дендритных ветвей и дендритных шипиков в гиппокампе, уменьшению длины апикальных дендритов нейронов в области СА3, ингибированию нейрогенеза и усилению нейротоксических эффектов, что сопровождается снижением объема гиппокампа на 4-10%, в основном, за счет серого вещества (Bourin M., 2021). Большинство нейровизуализационных данных указывают на то, что уменьшение объема связано с хроническим течением, большим количеством депрессивных эпизодов и более ранним возрастом начала заболевания (Nolan M., 2020).

Гиперактивация гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковой оси создает нейровоспалительную среду в сочетании с прямой активацией иммунитета самим стрессом. Хронический стресс способствует экспрессии провоспалительных цитокинов, при этом изменяются некоторые сигнальные каскады, что может привести к выработке нейротоксичных конечных продуктов, к нарушению функционирования нейронов и их апоптозу. Одним из основных факторов активации воспаления является ядерный фактор - каппа В (NF-κB), регулятор апоптоза, выживания и пролиферации нейронов, а также миграции и созревания иммунных клеток, который также влияет на синтез BDNF. Связывание BDNF с рецептором TrkB может индуцировать экспрессию NF-κB, а активация рецепторов p75-NTR, возможно, при повышении уровня про-BDNF, увеличивает передачу сигналов апоптоза и воспаления в нейронах и глиальных клетках путем активации N-концевых киназ c-Jun (JNK) и экспрессии NF-κB соответственно (Giacobbo B. L., 2019).

Известно, что BDNF способствует усилению дифференцировки и созреванию серотонинергических нейронов. Серотонин, в свою очередь, воздействуя на 5-HT1A ауторецепторы, может приводить к усилению регуляции BDNF и активации рецепторов TrkB. Кроме того, BDNF может косвенно влиять на развитие серотонинергической системы через глиальные клетки, стимулируя экспрессию S100-β в астроцитах и выработку основного белка миелина в олигодендроцитах. BDNF также влияет на высвобождение серотонина посредством модуляции внутриклеточных путей, как упоминалось выше. При этом, нарушение экспрессии BDNF, которое происходит при развитии депрессивных расстройств, в том числе приводит к функциональным изменениям в серотонинергической системе, выражающимся в снижении функции 5-HTT-рецепторов транспортера серотонина и 5-HT1A-рецепторов в гиппокампе и серьезном дефиците 5-HT2A-рецепторов в префронтальной коре и дорсальном ядре рафа (Homberg J. R., 2014).

BDNF и его рецептор TrkB также экспрессируются в мезолимбическом дофаминовом пути, который проецируется от дофаминовых нейронов среднего

мозга вентральной тегментальной области к прилежащему ядру базального отдела переднего мозга и играет существенную роль в механизмах памяти, эмоций, обучения, системе вознаграждения и нейроэндокринной регуляции. Взаимодействия между BDNF-TrkB и передачей сигналов дофамина в мезолимбическом пути играют решающую роль в поведении, связанном со стрессом и вознаграждением. Исследования на экспериментальных моделях депрессивно-подобного поведения показывают, что изменение сигнализации BDNF-TrkB в этом пути оказывает влияние на восприимчивость к стрессовым воздействиям, и его активация приводит к развитию поведенческих нарушений, характерных для депрессий. Мезолимбические дофаминовые нейроны, вероятно, обладают стробирующей функцией, которая опосредуется кортикотропин-рилизинг фактором (CRF) в прилежащем ядре, что способствует выработке селективных реакций на стимулы окружающей среды, при этом CRF индуцирует усиление сигнализации BDNF в прилежащем ядре с повышением его экспрессии (Walsh J. J., 2014). Повышенные уровни BDNF в прилежащем ядре были обнаружены посмертно у пациентов с депрессивными расстройствами, включая тех, кто проходил лечение антидепрессантами, то есть усиление сигнализации BDNF в этом отделе мозга можно рассматривать как признак резистентности к лечению депрессий. Электросудорожная терапия вызывает антидепрессантоподобный эффект за счет снижения экспрессии BDNF в вентральной тегментальной области. Такая про-депрессантная роль сигнализации BDNF в мезолимбической схеме противоположна хорошо описанной антидепрессантоподобной роли в других областях мозга, в частности, гиппокампе и префронтальной коре (Koo J. W., 2019).

Иммунокомпетентные клетки головного мозга (микроглия) могут играть важную роль в нейропластичности нейронов. Микроглия участвует в раннем формировании центральной нервной системы (ЦНС) и в постоянной модификации нейронного функционирования и связей на протяжении всей жизни. На ранних стадиях развития ЦНС микроглия посредством фагоцитоза участвует в элиминации

нервных стволовых клеток, в формировании синапсов. На протяжении жизни микроглиальные клетки участвуют в процессах, критически важных для синаптической пластичности, нейрогенеза, структуры и функционирования цепей и синаптическом поддержании (Prowse N., 2021). Кроме фагоцитоза и продукции цитокинов, микроглия синтезирует BDNF и в активированном состоянии может регулировать его экспрессию (Pouhonen S., 2019). При стрессе или патологических состояниях микроглия продуцирует медиаторы воспаления, которые изменяют нормальное функционирование нейронов и снижают нейрогенез, повышая уязвимость к стрессу и способствуя возникновению и развитию депрессивных состояний (Walker F.R., 2013). Последние данные предполагают, что активация микроглии может идти и альтернативным путем, способствуя восстановительным процессам. На модели хронического умеренного стресса избыточная экспрессия IL-4 в гиппокампе приводила к усилению нейрогенеза и снижению поведенческих нарушений у мышей, и эти эффекты были опосредованы повышенной продукцией BDNF в микроглиальных клетках (Zhang J., 2021).

1.2.3 BDNF и действие антидепрессантов

Передача сигналов BDNF имеет решающее значение для действия практически всех типичных антидепрессантов, включая селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина, трициклических антидепрессантов и ингибиторов моноаминоксидазы, а также быстродействующих антидепрессантов (кетамин) и при электросудорожной стимуляции. Хроническое применение антидепрессантов, направленных на повышение уровня серотонина, повышало экспрессию BDNF и уровни CREB (Castren E., 2021). Кроме того, было продемонстрировано, что антидепрессанты связываются с трансмембранным доменом (TMD) рецепторов TrkB с терапевтически значимым сродством, стабилизируя конформацию димеров этих рецепторов, способствуя транслокации TrkB и удержанию на плазматической мембране, тем самым облегчая синаптическую передачу сигналов BDNF. Специфическое связывание

наблюдалось не только для трициклических антидепрессантов и селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (флуоксетина и имипрамина), но также для быстродействующего метаболита кетамина (2R,6R-гидроксинокетамин) (Casarotto P. C., 2021). Сродство антидепрессантов к TrkB намного ниже, чем их сродство к переносчику серотонина, но лекарства накапливаются в головном мозге, и концентрации, необходимые для связывания TrkB, достигаются в мозге человека после нескольких недель лечения, что может объяснить отсроченное начало действия типичных антидепрессантов.

Влияние быстродействующих антидепрессантов (кетамина) на сигнальные пути BDNF были изучены как на экспериментальных моделях, так и при лечении депрессий у людей. Механизм действия этого антидепрессанта связан с блокированием NMDA-рецепторов, что приводит к инактивации кальций/кальмодулин-зависимой эукариотической киназы фактора удлинения 2 (eEF2K) и, соответственно, способствует увеличению синтеза BDNF. Однократное введение кетамина приводило к быстрому повышению уровня BDNF в гиппокампе и в медиальной префронтальной коре, что дополнительно было подтверждено исследованиями на экспериментальной модели с полиморфизмом BDNF Val66Met, который нарушает процессинг и зависимое от активности высвобождение BDNF. У мышей с аллелью Met блокируется антидепрессивное действие кетамина, а также увеличение количества и функций синапсов в медиальной префронтальной коре. Было также обнаружено снижение выраженности депрессивной симптоматики у резистентных к лечению пациентов после лечения кетамином по сравнению с плацебо (Hess E. M., 2022). Таким образом, быстродействующее влияние кетамина на синаптические и поведенческие функции требует усиленной экспрессии BDNF, а также повышения его высвобождения, зависящего от активности нейронов (Duman R.S., 2021). Более длительный антидепрессивный эффект кетамина, возможно, связан с транскрипционно-зависимыми механизмами, а именно, происходящего в гиппокампе BDNF-зависимого фосфорилирования метил-CpG-связывающего белка 2 (MeCP2) (Kim J.-W., 2021).

1.3 Однонуклеотидный полиморфизм гена *bdnf* Val66Met

Про-домен BDNF является локусом функционального полиморфизма *bdnf* человека Val66Met, также известного как rs6265 или G196A полиморфизм. Эта точечная мутация вызывает замену валина (Val) на метионин (Met) в кодоне 66 (Val66Met) в про-доме BDNF у человека и не обнаружена у экспериментальных животных. Функциональность полиморфизма была подтверждена при исследовании на трансдуцированных клеточных моделях *in vitro*, при этом было показано, что зависимость от активности секреция BDNF в нейронах гиппокампа нарушается при замене Val на Met. Такой процесс был связан с нарушением сортировки и транспорта про-BDNF в секреторные везикулы, при этом изменялась перисоматическая локализация BDNF – met-форма BDNF накапливалась в соме нейрона, val-форма обнаруживалась в дендритах. По данным исследований *in vivo* такие нарушения приводили к аномалиям эпизодической памяти у носителей генотипа Met/Met (Egan M. F., 2003; Hariri A. R., 2003) и к снижению объема гиппокампа, выявленное как у людей (Bueller J. A., 2006), так и на мышинных моделях. Хотя некоторые исследования не обнаружили значимого влияния этого полиморфизма у здоровых людей на объем гиппокампа (Harrisberger F., 2014), у трансгенных мышей с генотипом Met/Met наблюдалось значительное снижение объема гиппокампа с изменениями дендритной сложности в нейронах и контекстно-зависимой памяти, повышением тревожности и сниженной реакции на антидепрессанты (Chen Z.-Y., 2006). При вариантах генотипа Val/Met происходит образование гетеродимеров BDNFVal и BDNFMet, что также изменяет секрецию зрелого BDNF (Chen Z.-Y., 2004), при генотипе Met/Met про-BDNF за счет снижения связывания с сортилином изменяет внутриклеточный транспорт и секрецию зрелого BDNF и, взаимодействуя с SorCS2 (член семейства рецепторов, содержащих домен VPS10), индуцирует ретракцию конуса роста нейронов (Anastasia A., 2013). На уровне мРНК замена G на A в положении 196 (G196A) ингибирует связывание мРНК BDNF с комплексом транслина, снижая дендритный транспорт мРНК этого белка (Chiaruttini C., 2009). Таким образом, эти

молекулярных механизмы потенциально лежат в основе нарушений высвобождения BDNF, зависящего от активности нейронов, что непосредственно влияет на эффективность передачи сигналов BDNF-TrkB, опосредуя изменения нейропластичности, когнитивных функций и, вероятно, способствуя риску развития депрессивных и иных нервно-психических заболеваний.

Многочисленные исследования изучали воздействие этого полиморфизма на функции мозга в здоровом состоянии и при различных заболеваниях. Полиморфизм Val66Met влияет на функционирование центральной нервной системы у здоровых людей. У носителей генотипа Met/Met по сравнению с генотипом Val выявлено снижение эпизодической памяти, меньшая активация гиппокампа во время выполнения задач памяти, измеренных с помощью методов магнитно-резонансной томографии (Hariri A. R., 2003), а также функциональные нарушения моторной коры мозга, изменения кратковременной пластичности и изменения в краткосрочном моторном обучении (McHughen S. A., 2010). Кроме того, полиморфизм BDNF был связан с уменьшением объема серого вещества других структур мозга, кроме гиппокампа, включая миндалину (Montag C., 2009) и дорсолатеральную префронтальную кору, которая также участвует в процессах обучения и памяти (Pezawas L., 2004).

Исследования влияния полиморфизма *bdnf* Val66Met при черепно-мозговых травмах на функции головного мозга выявили некоторые парадоксальные изменения. Например, при черепно-мозговых травмах у генотипа Val, но не у генотипа Met было выявлено нарушения исполнительных функций, а также носители генотипа Val/Met показали более сохраненные когнитивные функции (рабочая память, скорость обработки информации), чем носители генотипа Val/Val после черепно-мозговых травм, хотя до травм разницы между этими группами не было (Krueger F., 2011; Barbey A. K., 2014). Такое явление можно объяснить, вероятно тем, что апоптотическое действие про-BDNF на нейроны уменьшается за счет снижения его высвобождения, а также в ответ на травму происходит конститутивное высвобождение зрелого BDNF, соответственно, усиливаются его

нейропротекторные воздействия. Исследования на экспериментальных моделях инсульта выявили, что при остром инсульте у генотипа Met/Met наблюдалось снижение краткосрочных моторных функций за счет изменения нейропластичности и ангиогенеза (Qin L., 2011), но при хроническом инсульте было обнаружено лучшее восстановление моторных функций у носителей генотипа Met/Met за счет изменения структурной и синаптической пластичности в противоположном от повреждения стриатуме (Qin L., 2014). При исследованиях *in vitro* выявилось, что при аллели Val про-BDNF ингибирует LTP посредством усиления передачи сигналов LTD по пути фосфорилирования Tau гликогенсинтазной киназой 3 (GSK3 β), в то время как при аллели Met про-BDNF не оказывает такого влияния (Kailainathan S., 2016). Вероятно, за счет таких процессов полиморфизм Val66Met может иметь функциональное значение при старении и когнитивных нарушениях, влияя на LTD и синаптическую пластичность (Erickson K.I., 2008), при этом генотип Met/Met обеспечивает «механизм защиты» от когнитивного дефицита.

Несмотря на то, что исследования на экспериментальных моделях животных демонстрируют, что аллель Met связана с тревожно-подобным поведением (Harrisberger F., 2014), доказательства ассоциаций с тревожностью или тревожными расстройствами при исследованиях на людях несколько неоднородны. Носители генотипа Val/Val проявляли повышенную тревожность, выявленную у пациентов с шизофренией (Голимбет В. Е., 2014), но при изучении здоровых людей у генотипа Met/Met обнаружили высокие показатели по шкалам «тревожности» (Montag C., 2010). При депрессивных расстройствах лица с генотипом Met/Met, подвергшиеся стрессовым событиям в жизни или неблагоприятному окружению в детстве, проявляли повышенную реактивность на стресс (Zhao M., 2018). Последующие исследования также показали разнородность результатов: в некоторых была обнаружена взаимосвязь генотипа Met/Met с риском развития депрессивных расстройств, другие не связывали эти два фактора, но определили, что по мере увеличения числа ассоциаций генетических вариантов (АРОЕ,

HSPA1A, SLC6A4, BDNF и HTR2A) увеличивается риск развития депрессивного расстройства и его тяжесть (Kitzlerova E., 2018). Такие неоднозначные результаты могут быть обусловлены различиями в дизайне исследования, характеристиках выборки (например, возраст, пол, этническая принадлежности) или из-за клинической и биологической гетерогенности депрессивных расстройств (Verhagen M., 2010; Peters R. B., 2021). Генетические исследования показали, что аллель Met имеет разную частоту в общей популяции и варьируется от 0,55% (Африка) до 19,9% и 43,6% (Европа и Азия соответственно) (Petryshen T. L., 2010), при этом генотип Met/Met редко встречается в европейской (4%) (Shimizu E., 2004) и чаще в азиатской популяции (23,4%) (Pivac N., 2009).

Такие же неоднозначные результаты были выявлены при исследованиях связи полиморфизма с развитием шизофрении. Ранее считалось, что генотип Met/Met увеличивает риск развития шизофрении (Gratacos M., 2007), но последующие исследования не смогли подтвердить этого предположения (Zhao X., 2015), хотя были выявлены некоторые гендерные и этнические различия в том, как данный полиморфизм влияет на когнитивные функции и риск развития этого заболевания (Kim S. W., 2016; Kheirollahi M., 2016). В нашем исследовании мы обнаружили некоторые ассоциации генотипа Met/Met с двигательными нарушениями и с дисфункцией лобных долей при шизофрении без гендерных ассоциаций (Morozova A., 2021). Вероятно, полиморфизм *bdnf* не является основным фактором риска развития шизофрении, но он может влиять на целый ряд клинических симптомов, таких как возраст начала заболевания, реакция на лечение, когнитивные функции и морфология мозга.

Полиморфизм *bdnf* был связан с повышением риска развития болезни Альцгеймера (Voineskos A. N., 2011), при этом аллель Met влияла на нарастание когнитивных дисфункций с увеличением возраста на доклинической стадии заболевания и увеличивала частоту перехода в клиническую стадию, а при характерной клинической картине заболевания аллель Val обуславливала еще большее снижение функций памяти (Lim Y. Y., 2021). Наличие данного

полиморфизм может влиять на развитие когнитивных нарушений при болезни Паркинсона (Ramezani M., 2021), при старении и деменции (Brown D. T., 2020).

Была установлена связь этого полиморфизма с эпилепсией в изучении генотипов людей с синдромом Мартина – Белл, и аллель Met была обнаружена у всех пациентов с эпилепсией, страдающих данным синдромом (Louhivuori V., 2009). При этом у пациентов с эпилепсией медиальной височной доли аллель Met была связана с когнитивными дисфункциями (снижение показателей памяти) и с функциональными нарушениями нейронных сетей (снижение активации и деактивации медиальной височной доли при процессах, связанных с запоминанием и речевыми задачами) (Sidhu M. K., 2019). При биполярном аффективном расстройстве полиморфизм *bdnf* также был связан с нарушениями когнитивных функций, при этом носители аллели Val показали лучшие когнитивные показатели, особенно в исполнительных функциях, а аллель Met связана со снижением не только в исполнительных функциях, но и в вербальном обучении, в процессах запоминания, вероятно за счет модуляции структурных изменений в определенных областях мозга (гиппокамп, дорсолатеральная префронтальная кора, передняя поясная кора) (Mandolini G. M., 2019).

Другой полиморфизм (rs12273363), расположенный в межгенной области рядом с геном *bndf*, повышал риск развития депрессивного расстройства у пациентов, в анамнезе которых было неблагоприятное окружение в детстве (Juhasz G., 2011), и наличие его минорной аллели C влияло на уровень экспрессии BDNF, снижая активность промотора IV гена *bndf* и регулируя его ответную реакцию на приходящие сигналы (Hing B., 2012). Значительное снижение уровня BDNF в гиппокампе также было обнаружено у пациентов с депрессивными и биполярными расстройствами, которые были гомозиготными или гетерозиготными по аллелю C этого полиморфизма (Dunham J. S., 2009).

1.4 Эпигенетические модификации гена *bdnf*, связанные с депрессивными расстройствами

Наиболее часто изучаемыми эпигенетическими модификациями гена *bdnf* были исследования метилирования ДНК.

На моделях различных видов стресса (пренатальный, неонатальный, хронический стресс) у экспериментальных животных было выявлено повышенное метилирование промотора IV, в отдельных случаях промотора VI, в гиппокампе, миндалине, префронтальной коре, что снижало экспрессию BDNF и проявлялось повышенным уровнем тревожности и депрессивного поведения. Необходимо отметить, что ингибиторы метилирования ДНК и антидепрессанты снижали эти вызванные стрессом паттерны метилирования ДНК (Hing B., 2018). При исследованиях взаимосвязи метилирования промоторов гена *bdnf* у пациентов с депрессивными расстройствами был обнаружен повышенный уровень метилирования промотора I при сравнении с пациентами с биполярным расстройством и со здоровыми контрольными группами. Кроме того, увеличение метилирования у пациентов с депрессией было достоверно связано с терапией антидепрессантами, но не с клиническими особенностями депрессии, такими как тяжесть симптомов (Carlberg L., 2014). У пожилых пациентов с депрессией повышенные уровни метилирования ДНК обоих промоторов *bdnf* I и IV были связаны с их депрессивным статусом и с хронической депрессией (Januar V., 2015). Также было обнаружено значительное увеличение метилирования промотора I с сопутствующим снижением экспрессии BDNF у пациентов с депрессивными расстройствами и с суицидальными мыслями по сравнению со здоровым контролем и с депрессией, но без суицидальных мыслей (Roy B., 2017). Недавнее исследование показало, что пациенты с депрессивными расстройствами имели значительно более высокий уровень метилирования в CpG-сайте 217 и более низкие уровни метилирования в CpG-сайте 327 и CpG-сайте 362 в экзоне IX *bdnf*, чем здоровые контрольные группы, наряду с более низкими уровнями белка BDNF и мРНК в сыворотке крови (Hsieh M.-T., 2019). Была выявлена связь между

уровнями метилирования промоторов *bdnf* и приемом психотропных препаратов. Пациенты, получавшие стабилизаторы настроения и антидепрессанты, имели более низкие уровни метилирования промотора экзона I *bdnf*, чем те, кто получал только антидепрессанты (D'Addario C., 2013). Отсутствие метилирования сайта CpG -87 промотора IV было связано с низким ответом на лечение у пациентов с депрессией (Tadic A., 2014), а также в подгруппе пациентов с тяжелой депрессией гиперметилирование CpG-87 приводило к увеличению частоты ремиссий по сравнению с пациентами без метилирования соответствующего сайта (Lieb K., 2018).

Влияние модификаций гистонов на уровни BDNF изучалось на экспериментальных моделях стресса. Стрессоры раннего возраста, такие как материнская депривация, приводили к тому, что у животных было выявлено снижение общего ацетилирования гистона 3 (H3) в гиппокампе, ацетилирование H3 и гистона 4 (H4) в промоторе IV, что приводило к снижению экспрессии BDNF, и такие животные проявляли тревожное и депрессивное поведение с дефицитом памяти (Albuquerque Filho M. O., 2016; Seo M. K., 2016). На экспериментальной модели хронического стресса социального поражения было показано повышенное метилирование H3K27 в гиппокампе в промоторах IV и VI, что также приводило к снижению экспрессии транскриптов, содержащих эти экзоны, и развитию тревожного поведения (Tsankova N. M., 2006). При этом лечение антидепрессантами было связано с увеличением ацетилирования H3 и H4, в то же время, не вызывая снижения повышенного метилирования гистонов (Seo M. K., 2016; Tsankova N. M., 2006). В совокупности эти исследования подчеркивают динамическую природу модификации гистонов. По результатам исследований на пациентах с депрессивными расстройствами можно предположить, что антидепрессанты могут регулировать экспрессию BDNF посредством изменений в состоянии метилирования H3K27 на промоторе IV. Так, например, метилирование H3K27 было снижено в посмертной ткани головного мозга пациентов, которые принимали антидепрессанты, по сравнению с пациентами, не получавшими

лечение антидепрессантами в анамнезе (Chen E. S., 2011). Проспективное исследование, проведенное на ДНК, взятых из клеток крови пациентов с депрессией, выявило снижение метилирования H3K27 у пациентов с положительной реакцией на лечение циталопрамом. При этом метилирование H3K27 обратно коррелировало с уровнями BDNF в сыворотке крови и эффективностью лечения. Только пациенты с положительными терапевтическими реакциями на циталопрам демонстрировали более высокий уровень BDNF и более низкое метилирование H3K27 (Lopez J. P., 2013).

1.5 микроРНК, связанные с BDNF и с депрессивными расстройствами

Известно, что несколько микроРНК (miRNAs, miR) влияют на экспрессию BDNF при депрессивных расстройствах. Так, например, при моделировании депрессивно-подобного поведения, вызванного материнской депривацией, у животных обнаружили низкий уровень мРНК BDNF и более высокую экспрессию miR-16, чем в контроле, и уровни мРНК BDNF отрицательно коррелировали с уровнями miR-16 (Bai M., 2012). В префронтальной коре miR-30a, miR-30d, miR-19, miR-103/107, miR-195 были обратно коррелированы с уровнями BDNF у взрослых животных. Среди этих микроРНК, miR-30a оказывала значительное ингибирующее действие на экспрессию BDNF, снижая его уровни в культуре нейронов (Mellios N., 2008). Уровни микро-РНК (miR-132 и miR-182) были значительно выше в сыворотке крови пациентов с депрессией по сравнению со здоровым контролем, что коррелировало со снижением сывороточного уровня BDNF (Li Y.-J., 2013). В другом исследовании также было обнаружено повышение уровня miR-132 у пациентов, что в значительной степени ассоциировалось с нарушением зрительной памяти и симптомами тревожности (Liu Y., 2016). МикроРНК, влияющие на синтез BDNF, также могут быть связаны с ответной реакцией на лечение. После двенадцати недель лечения антидепрессантом (СИОЗС) у десяти пациентов с депрессивным расстройством уровни 28 микроРНК были статистически значимо повышены, в том числе 13 из них, которые связаны с

основными механизмами нейропластичности мозга и реакции на стресс (Boschìo-Chiavetto L., 2013). В другом исследовании выявили, что уровень miR-124 в плазме крови был значимо выше у пациентов с депрессией, которые получали лечение антидепрессантами (СИОЗС), чем у пациентов без лечения. А уровень miR-132 был повышен у пациентов без лечения по сравнению с группой лечения и контрольными группами, предположительно являясь биомаркером тяжести симптомов тревоги и депрессии (Fang Y., 2018). Также было проведено сравнение влияния разных типов антидепрессантов на уровни микроРНК и обнаружено, что в группе пациентов, получавших СИОЗС, значительно повышены уровни miR-16, но не в группе, получавшей ингибиторы обратного захвата серотонина-норадреналина, что позволяет предположить, что различные типы антидепрессантов могут влиять на разные виды микроРНК. При этом уровни miR-183 и miR-212 в сыворотке крови были значительно увеличены после четырех недель лечения обоими видами антидепрессантов (Lin C.-C., 2018).

1.6 Связь между периферическим и центральным BDNF

Для определения уровня BDNF в отдельных областях мозга (гиппокамп, префронтальная кора) использовали метод Вестерн-иммуноблота или гибридизации *in situ* у экспериментальных животных с различными моделями стресса (Nibuya M., 1995; Rasmusson A. M., 2002). С развитием научных методов изменялись подходы к измерениям, в последующих исследованиях применяли метод иммуноферментного анализа для определения концентрации BDNF как в мозговой ткани, так и в сыворотке крови экспериментальных животных (Blugeot A., 2011). Также проводились посмертные определения уровня BDNF в тканях мозга пациентов, как с помощью Вестерн-иммуноблота, так и иммуноферментного анализа (Karege F., 2005). Дальнейшие исследования были направлены на прижизненное определение уровней белка в сыворотке или плазме крови пациентов при депрессивных расстройствах, а также при генетических вариациях *bdnf*, *TrkB* и для оценки эффективности терапии с использованием

иммуноферментного анализа (Aydemir C., 2006; Okamoto T., 2008; Huang T.-L., 2007; Ramesh V., 2021).

Ранее считали, что циркулирующий в крови BDNF может иметь центральное происхождение. На сегодняшний момент известно, что во многих органах и тканях обнаруживаются те или иные уровни мРНК BDNF (печень, селезенка, сердце, легкие, скелетные мышцы, лимфоциты, эндотелиальные клетки). Тромбоциты также содержат большое количество BDNF. Проведенные исследования выявили, что BDNF локализуется в тромбоцитах в цитоплазме и α -гранулах (30-40% от всего BDNF в тромбоцитах), причем только из них происходит высвобождение этого белка при активации тромбоцитов, например, тромбином, и около 70% циркулирующего в крови BDNF имеет тромбоцитарное происхождение (Tamura S., 2011). Кроме того, тромбоциты содержат про-BDNF, в гораздо меньшем количестве, чем BDNF (1:5), и активация тромбоцитов не приводит к секреции про-BDNF (Le Blanc J., 2020). Дальнейшее изучение тромбоцитарного BDNF обнаружило, что ген этого белка экспрессируется на относительно высоких уровнях в мегакариоцитах крыс и человека, а у мышей эти уровни намного ниже и коррелируют с отсутствием BDNF в сыворотке. Таким образом, циркулирующие тромбоциты в α -гранулах запасают BDNF, который синтезируется в мегакариоцитах, и представляют собой значительный источник BDNF в сыворотке крови (Chacon-Fernandez P., 2016). Также известно, что при активации тромбоцитов происходит усиление образования внеклеточных везикул, хотя данные структуры конститутивно формируются и в отсутствие внешнего стимула активации (Aatonen M. T., 2014). Источником таких везикул может служить и нервная ткань (в частности, центральная нервная система), как было показано в некоторых исследованиях по обнаружению маркеров нейронов NCAM или L1CAM (молекулы клеточной адгезии нейронов) на поверхности везикул, выделенных из плазмы крови здоровых доноров. При этом, BDNF и про-BDNF были обнаружены в значительно более высоких концентрациях в L1CAM-положительных внеклеточных везикулах по сравнению с образцами плазмы (Mustapic M., 2017), а

также высокие уровни про-BDNF в L1CAM+-везикулах выявлены у стареющих пациентов со снижением скорости ходьбы по сравнению с теми, у кого не было снижения (Suire C., 2017). Вероятно, внеклеточные везикулы, образованные в центральной нервной системе, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер в обоих направлениях, как было обнаружено ранее (Chen W. W., 2013). И сам белок также может пересекать гематоэнцефалический барьер, поскольку после введения BDNF в мозг он выявлялся на периферии (Pan W., 1998), хотя вероятность этого выглядит сейчас несколько сомнительно, учитывая обнаруженную высокую концентрацию BDNF в мозге, но не в крови у мышей (Chacon-Fernandez P., 2016; Klein A. B., 2011). Дальнейшие исследования показали, что у пациентов с депрессивными расстройствами были снижены уровни BDNF и повышены уровни про-BDNF в сыворотке крови и экзосомах (одни из подтипов внеклеточных везикул) по сравнению с контрольной группой. После лечения антидепрессантами происходило повышение уровня BDNF и снижение про-BDNF как в сыворотке, так и в экзосомах (Gelle T., 2021). Одно из последних исследований также показало наличие внеклеточных везикул нейронального происхождения (L1CAM+) в плазме крови, с содержащимися в них BDNF и про-BDNF, при чем последний содержался на более высоком уровне, что, предположительно, объясняется тем, что содержимое везикул является отражением внутриклеточной среды, а не секрета (Weaver K. R., 2022). Таким образом, сывороточный BDNF определяется содержанием его в тромбоцитах, а BDNF в плазме зависит от тех или иных видов внеклеточных везикул, дополнительно различающихся по происхождению (нейрональные, тромбоцитарные), что объясняет различие концентраций BDNF в сыворотке (10^3 - 10^4 пг/мл) и плазме (в 100-200 раз меньше по сравнению с сывороткой). Кроме того, некоторые другие клетки крови (эозинофилы) могут синтезировать, накапливать и высвобождать BDNF, как было показано при исследовании на пациентах с аллергией (Noga O., 2003). Лимфоциты также способны синтезировать BDNF, что было обнаружено по наличию мРНК данного белка в этих клетках. Интересно, что у депрессивных пациентов выявлено снижение уровней как мРНК в лимфоцитах, так и белка в тромбоцитах по

сравнению с контрольной группой (Pandey G. N., 2010), что подтвердилось результатами исследования уровней мРНК BDNF пациентов с депрессией и с попытками самоубийства в анамнезе, которое выявило значительное снижение содержания мРНК и экспрессии данного белка в моноклеарных клетках крови у таких пациентов (Lee B.-H., 2010). Другим потенциальным источником BDNF в периферической крови могут быть эндотелиальные клетки сосудов, что подтверждается исследованиями, проведенными на клеточных культурах эндотелиальных клеток головного мозга человека, где показана не только способность этих клеток синтезировать и секретировать BDNF, но и усиливать экспрессию в ответ на провоспалительные стимулы (Bayas A., 2002). При этом удаление эндотелия из микроциркуляторного русла головного мозга приводит к заметному снижению уровня BDNF в мозговой ткани (Monnier A., 2017). Эти данные свидетельствуют о том, что эндотелиальные клетки могут являться источником по меньшей мере половины BDNF, обнаруженного в гомогенатах головного мозга. Но, скорее всего, та часть BDNF, которая высвобождается люминальной (обращенной в просвет сосуда) мембраной церебральных эндотелиальных клеток, оказывает аутокринное действие, а не эндокринное, соответственно, вклад клеток эндотелия в циркулирующие периферические уровни BDNF не столь существенен (Marie C., 2018).

Сложности в потенциальном использовании периферического BDNF (т.е. BDNF в периферической крови) в качестве биомаркера дополнительно усугубляются существующей вариабельностью его концентрации как между людьми, так и у одного того же человека в зависимости от времени суток и сезона, причины которой не выяснены. По данным исследований самые высокие уровни BDNF обнаруживались утром, с плавным снижением к 12 часам ночи, колебания были более выражены у мужчин, сезонные изменения были связаны с увеличением концентраций в весенне-летний период и со снижением в осенне-зимний, и такие виды вариабельности следует учитывать при проведении измерений

периферических уровней BDNF (Begliuomini S., 2008; Molendijk M. L., 2012; Pluchino N., 2009).

Еще одна проблема, встающая перед исследователями, которая должна быть решена – существует ли корреляция изменений уровней центрального BDNF (т.е. BDNF в центральной нервной системе) с изменением уровней периферического BDNF, т.е. отражает ли содержание BDNF на периферии изменения, происходящие в центральной нервной системе при различных патологиях, а именно, при психических и нейродегенеративных заболеваниях?

Одно из первых исследований связи уровней BDNF в ЦНС и периферической крови было проведено в 2002 году и выявило положительную корреляцию уровней BDNF между корой головного мозга и сывороткой крови у молодых крыс, при этом у взрослых животных корреляции не было (Karege F., 2002). Затем в другом исследовании у взрослых животных была обнаружена значительная корреляция между уровнями BDNF в сыворотке крови и во всей мозговой ткани, но результаты не были воспроизведены отдельно для префронтальной коры и гиппокампа (Sartorius A., 2009). При проведении эксперимента с использованием трех видов млекопитающих, включая крыс, свиней и мышей, полученные результаты продемонстрировали положительную корреляцию между уровнями BDNF в цельной крови и уровнями BDNF в гиппокампе крыс и такие же корреляции у свиней (плазма и гиппокамп), что указывает на тесную взаимосвязь между уровнями BDNF в крови и мозге, которую еще предстоит выяснить (Klein A. B., 2011). На биологические эффекты BDNF влияет снижение уровней его рецепторов TrkB. Такие изменения могут быть связаны с мутациями в гене рецептора, экспрессией различных форм (полноразмерная и усеченная), снижением фосфорилирования тирозина в рецепторе, дисфункцией в компонентах сигнального пути TrkB-BDNF (Tsai S.-J, 2004; Avdoshina V., 2013; Aizawa S., 2015). Недавнее исследование на экспериментальной модели инсульта на крысах показало положительную корреляцию уровней BDNF и его рецепторов TrkB между мозгом и лимфоцитами на ранней стадии ишемического инсульта (Luo H.-Y., 2019).

Известно, что транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) повышает уровни BDNF в периферической крови и ЦНС (Chervyakov A. V., 2015). Wang с коллегами обнаружили, что ТМС усиливала BDNF-индуцированную активацию TrkB как у людей, так и у экспериментальных животных, с корреляцией между префронтальной корой головного мозга и лимфоцитами у крыс. А у людей такое увеличение активации коррелировало с уменьшением RMT (моторный порог покоя – объективная оценка возбудимости коры головного мозга) (Wang H.-Y., 2011). Кроме того, проведенный мета-анализ уровней BDNF в крови, ликворе и посмертных образцах головного мозга (неокортекс и гиппокамп) показал снижение уровней данного белка, обнаруженное как в биологических жидкостях, так и в тканях мозга, у пациентов с болезнью Альцгеймера по сравнению с контрольной группой (Du Y., 2018). Последующее исследование на посмертных тканях мозга (кора больших полушарий), плазме и ликворе, полученных от пациентов с расстройствами настроения, с суицидальными исходами и здоровых доноров, также выявили корреляции BDNF между содержанием в мозге и ликворе, мозге и плазме. Необходимо отметить, что у пациентов, скончавшихся в результате самоубийства, уровень BDNF в ткани мозга был выше, чем у пациентов, умерших другой смертью (Gadad B. S., 2021), что не было подтверждено в другом исследовании, где определяли уровни белка и мРНК BDNF и его рецептора TrkB в посмертных образцах гиппокампа пациентов с депрессией – жертв самоубийств. Было обнаружено снижение экспрессии BDNF и TrkB, как на уровне белка, так и на уровне мРНК в группе самоубийц по сравнению с контрольной группой здоровых людей, погибших в результате ДТП (Erbay L. G., 2021). С другой стороны, при изучении взаимосвязи между уровнями BDNF в сыворотке крови и недавними попытками самоубийства (в течение последних трех месяцев) в большой клинической выборке с использованием метода случай-контроль, выяснилось, что уровень BDNF не был достоверно связан с попыткой самоубийства (Eisen R. B., 2016). В основе таких неоднозначных результатов могут лежать: высокий уровень гетерогенности заболеваний, неоднородность выборки (пол, возраст и др.) и измерений (плазма, сыворотка), технические проблемы при работе

с кровью и различные размеры выборки. Недавний мета-анализ подтверждает такие выводы – между двумя группами сравнения (психиатрические пациенты с попытками самоубийства в анамнезе и пациенты без попыток) не было обнаружено существенных различий в уровнях периферического BDNF, хотя анализ подгрупп показал, что уровни BDNF были снижены в плазме, но не в сыворотке (Fusar-Poli L., 2021).

Дополнительным доказательством взаимосвязи уровней периферического и центрального BDNF могут служить корреляции содержания белка в крови с функциональными изменениями ЦНС. Так, например, уровни BDNF в сыворотке крови здоровых доноров положительно коррелировали с уровнями маркера целостности нейронов N-ацетил-аспартата (NAA) в передней поясной коре, гиппокампе (Lang U. E., 2007), а также наблюдались значительные корреляции между снижением когнитивной функции при шизофрении и уровнями BDNF в сыворотке крови пациентов (Zhang X. Y., 2012). Такая же взаимосвязь нарушений когнитивных функций со значительным снижением уровней BDNF в периферической крови была установлена при исследовании пациентов с антифосфолипидным синдромом (Rosa R. F., 2021). А повышенная экспрессия мРНК BDNF в лейкоцитах крови отрицательно коррелировала с нарастанием нарушений исполнительных функций у пациентов с расстройствами, связанными с употреблением психоактивных веществ (Anders Q. S., 2020).

В качестве других доказательств могут использоваться уровни метилирования гена *bdnf* в ЦНС и на периферии. Ранее было обнаружено соответствие между метилированием ДНК в лейкоцитах периферической крови и образцами ткани головного мозга, с более сильными корреляциями в островках CpG, при изучении общегеномных паттернов метилирования (Tylee D. S., 2013). Эти выводы подтвердились на уровне гена *bdnf* выявлением значительной корреляции в метилировании промотора I на периферии, когда ДНК выделялась из клеток крови и мышц, с метилированием этого промотора в ткани головного мозга (префронтальная кора и гиппокамп) у пациентов с биполярным расстройством

(Stenz L., 2015). При исследовании периферического уровня метилирования промоторных областей гена *bdnf* у таких пациентов показало, что ранее начало этого заболевания связано с наличием аллели Met и с более высоким уровнем метилирования определенных сайтов (островки CpG) в локусе полиморфизма (промотор IX) при аллели Val (Nassan M., 2020). У пациентов с депрессивными расстройствами также был обнаружен значительно более высокий уровень метилирования в промоторе IX и I по сравнению с контрольными (здоровыми) группами, наряду с более низкими уровнями мРНК BDNF и самого белка в периферической крови. Кроме того, более высокие уровни метилирования в этом промоторе были связаны с положительным ответом на лечение антидепрессантами (селективными ингибиторами обратного захвата серотонина) (Hsieh M.-T., 2019; D'Addario C., 2013).

Таким образом, результаты исследований в этой области несколько неоднородны и зависят от стадии заболевания, объема выборки пациентов, источника BDNF (плазма, сыворотка) и других параметров. С другой стороны, исследования на здоровых людях показали, что уровень периферического BDNF может быть надежным показателем, так как среднее значение этого белка через 12 месяцев статистически не отличалось от средних уровней, определенных в исходных образцах сывороток крови (Naegelin Y., 2018).

Совокупность всех изложенных доказательств позволяет предположить, что BDNF можно использовать как биомаркер нейрональной дисфункции для отдельных нервно-психических заболеваний, в том числе и депрессивных расстройств, а также в качестве прогностического маркера эффективности лекарственной терапии.

Глава 2. Материалы и методы

Для достижения поставленной цели и выполнения задач использовали комплекс иммунохимических, биотехнологических, биохимических и культуральных методов. Для получения рекомбинантного белка recBDNF использовали методы: ПЦР-амплификация, метод молекулярного клонирования, различные виды электрофореза. После наращивания культур генно-модифицированных клеток *E. coli* в объеме после лизиса чистый белок выделяли с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Для получения гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к recBDNF, использовали общепризнанную схему слияния G. Kohler и C. Milstein (Kohler G., 1975) с некоторыми модификациями (Гурина О.И., 2005). Моноклональные антитела из асцитической жидкости и культуральной среды выделяли с помощью аффинной хроматографии на протеин А-агарозе. Поликлональные антитела из полиспецифических антисывороток получали с помощью иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе. Рекомбинантный белок recBDNF исследовали с помощью аналитического диск-электрофореза с додецил-сульфатом натрия и электрофореза с последующим иммуноблотом. Анализ антител проводили методами электрофореза, иммуногисто- и цитохимических методов, иммуноферментного анализа.

2.1 Пациенты

При верификации разработанной тест-системы ИФА были использованы сыворотки крови пациентов с психическими заболеваниями общим количеством 120 образцов. Пациенты были разделены на группы: 1 гр. – с шизофренией (МКБ – F20), 2 гр. – с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе, 3 гр. – с первым психотическим эпизодом. В качестве контрольных образцов были использованы сыворотки крови условно здоровых доноров в количестве 100 образцов, средний возраст составил 35,6 лет. Сыворотки были представлены ПКБ № 4 им. П. Б. Ганнушкина и ПКБ № 1 им. Н. А. Алексеева, от каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

В 1 группе было 78 пациентов, средний возраст 36,9 лет. Эта группа была обследована с помощью психиатрического метода (Шкала депрессии Калгари у больных шизофренией – Calgary depression schizophrenia scale) и разделена на 2 подгруппы – пациенты с депрессивными проявлениями (38 чел.), пациенты без депрессивных проявлений (34 чел.)

Во 2 группе было 22 пациента, средний возраст 31,8 лет.

В 3 группе было 26 пациентов, средний возраст 26,8 лет. По результатам психиатрического обследования с учетом баллов по шкале мании Янга было выделено 2 подгруппы – без аффективных проявлений (19 чел.), пациенты с маниакальными состояниями (7 чел.).

2.2 Животные

Лабораторных животных (крыс, мышей, кроликов) содержали в условиях лабораторного вивария, в отдельных клетках, по 6 особей в каждой клетке, (кроликов – по 1 животному), при нормальном световом режиме, свободном доступе к воде и питанию. Для получения гибридом и асцитической жидкости

использовали половозрелых самок мышей линии Balb/C, в возрасте 6-7 недель. Для получения полиспецифических антисывороток, содержащих поликлональные антитела, использовали половозрелых самок кроликов породы шиншилла, в возрасте 1-1,5 года. Крысы породы Wistar (3-4 мес) были использованы для выделения головного мозга при проведении иммуногистохимического анализа.

Условия содержания крыс, мышей, кроликов и все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденным МЗ РФ (Приказ № 267 от 19.06.2003) и Правилами биоэтики, утвержденными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Директива 86/309 Европейского сообщества от 24 декабря 1986 г., Страсбург). Получено экспертное заключение локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России от 24.03.2021 г.

2.3 Культуры клеток

Культуры клеток миеломы мыши Balb/C Sp2/0-Ag14

Линия Sp2/0-Ag14 – это клетки миеломы мыши (*Mus musculus*, В-лимфоциты), морфологически представляющие собой лимфобластоподобные клетки, которые могут расти в суспензионной культуре. Эти клетки являются дефектными по ферменту ГГФРТ (гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе), что обуславливает их чувствительность к селективной среде, содержащей гипоксантин, тимидин и аминоптерин (НАТ) и устойчивость к антиметаболиту 8-азагуанину. Хотя иногда миеломные клетки этой линии могут терять устойчивость к данному антиметаболиту и способны расти и пролиферировать в селективной среде НАТ, тем самым ограничивая рост необходимых гибридных клеток. Известно, что у линии Sp2/0-Ag14 низкий процент таких реверсий, по сравнению с другими миеломами мышей, но тем не менее для селекционного удаления тех

клеток, у которых присутствует активный фермент ГГФРТ, клетки Sp2/0-Ag14 перед слиянием культивируют в среде с добавлением 8-азагуанина.

Клетки мышинной миеломы Sp2/0-Ag14 культивировали в течение недели в среде RPMI, содержащей 20 % FBS (RPMI-1640, 1 % 100 мМ пирувата натрия, 1 % 200 мМ L-глутамина, 1 % раствор антибиотика-антимикотика, Gibco) для наращивания клеточной массы с плотностью клеток в культуре 5×10^5 - 5×10^6 . Смену питательной среды проводили каждые 2-3 дня, клеточные пассажи осуществляли по мере необходимости. В течение недели перед процедурой слияния клетки культивировали в селективной среде с 8-азагуанином, каждый день производили контроль роста клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии (Leica).

Культуры клеток эмбриональных астроцитов человека

Данная культура была иммунохимически охарактеризована и любезно предоставлена сотрудниками лаборатории иммунохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ "НМИЦ ПН им. В.П. Сербского" Минздрава России.

Клетки эмбриональных астроцитов человека культивировали в течение недели в среде DMEM/F12, содержащей 10 % FBS (DMEM/F12, 1 % 200 мМ L-глутамина, 1 % Antibiotic-antimycotic solution, Gibco) для наращивания клеточной массы с плотностью клеток в культуре 5×10^4 - 5×10^5 , смену питательной среды проводили каждые 2-3 дня. Каждый день производили контроль роста клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии (Leica).

2.4 Получение рекомбинантного белка recBDNF

Известно, что BDNF имеет две изоформы (про- и зрелую), но, учитывая важную роль зрелой формы BDNF (mBDNF) в процессах нейрогенеза, модулировании нейро- и синаптической пластичности в тех отделах мозга, которые

связаны с аффективными и когнитивными функциями, а также проведенные исследования, в которых наблюдались изменения периферических уровней mBDNF при различных психических заболеваниях, нами была выбрана именно зрелая форма этого белка, которая в нативном виде представляет собой нековалентно связанный гомодимер (27 кДа с субъединицами приблизительно по 13,5 кДа).

Для разработки количественных иммунохимических методов анализа BDNF (иммуноферментного, иммуногисто- и цитохимического, иммуноблоттинга), а также для получения моно- и поликлональных антител требуется достаточное количество белковых препаратов. Традиционные биохимические процедуры выделения из гомогенатов ткани мозга весьма трудоемки и малопродуктивны из-за небольшого содержания этого белка в мозге и многоступенчатой и сложной очистки, а также из-за возникающих сложностях при стандартизации такого препарата. Впервые BDNF был выделен и очищен из мозга свиньи в 1982 г., при этом из 1,5 кг мозга свиньи получили 1 мкг чистого препарата белка (Barde Y.A., 1982). Значительно более продуктивными являются методы получения рекомбинантных белков в бактериальных культурах *E. coli*, так как они легко поддаются генетическим манипуляциям, экспрессия необходимых белков происходит достаточно быстро и можно масштабировать весь процесс синтеза.

При получении рекомбинантного белка recBDNF был использован штамм *E. coli* BL2[DE3], содержащий в своем геноме ген РНК-полимеразы фага T7 в составе профага λ , помещенный под контроль lac-промотора. Этот штамм трансформировали плазмидой pET32a, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую mBDNF, под контролем T7-промотора. При добавлении в среду ИПТГ происходила индукция гена РНК-полимеразы T7, при этом синтезировалась РНК-полимераза и происходила транскрипция и трансляция клонированной последовательности. recBDNF представлял собой белок слияния, состоящий из аминокислотной последовательности тиоредоксина и последовательности mBDNF, что привело к увеличению молекулярной массы

белка (рисунок 2.1) и позволило облегчить его выделение из бактериальной культуры за счет гексогистидинового тега на конце молекулы.

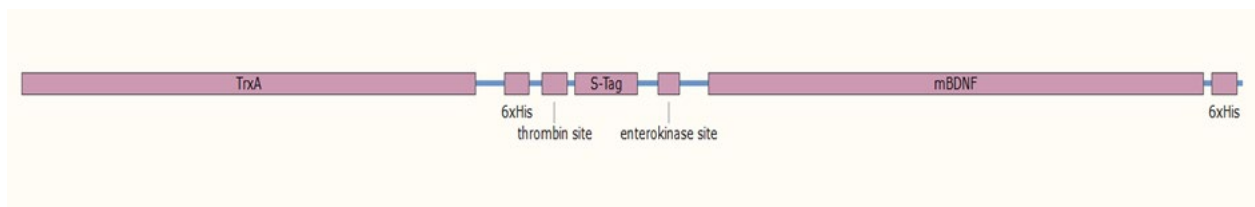


Рисунок 2.1. Схема рекомбинантного ресBDNF (32 кДа).

2.4.1 Создание штамма-продуцента ресBDNF на основе *E.coli*

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция является экспериментальным методом, позволяющим добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов ДНК в биологической пробе. В 1971 году были впервые описаны принципы использования праймеров и других ингредиентов, необходимых для получения копий ДНК (Kleppe K., 1971). В 1983 г. Kary Mullis открыл термостабильную Taq-полимеразу и предложил метод, известный как полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Mullis K., 1992). При этом термостабильная ДНК-полимераза и два специфических олигонуклеотидных праймера используются для быстрого и экспоненциального получения множества копий определенных областей нуклеиновых кислот. Специфичность реакции контролируется праймерами, которые направляют репликацию промежуточной 'целевой' области. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК.

Основные этапы экспериментальной работы (рисунок 2.2):

1. ПЦР-амплификация кДНК, кодирующей mBDNF человека, из библиотеки кДНК мозга человека
2. Рестрикция полученных фрагментов и экспрессирующей плазмиды pET32a
3. Молекулярное клонирование
4. Оценка экспрессии рекомбинантного белка, наращивание клеток штамма, выделение и очистка белка.

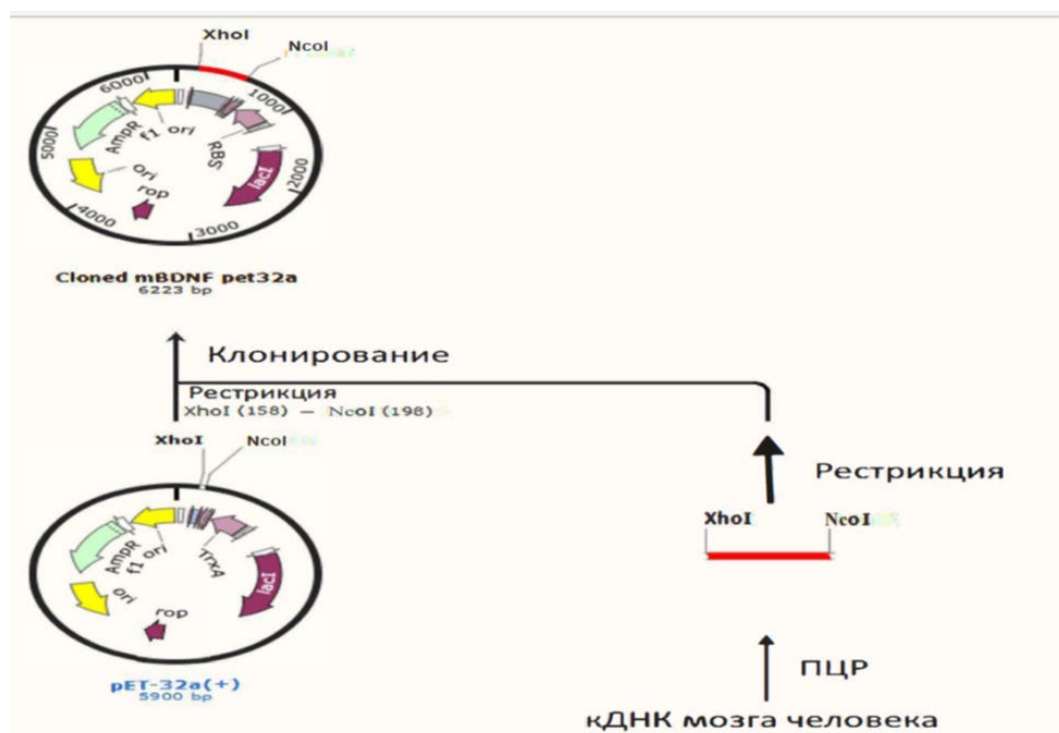


Рисунок 2.2. Принципиальная схема клонирования вставки, кодирующей mBDNF человека, для получения штамма-продуцента resBDNF.

ПЦР-амплификация

Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый BDNF человека, была амплифицирована с помощью обратного и прямого праймеров, также несущих сайты узнавания рестриктаз NcoI и XhoI, (TATGGATCCACTCTGACCCTGCCCCG и GCCCTCGAGTCTTCCCSTTTTAATGGTCAATGTACATACACA) из кДНК библиотеки мозга человека по соответствующему протоколу (таблица 3.1).

Начальная денатурация	95°C, 1 мин	1 цикл
Денатурация	95°C; 5 сек	30 циклов
Отжиг праймеров	62°C; 15 сек	
Элонгация	72°C; 1 мин	
Финальная элонгация	72°C; 10 минут	1 цикл

Таблица 2.1. Протокол амплификации

ПЦР осуществляли с помощью Taq-полимеразы (Евроген, Россия) по стандартному протоколу, в состав реакционной смеси также входили буфер для ПЦР с магнием, смесь дезоксирибонуклеотидов, прямой и обратный праймеры. Смесь перемешивали в термоциклере (Эппендорф) и проводили ПЦР. Полученные образцы анализировали с помощью электрофореза ДНК в 1% агарозе и использовали немедленно или же хранили при -20°C.

Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом очистки ДНК на силика-мембране (Carter M. J., 1993) с помощью набора для очистки плазмидной ДНК (Qiagen, США). Культуру бактерий BL21[DE3], содержащих плазмиду pET32a, культивировали в плоскодонной колбе Эрленмейера в среде LB (Lysogeny broth) (Bertani G., 1951) до достижения оптической плотности OD₆₀₀ - 0,5, после чего отбирали небольшую часть культуры и центрифугировали в настольной центрифуге (Eppendorf, Германия) в течение 1 минуты (5000-7000 g). После этого супернатант удаляли, осадок тщательно ресуспендировали в ресуспендирующем буфере, добавляли лизирующий раствор и осторожно перемешивали содержимое пробирки, переворачивая ее до тех пор, пока лизат не станет прозрачным. После

лизиса к клеткам добавляли нейтрализующий раствор и перемешивали содержимое пробирки до образования однородной творожистой взвеси. Получившуюся смесь центрифугировали в настольной центрифуге (Eppendorf, Германия) на максимальной скорости. Спин-колодку из соответствующего набора помещали в собирательную пробирку и помещали туда осветленный супернатант. Колодку центрифугировали 60 секунд на максимальной скорости, в результате чего плазмидная ДНК сорбировалась на силиконовом носителе колонки. Из собирательной пробирки удаляли фильтрат, в колодку добавляли промывочный раствор из соответствующего набора, после чего колодку центрифугировали еще 60 секунд. Стадию промывки повторяли еще один раз, и после этого колодку центрифугировали на максимальной скорости для полного удаления «промывочного раствора». В центр мембраны далее наносили около 50 мкл стерильной деионизированной воды свободной от нуклеаз, после чего пробирку с колонкой инкубировали 2 минуты при комнатной температуре и центрифугировали в течение 30 секунд. Собранный элюат использовали сразу же или хранили при -40°C .

Выделение ДНК из реакционных смесей на силика-спин колонках

Выделение ДНК из реакционных смесей (после ПЦР, рестрикции и лигирования) осуществляли с помощью силика-спин колонок (Boom R., 1990) и набора для выделения ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген, Россия). К одному объему реакционной смеси добавляли 5 объемов «связывающего раствора», после чего раствор перемешивали и переносили в колодку, предварительно помещенную в микроцентрифужную пробирку. Пробирку с колонкой центрифугировали на максимальной скорости в настольной центрифуге. После центрифугирования из пробирки удалялся фильтрат и вносили в колодку промывочный раствор. Колодку центрифугировали, удаляли из нее фильтрат и центрифугировали пустую колодку для полного удаления промывочного раствора. Колодку помещали в новую стерильную микроцентрифужную пробирку и

наносили в центр мембраны элюирующий раствор. Пробирку с помещенной в нее колонкой центрифугировали. Очищенный элюат использовали сразу же либо хранили при -20°C .

Молекулярное клонирование

Конструирование экспрессирующей плазмиды осуществляли по стандартной методике (Cohen S. N., 1973). Полученную в результате ПЦР последовательность, кодирующая зрелую форму BDNF и содержащая последовательности узнавания соответствующих рестрикционных эндонуклеаз NcoI и XhoI (рисунок 2.3), и ДНК плазмиды pET32a обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (Сибэнзим, Россия). Дополнительно было проведено выявление редких кодонов в нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, с помощью Интернет-ресурса <http://gcua.schoedl.de>.

tatGGATCCactctgaccctgcccgccgaggggagctgagcgtgtgtgacagtattagtgagtgggtaacggcggcag
acaaaaagactgcagtggacatgtcgggcgggacggtcacagtccttgaaaaggccctgtatcaaaaggccaactgaagc
aatacttctacgagaccaagtgcatacccatgggttacacaaaagaaggctgcaggggcatagacaaaaggcattggaactc
ccagtgccgaactaccagtcgtacgtgcggggcccttaccatggatagcaaaaagagaattggctggcgattcataaggata
gacattctgtgtatgtacattgaccattaaaagggaagaCTCGAGgggc

Рисунок 2.3. Структура фрагмента кДНК, кодирующего mBDNF. Подчеркнуты последовательности узнавания соответствующих рестрикционных эндонуклеаз NcoI и XhoI.

Для удобства распознавания эндонуклеазой рестрикции соответствующего сайта с 5' конца перед сайтом узнавания рестриктазы также вносили добавочные последовательности из 3 нуклеотидов. Рестрикцию осуществляли согласно рекомендациям, изложенным в протоколах производителя и производили по

отдельности каждой рестриктазой. Далее проводили электрофорез ДНК в 1% агарозном геле, интересующие последовательности вырезали и очищали с помощью набора для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген), после чего осуществляли лигирование полученных фрагментов путем смешивания избытка ДНК вставки с ДНК вектора. В реакционную смесь также добавляли Т4 ДНК-лигазу и буфер для лигазы (Сибэнзим), после чего реакционную смесь инкубировали 8 часов при 16°C. Лигирующую реакционную смесь либо использовали сразу же для трансформации бактерий, либо хранили при -40°C. После электротрансформации клетки высевали на агаровую среду LB с ампициллином. Скрининг колоний, содержащих плазмиду со вставкой, осуществляли с помощью ПЦР (Saris P. E., 1990). Для анализа кончиком наконечника выкалывали по 10 колоний с каждой чашки Петри. При ПЦР использовали универсальный праймер, комплементарный последовательности Т7 промотора экспрессирующего вектора и 3'-концевой последовательности вставки. Анализ на наличие вставки также осуществили с помощью скрининга колоний методом электрофореза в 1% агарозном геле. Выделение плазмидной ДНК со вставкой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый BDNF, осуществляли по изложенной выше методике с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). Правильность последовательности вставки верифицировали секвенированием, которое проводили с помощью набора для секвенирования (Евроген, Россия). Те колонии, в которых наличие вставки подтверждалось, переносили в жидкую среду LB с ампициллином, где культивировали для наращивания клеточной массы.

Приготовление электрокомпетентных клеток и электротрансформация

Для приготовления электрокомпетентных клеток использовали штамм BL21[DE3] (Invitrogen, США). Клетки *E. coli* вначале высевали из замороженного стока, хранившегося при -80°C, на поверхность плотной среды LB с агаром, где культивировали в термостате при +37°C в течение ночи. Отдельные колонии

переносили в стерильных условиях в жидкую среду LB, после чего культивировали в колбах Эрленмейера при +37°C, в термошейкере (Eppendorf, Германия) до достижения оптической плотности OD₆₀₀ - 0.5. Клетки бактерий осаждали центрифугированием при 4000 g при +4°C, после чего клеточный осадок ресуспендировали в стерильной охлажденной (+4°C) деионизованной воде. Ресуспендированные в стерильной воде клетки бактерий опять осаждали центрифугированием, после чего ресуспендировали в охлажденном стерильном 10% глицерине. Клетки еще раз осаждали центрифугированием, после чего супернатант отбирали, а осадок ресуспендировали в стерильном растворе 10% глицерина. Во время всех этих процедур пробирки с клетками находились при температуре в диапазоне от 0 до +4° С. Ресуспендированные в 10% глицерине клетки использовали сразу же для электротрансформации, либо их разделяли на порции объемом по 100 мкл, вносили в отдельные пробирки и хранили при -80°C для дальнейшего использования.

Для электропорации использовали электропоратор (Eppendorf, Германия). Электропорация электрокомпетентных клеток *E. coli* осуществляли по стандартной методике (Dower W.J., 1990). В суспензию клеток вносили лигирующую смесь, содержащую плазмидную ДНК с вставкой, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелый BDNF, после чего эту смесь переносили в предварительно охлажденную кювету, которую помещали в электропоратор. Для электропорации пропускался электрический разряд (1.8 кВ, 25μF, 200 Ом), после чего суспензию немедленно ресуспендировали в 1 мл стерильной, подогретой до 37°C, среде SOC. Далее клетки инкубировали в термошейкере при +37°C в течение часа, после чего их высевали на плотную среду LB с агаром и инкубировали в термостате (Binder, Германия) в течение ночи до появления видимых колоний.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК в агарозном геле производили по стандартной методике (Smisek D. L., 1990). Раствор агарозы (1 %) в ТАЕ буфере (Трис-ацетатный буфер, 40 мМ Трис-ацетат и 1 мМ ЭДТА, pH 8.3.) нагревали до полной прозрачности (до полного растворения агарозы), после чего добавляли бромистый этидий. Затем собирали горизонтальный аппарат для фореа (Bio-rad, США). Ёмкость для геля помещали на заливочный столик, в ней располагали гребёнку, затем в ёмкость для геля заливали 1% агарозный гель. После застывания ёмкость с гелем перемещали в камеру для горизонтального фореа. К образцам ДНК добавляли буфер внесения. Образцы, смешанные с красителем, вносили в лунки в агарозном геле. Через гель пропускали электрический ток 90 В. После того как краситель проходил расстояние равное $\frac{2}{3}$ длины геля, ток останавливали, и полосы ДНК визуализовали с помощью ультрафиолетового света на трансиллюминаторе (Vilber, Германия).

2.4.2 Культивирование штамма-продуцента и анализ интенсивности экспрессии рекомбинантного белка

Стоковую культуру готовили путем 12-ти часового инкубирования колонии в жидкой среде LB с ампициллином в колбе при 37°C при встряхивании на орбитальном шейкере (Eppendorf, Германия). После этого культуру переносили в колбы с жидкой средой LB с ампициллином, исходя из соотношения 2 мл стоковой культуры на 100 мл среды LB, и инкубировали в течение нескольких часов в термошейкере при таких же параметрах культивирования. При достижении культурой оптической плотности 0.6 при 600 нм в среду вносили стерильный ИПТГ. После индукции бактерии культивировали еще в течение 4 часов. Перед индукцией отбирали 0.5 мл неиндуцированной культуры для анализа. После индукции экспрессии пробы из каждой культуры отбирали через каждый час по 0.5 мл. После отбора клетки в пробах осаждали центрифугированием и замораживали при -20°C. Отобранные пробы анализировали с помощью диск-электрофореза с SDS (додецилсульфат натрия) в полиакриамидном геле, и проводили оценку интенсивности экспрессии recBDNF.

После завершения культивирования клетки *E. coli* осаждали центрифугированием. После удаления супернатанта к осадку добавляли лизирующий буфер, содержащий 8 М мочевины. Клетки ресуспендировали, после чего инкубировали 1 час при непрерывном перемешивании на орбитальном шейкере при температуре +4°C. После этого центрифугировали (3000 g, 20 мин), полученный осветленный лизат использовали сразу же или же хранили при -20°C.

2.4.3 Препаративное выделение рекомбинантного recBDNF

Металл-хелатная хроматография

Концепция металл-хелатной аффинной хроматографии была впервые сформулирована и представлена Поратом (Porath J., 1975). Она была основана на известном сродстве ионов переходных металлов, таких как Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} к гистидину и цистеину в водных растворах. Впоследствии появилась идея использовать прочно зафиксированные ионы металлов для фракционирования белков. Реакция образования комплекса иона металла и некоторых функциональных групп (например, фосфатных групп) органических молекул, как правило, обратима. Следовательно, иммобилизованные ионы металлов можно использовать как сорбент. Взаимодействие между сорбентом и аналитом pH-зависимое, поэтому связанные вещества можно элюировать, изменяя pH, уменьшая ионную силу буфера или используя другие хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или имидазол. Одним из самых известных приложений металл-аффинной хроматографии является очистка гистидин (His) - меченных белков (Block H., 2009).

Препаративное выделение рекомбинантного белка recBDNF осуществляли по стандартным протоколам с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, представляющей собой микросферы средним диаметром около 100 мкм на основе кросс-сшитой агарозы с иммобилизованным комплексом лиганда нитрилотриуксусной кислоты с никелем (Crowe J., 1994). При этом Ni-NTA

агарозу (из расчёта 1 мл на 10 мл лизата) добавляли в лизат из предыдущего этапа. Лизат с растворенной в нем Ni-NTA агарозой инкубировали в течение 1 ч при непрерывном перемешивании на орбитальном шейкере при температуре +4°C. После этого суспензию вносили в колонку с кремниевым фильтром. Колонку промывали последовательно шестью объемами промывочного буфера А (8М мочевины, 20мМ NaH_2PO_4 , 500мМ NaCl , pH=8,0) и промывочного буфера Б (8М мочевины, 20мМ NaH_2PO_4 , 500мМ NaCl pH=6,3), после чего элюировали рекомбинантный белок элюирующим буфером С (8М мочевины, 20мМ NaH_2PO_4 , 500мМ NaCl , pH=4,0). Затем белок концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 10кДа до концентрации 1 мг/мл. Полученные препараты анализировали с помощью диск-электрофореза с SDS в полиакриламидном геле (ПААГ) и хранили при температуре -40° С.

При проведении иммуноаффинной хроматографии для выделения чистого препарата поликлональных антител из сывороток кролика необходимо было удалить мочевины из раствора рекомбинантного белка, так как этот реагент снижает способность связываться с активными центрами CN-Br-сефарозы. Поэтому после инкубации лизатов с Ni-NTA-агарозой и внесения на колонку, проводили промывку со ступенчатым градиентом фосфатно-солевого буфера с 0,01 М имидазолом. Элюцию осуществляли 0,5 М имидазолом (pH 4.0), затем с помощью гель-фильтрации проводили замену буфера на связующий буфер (0,1 М NaHCO_3 , 0,5 М NaCl pH 8,3), используемый при иммуноаффинной хроматографии. Результаты проведенных хроматографий оценивали с помощью электрофореза в ПААГ.

2.4.4 Проведение аналитического электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга

Электрофорез белков в полиакрилоамидном геле (ПААГ) осуществляли по стандартной методике (Laemmli U. K., 1970) в 12,5% геле в вертикальной камере для электрофореза (Bio-rad, США). С помощью устройства для заливки стёкол для

форе́за между стеклами заливали разрешающий гель (30% акриламид, вода, 100мкл PSA, 100мкл SDS, 8 мкл TEMED (тетраметилэтилендиамин)). Сверху аккуратно наслаивали бутанол. После полимеризации разрешающего геля бутанол удаляли с помощью фильтровальной бумаги, промывали электродным буфером и заливали концентрирующий гель (30% акриламид, вода, 50мкл PSA, 100мкл SDS, 5 мкл TEMED), в который помещали пластиковую гребенку. К анализируемым образцам добавляли 1-2 мкл пятикратного буфера с SDS и вносили образцы в лунки. В одну из лунок вносили маркеры молекулярной массы (ThermoFisher). При постоянной силе тока 30 мА проводили электрофорез до тех пор, пока краситель не достигал границы концентрирующего и разрешающего геля. После окончания форе́за гель окрашивали в растворе Кумасси, после чего гель переносили в отмывочный раствор и отмывали от красителя при покачивании на шейкере.

Перенос белков на поливинилхлоридную мембрану производился с помощью вестерн-блоттинга (Renart J., 1979; Burnette W. N., 1981) на ячейках для влажного переноса (Bio-Rad, США). Поливинилхлоридную (ПВХ) мембрану предварительно смачивали в 98% метаноле, затем переносили в емкость с буфером для блоттинга. Кассету для влажного переноса белков из полиакриламидного геля на мембрану собирали следующим образом: гель клали на мембрану, с обеих сторон помещали фильтровальную бумагу, пропитанную TGB буфером (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 10% метанол, pH 8.3) и затем зажимали гель и мембрану между двумя мягкими прокладками со сквозными отверстиями. Пластиковые пластины с зажатыми между ними гелем и мембраной помещали в ячейку для блоттинга, добавляли в ячейку охлажденный TGB буфер, в этот буфер также помещали несколько хладагентов и осуществляли перенос при силе тока 350 мА в течение часа. По окончании переноса ПВХ мембрану промывали 2 раза в деионизованной воде по 5 мин. Далее мембрану переносили в 1% раствор бычьего сывороточного альбумина и инкубировали в этом растворе в течение ночи (+4°C), после чего мембрану опять переносили в раствор PBS и добавляли к этому раствору антитела к BDNF из коммерческого набора препаратов антител (Abcam). Инкубацию с первичными

антителами проводили в течение 1 ч, затем мембраны трижды промывали PBS с детергентом (Твин-20) и добавляли биотинилированные анти-кроличьи иммуноглобулины лошади (Vector Labs). После инкубации со вторыми антителами мембрану отмывали с помощью PBS с детергентом (Твин-20). Иммунохимическое проявление осуществляли с помощью реактива DAB (Vector Labs). Документировали результат при помощи фотоаппарата.

2.5 Получение поликлональных антител

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенную смесь антител, продуцируемых различными клонами В-лимфоцитов. Они, в основном, состоят из смеси подтипов IgG и распознают различные эпитопы антигена. Эффективность применения поликлональных антител несколько ограничена, в основном, из-за невозможности их стандартизации, кроме того они связываются с несколькими эпитопами антигенной детерминаты. Следует, однако, отметить, что в некоторых методических аспектах поликлональность может являться преимуществом, например, при использовании в качестве вторичных антител при иммунопроявлении, что обеспечивает полезное усиление суммарного сигнала.

2.5.1 Иммунизация животных

В связи с тем, что BDNF мышей и кроликов являются практически идентичны BDNF человека, нами были модифицированы стандартные протоколы иммунизации. Для этого при первой иммунизации в качестве иммуногенного носителя была использована Ni-NT-агароза, в качестве антигена – рекомбинатный белок BDNF.

Для получения поликлональных антител проводили иммунизацию кроликов породы шиншилла в возрасте 1-1,5 года.

Схема иммунизации кроликов:

1. Для первой иммунизации использовали 100 мкл 50% суспензии Ni-NT-агарозы с иммобилизованным на ней 400 мкг рекомбинатного препарата гесBDNF, эмульгированного с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда и вводили подкожно в область шейных лимфатических узлов.
2. При второй иммунизации использовали 200 мкг препарата рекомбинантного гесBDNF в 0,5 мл PBS, эмульгированного с 0,5 мл неполного адьюванта Фрейнда и вводили подкожно спустя 4 недели после первой иммунизации.
3. Третью иммунизацию проводили тем же препаратом через 5 сут после второй.

Эффективность иммунизации оценивали методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Кровь брали на пике выработки антител из краевой вены уха кролика. Сыворотки крови кролика, содержащие анти-BDNF антитела, хранили при -40°C , рабочие аликвоты при $+4^{\circ}\text{C}$.

2.5.2 Очистка поликлональных антител методом иммуноаффинной хроматографии

Для получения чистых препаратов поликлональных антител использовали метод иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе с иммобилизованным на ней рекомбинантным гесBDNF. Для этого было получено необходимое количество препарата рекомбинантного белка (см. раздел 3.4.8). Препарат белка смешивали с сефарозой в соотношении 250 мг сефарозы на 1 мг белка в связующем буфере, содержащем 0,1 М NaHCO_3 , 0,5 М NaCl (pH 8,3), инкубацию продолжали в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. Затем проводили промывку 5 объемами связующего буфера и блокирование несвязавшихся активных групп CN-Br-сефарозы буфером, содержащим 0,1 М Трис-HCl, pH 8,0, в течение 2 часов при $+25^{\circ}\text{C}$. Затем проводили 3 цикла промывки 5 объемами колонки: сначала 0,1 М ацетатом Na с 0,5 М NaCl (pH 4,0), затем 0,1 М Трис-HCl с 0,5 М NaCl (pH 8,0).

Для получения чистых препаратов поликлональных антител использовали полиспецифическую антисыворотку кролика, на колонку с иммобилизованным recBDNF на CN-Br-сефарозе наносили 10 мл сыворотки (разведенную PBS в соотношении 1:10), потом промывали 10 объемами колонки фосфатным буфером (PBS). Элюцию проводили глициновым буфером (0,1 М глицин, pH 2,5), при этом элюаты собирали в пробирки, содержащие 5-кратный буферный раствор (PBS, pH 7.3). Результат оценивали измерением концентрации антител на спектрофотометре (NanoVue) и с помощью непрямого ИФА.

Биотинилирование поликлональных антител проводили в соответствии с инструкцией производителя с использованием набора для биотинилирования (Biotin-XX Microscale Protein Labeling Kit, Invitrogen). С помощью гель-филтрации проводили смену буфера на фосфатно-солевой буфер, затем смешивали с раствором биотина и инкубировали в течение 15 мин. После чего осуществляли отмывку от несвязавшегося биотина методом гель-филтрации. Результат оценивали измерением концентрации антител на спектрофотометре (NanoVue, GE) и с помощью непрямого ИФА.

Для выявления специфического взаимодействия данных антител с нативным антигеном были проведены иммуногисто- и цитохимический анализы на срезах гиппокампа крыс и культурах эмбриональных астроцитов человека, а также поликлональные антитела применяли для разработки тест-системы иммуноферментного анализа.

2.6 Получение моноклональных антител к recBDNF

Получение и использование моноклональных антител — одно из существенных достижений современной иммунологии. Моноклональные антитела — это иммуноглобулины, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону. Техника получения моноклональных антител была разработана в 1975 году учеными Кёлером и

Мильтштейном, с тех пор используется во многих лабораториях мира в качестве стандарта (Köhler G., 1975). В медицине синтезируемые гибридами моноклональные антитела, меченные изотопами или иным способом, можно использовать для диагностики, терапии различных онкологических заболеваний. Также они широко применяются в самых различных вариантах иммунохимического анализа.

Моноклональные антитела полностью идентичны между собой и связывают один эпитоп антигена. Использование тщательного скрининга и отбора полученных гибридных клонов позволяет практически исключить вероятные перекрестные реакции, благодаря чему достигается высокая специфичность тест-систем иммуноферментного анализа (ИФА) на основе моноклональных антител и возможность их стандартизации.

Для получения моноклональных антител необходимо провести слияние В-лимфоцита, продуцирующего специфические антитела без возможности длительного культивирования, с миеломной клеткой, которая не продуцирует антитела, но способна долго пролиферировать в культуре. Конечным продуктом слияния таких клеток является гибридная (гибридная) клетка, которая посредством митотического деления может давать клоны абсолютно идентичных клеток, и такие клоны могут секретировать одинаковой специфичности антитела (Чехонин В.П., 2007).

Иммуногенность антигена определяется его способностью активировать иммунную систему. Для инициации иммунного ответа необходима образование связи антигена со специфическими В-лимфоцитами, стимулируя образование клеток, продуцирующих антитела. Антигенный препарат представлял высокоочищенный рекомбинантный recBDNF, дополнительно его иммуногенность была повышена добавлением адъювантов (полный и неполный адъюванты Фрейнда). После введения животному они депонируют антиген в течение длительного времени, что обеспечивает продолжительную поддержку иммунного ответа. Полный адъювант Фрейнда, кроме масляного раствора и эмульгатора,

дополнительно содержит микобактерии, которые стимулируют образование гранулем, состоящие из Т-лимфоцитов, макрофагов и антиген-презентирующих клеток, которые вызывают активацию лимфоцитов. Полный адъювант Фрейнда обычно применяют для первой иммунизации; во всех последующих его заменяют неполным без микобактерий (Чехонин В.П., 2007). Для получения клеток селезенки, продуцирующих антитела к BDNF, использовались мыши, которым в течение месяца вводили 20-200 мкг рекомбинантного белка recBDNF. Заключительное бустерное введение (100 мкг recBDNF) было произведено за 2 дня до слияния, что гарантировало присутствие большого количества В-иммунобластов (активированных антигеном В-клеток в стадии деления), которые необходимы для проведения успешного слияния с миеломными клетками (Abe M., 1993).

В технике получения моноклональных антител есть некоторые сложности, так как в селезенке мышей, которая является источником иммунных В-клеток, находится смесь разнообразных клеточных линий. Поэтому гибридомные клетки необходимо провести через ряд селекционных процедур для удаления гибридом, не продуцирующих антител или продуцирующих антитела другой специфичности и низкой аффинности. А также одной из важных задач является выделение определенных клонов со специфичной моноклональностью как клеток, так и антител, которые продуцируются ими.

В соответствии с целью и задачами работы мы получали моноклональные антитела к препарату рекомбинантного recBDNF. Схема получения моноклональных антител приведена на рисунке 2.4.

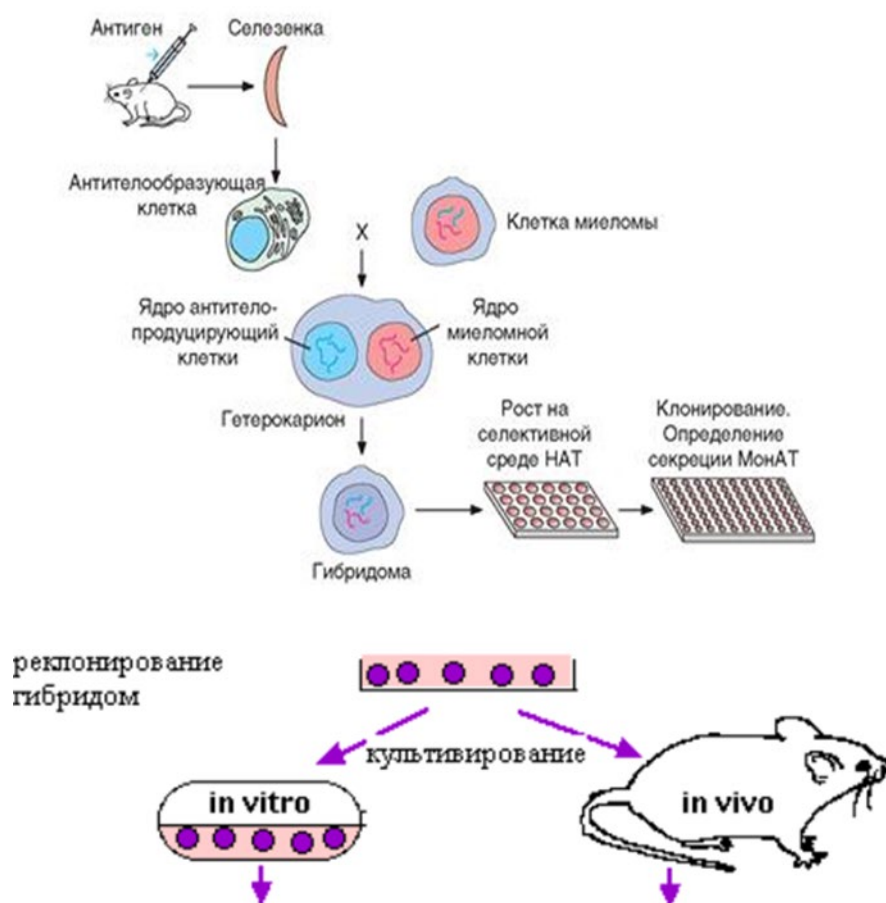


Рисунок 2.4. Схема получения моноклональных антител

Протокол получения моноклональных антител включает в себя следующие этапы:

1. иммунизация животных;
2. подготовка клеток миеломной линии Sp2/0-Ag14 к слиянию;
3. проведение процедуры слияния клеток миеломной линии Sp2/0-Ag14 и В-лимфоцитов селезенки иммунизированной мыши;
4. селекция гибридомных клеток в среде HAT (среда, содержащая гипоксантин - аминоптерин - тимидин);
5. отбор клонов, продуцирующих специфические антитела;
6. клонирование и реклонирование;
7. наработка гибридомных клеток в культуре и *in vivo*;
8. получение культуральной жидкости или асцита, содержащих антитела;

9. выделение моноклональных антител с помощью аффинной хроматографии.

2.6.1 Иммунизация животных

Использовали самок мышей линии Balb/C в возрасте 3-6 мес. В связи с тем, что BDNF мышей и кроликов являются практически идентичны BDNF человека, нами были модифицированы стандартные протоколы иммунизации. Для этого при первой иммунизации в качестве иммуногенного носителя была использована Ni-NT-агароза, в качестве антигена – рекомбинантный BDNF.

Схема иммунизации:

I. Первичная иммунизация

- 50 мкл 50% суспензии Ni-NT-агарозы с иммобилизованным на ней 200 мкг recBDNF в 50 мкл PBS, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда, вводили подкожно в область окологейных лимфатических узлов, подушечки лап, а также лимфатических узлов брюшной цепочки.
- Иммунизацию повторяли на 7 и 14 сутки очищенным препаратом рекомбинантного recBDNF в количестве 20 мкг в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) (в соотношении 1:1) подкожно в область окологейных лимфатических узлов, подушечки лап, а также лимфатических узлов брюшной цепочки.

Затем на следующий день проводили забор крови из хвостовой вены для определения титра анти-BDNF-антител с помощью непрямого ИФА.

II. Реиммунизация

- Высокоочищенный препарат антигена в количестве 20 мкг в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (в соотношении 1:1) вводили подкожно в область

околошейных лимфатических узлов, подушечки лап, а также лимфатических узлов брюшной цепочки.

Через 4 дня после проведения последней инъекции проводили забор крови из хвостовой вены и определяли титр анти-BDNF-антител с помощью непрямого ИФА.

При обнаружении адекватного титра антител за 3-4 дня до извлечения селезенки последнее введение препарата BDNF в количестве 100 мкг осуществляли внутривенно (в PBS, pH 7,3).

2.6.2 Процедура слияния

Перед слиянием миеломные клетки линии Sp2/0-Ag14 культивируют в среде с добавлением 8-азагуанина для удаления тех клеток, которые содержат «нормальный» уровень ГГФРТ (гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза) и способны расти в селективной среде НАТ (среда, содержащая гипоксантин - аминоптерин - тимидин). Через 2 недели проводили смену среды на ростовую (RPMI-1640 с добавлением 10 % бычьей фетальной сыворотки) для наращивания клеточной массы. Концентрация клеток в культуре составляла от 10^5 до 10^6 в 1 мл. Затем проводили трехкратную отмывку клеток Sp2/0-Ag14 центрифугированием (1000 g, 4 минуты) в среде RPMI-1640.

Проведение процедуры слияния осуществляли в стерильных условиях. Иммунизированную мышь забивали путем декапитации, выделяли селезенку и помещали в чашку Петри с охлажденной средой RPMI-1640. Селезенку измельчали скальпелем на кусочки размером 2-3 мм, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе со средой RPMI-1640. Образовавшийся гомогенат центрифугировали (1000 g, 4 минуты), осадок ресуспендировали в 5 мл холодной среды RPMI-1640. Затем клетки центрифугировали (1000 g, 10 минут), ресуспендировали, производили подсчет и оценивали жизнеспособность.

Подготовленные клетки линии Sp2/0-Ag14 смешивали с клетками селезенки (соотношение клеток линии Sp2/0-Ag14 к спленоцитам мыши составляло 3:1), промывали в ростовой среде и осуществляли процедуру слияния.

К смеси клеток при постоянном перемешивании в течение 60 секунд по каплям добавляли 1,0 мл раствора «PEG/DMSO Hybri-Max» (Sigma). После чего клетки инкубировали в течение 90 секунд. К полученной суспензии в течение 5 минут по каплям добавляли 10 мл среды RPMI-1640 без сыворотки, затем в течение 2 минут – 10 мл этой же среды, затем по каплям доводили общий объем до 50,0 мл этой же средой. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 30 мл ростовой среды DMEM с добавлением 20 % фетальной бычьей сыворотки.

После чего клетки высевали в лунки культуральных планшетов (Costar), по 50 мкл в каждую лунку, добавляли по 50 мкл селективной среды НАТ (Gibco), приготовленной на основе коммерческой ростовой среды DMEM с добавлением тимидина (16 мМ), гипоксантина (0,1 мМ), аминоптерина (0,8 мкМ), а также содержащей 20 % фетальной бычьей сыворотки, и помещали в CO₂-инкубатор. Среда НАТ является селективной по отношению к гибридным клеткам. При этом образовавшиеся гибридомы сохраняют жизнеспособность в силу особенностей метаболизма, обусловленных родительскими предшественниками, но неслившиеся клетки такими свойствами не обладают, в результате чего происходит их массовая гибель.

Клетки культивировали в селективной среде в течение 14 дней, постепенно заменяя селективную среду НАТ на ростовую среду (RPMI, 10% FBS, GlutaMax, с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco). Первую смену селективной среды проводили на 5 сутки. Далее замену осуществляли по мере ее кондиционирования и закисления. При активной пролиферации гибридомных клеток ростовую среду меняли раз в два дня.

2.6.3 Процедура клонирования

Клоны появлялись на 11-12 сутки культивирования. Выявление клонов, продуцирующих специфические анти-recBDNF-антитела, осуществляли дважды непрямым ИФА. Клоны, которые проявляли максимальную секреторную способность, отбирали для последующего реклонирования, которое проводили 3-4 раза. Для клонирования клетки высаживали в 96-луночные планшеты в ростовую среду с предварительно подготовленным фидерным слоем (перитонеальные макрофаги), так как фидерные клетки адаптируют ростовую среду, секретируя ростовые факторы, а также элиминируют дебрис и токсичные вещества, способствуя пролиферации гибридных клеток.

Для выделения перитонеальных макрофагов, мышь забивали путем дислокации позвонков шейного отдела, для проведения асептики помещали в 96° спирт на 5 минут. Продольным разрезом вскрывали кожу на животе и отделяли ее от брюшных мышц, затем продольным разрезом вскрывали брюшную полость. Брюшную полость 2-3 раза промывали в ростовой среде RPMI-1640, после чего клетки переносили в лунки 96-луночного планшета в объеме 100 мкл на лунку и культивировали в течение 3 суток.

Для проведения клонирования гибридные клетки суспендировали в лунках и проводили расчет концентрации клеток. Гибридомы высаживали в лунки 96-луночного планшета с фидерным слоем из расчета 1 клетка на лунку. При выявлении активно растущих клонов проводили скрининг супернатантов с помощью непрямого ИФА. Для получения адекватных результатов клонирования, проводили минимум 3-4 процедуры реклонирования. Скрининг секреторной способности таких клонов с помощью непрямого ИФА выявлял наиболее стабильно продуцирующие антитела клоны. По результатам скрининга были выбраны 3 клон гибридных клеток, которые нарастили в ростовой среде.

Затем часть клеток заморозили в среде для заморозки «Recovery Cell Culture Freezing Medium» (Gibco) при температуре -70°C по 5×10^6 клеток на ампулу и

хранили в жидком азоте, а другая часть была использована для наработки моноклональных антител.

Для криоконсервирования гибридной линии клетки предварительно наращивали до 5-10 млн клеток в ростовой среде. Затем клетки суспендировали в лунке и отмывали от ростовой среды при помощи центрифугирования (1000 g, 4 мин). К клеточному осадку добавляли 1-3 мл среды для заморозки Recovery Cell Culture Freezing Medium» (Gibco), ресуспендировали и переносили в криопробирки (Corning), после чего замораживали в емкости с изопропиловым спиртом в низкотемпературном холодильнике -80°C (Sanyo). На следующий день переносили пробирки в жидкий азот (-195°C).

При размораживании клеток пробирки нагревали на водяной бане (+37°C) и отмывали от среды для заморозки добавлением ростовой среды и последующим центрифугированием. Затем высаживали на 96-ти луночные планшеты в ростовой среде, сохраняя высокую плотность клеток в лунках.

2.6.4 Нарработка моноклональных антител

Стандартным способом получения большого количества моноклональных антител является введение гибридных клеток интраперитонеально мышам с целью получения асцитической жидкости (Nakamura R. M., 1983).

Для этого гибридные клетки в количестве $1-5 \times 10^6$ вводили мышам (5 шт.) через 5 дней после интраперитонеальной инъекции 0,5 мл пристана (2,6,10,14 тетраметилпентадекан) (Sigma). Непосредственно перед введением в брюшную полость, гибридные клетки отмывали от ростовой среды методом центрифугирования (1000 g, 5 минут), после чего клеточный осадок ресуспендировали в PBS. Асцитическую жидкость в виде серозного или серозно-геморрагического выпота получали спустя 10-14 дней после инъекции, затем ее центрифугировали (1500 g, 10 минут) и отбирали супернатант, содержащий анти-BDNF-антитела, для тестирования методом непрямого ИФА, клеточный осадок

замораживали в среде для заморозки или вводили интраперитонеально мышам для дальнейшей наработки асцитов.

Другим способом получения моноклональных антител в большом количестве было культивирование гибридных клеток в бессывороточной среде (PFHM-II с добавлением антибиотика-антимикотика, Gibco) в суспензии. Для этого гибридные клетки отобранных клонов в количестве 14×10^6 отмывались от ростовой среды центрифугированием (1000 g, 4 мин) и переносились в культуральные колбы (50 мл, Eppendorf, 20 мл бессывороточной среды). На 5-7 день проводился непрямой ИФА для оценки продукции моноклональных антител, затем супернатант отбирали, концентрировали с использованием центрифужных концентраторов с диаметром пор 100 кДа (5000 g 15 мин) и использовали для выделения чистых антител. Клеточный осадок вводили мышам интраперитонеально с целью получения асцитической жидкости.

2.6.5 Очистка моноклональных антител методом аффинной хроматографии

Аффинная хроматография основана на обратимой биоспецифической адсорбции, осуществляемой за счет взаимодействия между молекулами, закрепленными на матрице, и комплементарными к ним белками, подлежащими разделению. Одним из таких молекул-лигандов является стафилококковый протеин А, его взаимодействие с иммуноглобулинами класса G (IgG) было исследовано при разработке аффинной системы для выделения данных иммуноглобулинов из сыворотки крови (Duhamel R.C., 1979). Протеин А может быть ковалентно связан с природной (агарозой или целлюлозой) или синтетической (поливиниловый эфир, полистирол-дивинилбензол, поровое стекло или полиметакрилат) базовой матрицей, и на сегодняшний момент хроматография на протеин-А-агарозе является широко распространенным способом выделения и очистки антител (IgG), обеспечивая исключительную селективность, особенно в отношении моноклональных антител. Для проведения процедуры очистки

фракционируемая смесь наносится в условиях нейтрального pH, а элюция продукта достигается за счет снижения pH подвижной фазы.

Для получения чистого препарата моноклональных антител из супернатантов клеточных культур после 5-7 дней *in vitro* и асцитов использовали аффинную хроматографию на протеин А-агарозе (Invitrogen). Работу проводили на хроматографической системе BioLogic LP System (Biorad) при +4°C. Асцит и супернатант с клеточных культур центрифугировали при 5000g в течение 10 мин и фильтровали (0,22 мкм). Далее растворы наносили на колонку (объем колонки – 12 мл) с протеин А-агарозой (объем носителя – 4 мл) и оставляли на рециркуляцию в течение 1 часа со скоростью 10-20 мл/ч. После чего колонку последовательно промывали фосфатным буфером (PBS, pH 7,4) по 30-40 мин со скоростью 30 мл/ч. Элюирование связавшихся с носителем антител проводили цитратным буфером (100 mM цитрата Na, pH 3.0) со скоростью 40 мл/ч, затем проводили обессаливание на колонке с помощью гель-фильтрации. Препараты антител концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 100 кДа до 2 мг/мл, разделяли на аликвоты и хранили с добавлением 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) при +4°C. Для длительного хранения использовали криоконсервирование в 50% глицерине с добавлением 0,01% азида натрия при -20°C.

Полученные моноклональные антитела к recBDNF были исследованы с помощью методов иммуноблота, ИФА, аналитического электрофореза, иммуногисто- и цитохимии с целью выявления специфического связывания с нативным антигеном, а также их применяли для разработки тест-системы иммуноферментного анализа.

2.7 Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

Определение класса моноклональных антител

Определение класса моноклональных анти-BDNF-антител проводили методом диск-электрофореза в ПААГ по стандартной методике (см. раздел 3.4.9).

Этот метод применим, так как известны молекулярные массы данных молекул, состоящие из двух тяжелых длинных (мол. масса ~ 150 кДа) и двух коротких легких (мол. масса ~ 50 кДа) цепей, которые соединены друг с другом дисульфидными или водородными связями (рисунок 2.5).

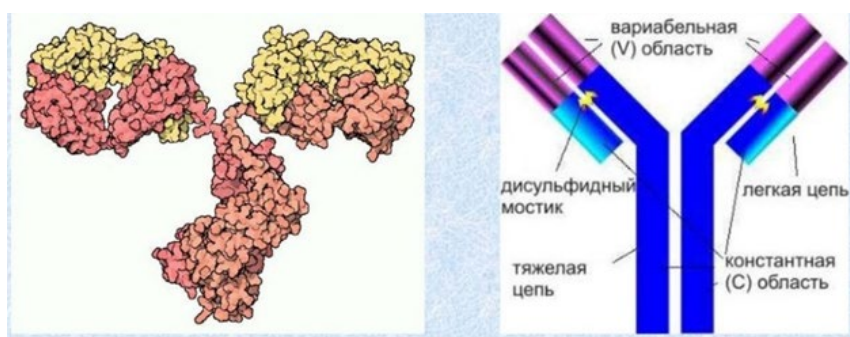


Рисунок 2.5. Структура иммуноглобулинов класса G.

Определение константы аффинности моноклональных антител

Константу аффинности антител при связывании с рекомбинантным BDNF определяли согласно методу, разработанному Beatty с коллегами и дополненному Loomans с соавторами (Beatty J. D., 1987; Loomans E. E., 1995), при этом расчет константы аффинности моноклональных антител проводили с использованием формулы (1), которая основана на концентрации антител при OD50 ($[Ab']$ и $[Ab]$) для лунок, покрытых двумя концентрациями антигена, одна из которых ($[Ag']$) является половиной другой ($[Ag]$). Формула (2) представляет собой общую формулу, полученную из формулы (1), если используются различные концентрации $[Ag]$ ($[Ag] = n [Ag']$), одна из которых равна половине другой (например, $Ag = 2Ag' = 4Ag' = 8 Ag'$).

$$(1) K_{aff} = 1/2(2[Ab']_t - [Ab]_t)$$

$$(2) K_{aff} = (n-1)/2(n[Ab']_t - [Ab]_t), \text{ где } n = [Ag] / [Ag'].$$

Определение кросс-реактивности моноклональных антител

Известно, что нейротрофины (фактор роста нервов, NGF; нейротрофический фактор мозга, BDNF; нейротрофин 3, NT3; и нейротрофин 4, NT4) представляют собой димерные молекулы, которые имеют примерно 50% гомологии аминокислотных последовательностей (Bothwell M., 2014). Поэтому необходимо было провести анализ специфичности полученных антител по возможности связываться с BDNF, но не другими нейротрофинами (NGF, NT-3). Для этого с препаратом recBDNF и коммерческими препаратами NGF (Invitrogen, A42578, Human Recombinant Protein) и NT-3 (Gibco, PHC7036, Human Recombinant Protein) был проведен аналитический электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблотом по стандартной методике (см. раздел 3.4.4).

2.8 Иммуноморфологический анализ

В основе методов иммуноморфологического анализа лежит использование специфических к антигену моно- или поликлональных антител для выявления локализации антигена в культурах клеток и на срезах органов. Метод представляет собой последовательную фиксацию, отмывку, инкубацию с первичными антителами, анти-видоспецифичными (в зависимости от источника первых антител) вторичными антителами. Вторичные антитела могут быть конъюгированы с флуоресцентной меткой, и тогда результат анализируется методами флуоресцентной микроскопии, или конъюгированы с пероксидазой, тогда проявление осуществляется с помощью хромогенных субстратов (Davey F. R., 1970). В последнее время часто используется конъюгат вторичных антител с биотином, при этом появляется дополнительный этап инкубирования - с авидин-пероксидазным комплексом.

2.8.1 Иммуногистохимический анализ

Для подтверждения взаимодействия моноклональных и поликлональных антител к рекомбинантному recBDNF с нативным антигеном и специфичности этих антител проводили иммуногистохимический анализ срезов гиппокампа крысы (2 мес. Wistar). Для приготовления срезов проводили перфузию сосудистого русла крыс 4 % раствором параформальдегида, приготовленном на PBS. Образцы мозга инкубировали в том же фиксаторе в течение суток, после чего готовили серийные срезы на замораживающем микротоме (MNT «Slee», Германия) толщиной 30 мкм. Для блокирования эндогенной пероксидазной активности выдерживали срезы в 3% H_2O_2 в течение 10 мин. Затем промывали трехкратно промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4) по 5 мин на шейкере. Для подавления неспецифического связывания срезы инкубировали в PBS (pH 7.4), содержащем 3% БСА, в течение 1 ч. Моноклональные и поликлональные анти-BDNF-антитела вносили в разведении 1:200 в буфере (PBS, 1% БСА pH 7.4) и инкубировали 12 часов при 4°C. В качестве отрицательного контроля использовали буфер без первичных антител. Затем промывали трехкратно промывочным буфером (PBS, 0.05% Твин-20 pH 7.4) по 5 мин на шейкере и инкубировали с кроличьими антителами к мышиным IgG и антителами козы к кроличьим IgG, конъюгированными с пероксидазой в течение 1 ч. После промывки для проявления иммунопероксидазной активности срезы вносили в субстратный буфер, который готовили непосредственно перед проявлением (DAB Peroxidase Substrate, Vector Labs). Окрашенные срезы монтировали на стекла и заключали в бальзам. Микроскопирование полученных срезов проводили с помощью микроскопа Leica. Документация результатов проводилась путем автоматического компьютерного сканирования изображений.

2.8.2 Иммуноцитохимический анализ

Для выявления специфичности поли –и моноклональных антител к recBDNF по связыванию с нативным BDNF было проведено исследование культур

эмбриональных астроцитов человека иммуноцитохимическим методом. Для этого культуры астроцитов отмывали от ростовой среды стерильным раствором Хенкса (Gibco), фиксировали 4 % раствором параформальдегида в течение 30 минут. После этого препарат отмывали рабочим буфером (PBS, pH 7.4 с добавлением Твина-20 до 0,5%). После отмывки, для предотвращения неспецифического связывания, препарат астроцитов обрабатывали 0,5 % раствором БСА, инкубируя в течение 30 минут при комнатной температуре на роторной мешалке. Последующую отмывку препарата рабочим буфером повторяли трижды.

На следующем этапе на препарат астроцитов наслаивали поли- и моноклональные анти-гесBDNF-антитела, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на роторной мешалке и трехкратно отмывали рабочим буфером.

После отмывки в препарат культуры астроцитов добавляли коммерческие антитела к иммуноглобулинам мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой (ThermoFisher), и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на роторной мешалке. Последующую отмывку препарата культуры астроцитов также проводили рабочим буфером.

Для проявления иммунопероксидазной активности клеточные препараты вносили в субстратный буфер, который готовили непосредственно перед проявлением (DAB Peroxidase Substrate, Vector Labs). Окрашенные препараты монтировали на стекла и заключали в бальзам. Микроскопирование проводили с помощью микроскопа Leica. Документация результатов проводилась путем автоматического компьютерного сканирования изображений.

2.9 Иммуноферментный анализ

В настоящее время разработаны различные варианты твердофазного иммуноферментного анализа:

1. Прямой ИФА. На первом этапе реакции исследуемый образец фиксируют на твердой фазе. Затем к нему добавляют конъюгат. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой прямо пропорциональна содержанию исследуемых антигенов в образце и вообще говорит об их наличии в исследуемом материале.
2. Непрямой ИФА. На твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом к IgG. После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов.
3. Сэндвич-метод. Общая схема проведения метода заключается в следующем. На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса «антитело — антиген» проводится удаление несвязавшихся компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата.
4. Конкурентный метод. К антигену, иммобилизованному на твердой фазе одновременно добавляют исследуемый материал и конъюгат. При проведении реакции меченые и исследуемые антитела конкурируют за активные центры антигена, иммобилизованного на твердой фазе. После завершения инкубации и удаления не прореагировавших компонентов проводится ферментативная реакция, результаты которой обратно пропорциональны количеству антител в исследуемом образце.

5. Ингибирующий ИФА. На полистироловом шарике адсорбирован стандартный АГ, после инкубации с исследуемым материалом и удаления непрореагировавших компонентов добавляется АГ, меченный ферментом, который взаимодействует со свободными центрами связывания антител, провзаимодействовавшими с антигеном, сорбированным на твердой фазе. При наличии антител в исследуемой пробе уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных контрольных образцов.

В соответствии с поставленными целью и задачами работы применяли твердофазные непрямой и сэндвич-вариант ИФА. В качестве твердой матрицы использовали 96-луночные полистирольные планшеты (Greiner Bio-one).

Непрямой иммуноферментный анализ проводили для определения наличия специфических поликлональных антител в сыворотке иммунизированного животного, при получении чистых препаратов поликлональных антител и при биотинилировании этих антител, а также моноклональных антител в культуральной жидкости при проведении процедур клонирования, реклонирования, наработке моноклональных антител в суспензионных культурах и для оценки специфичности антител при их выделении из асцитической жидкости.

Непрямой иммуноферментный анализ

Схема анализа приведена на рисунке 2.6.

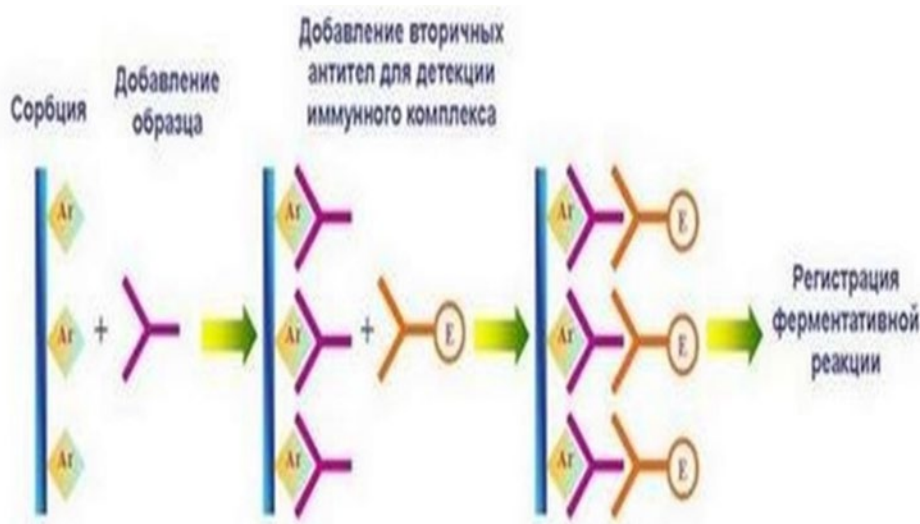


Рисунок 2.6. Схема непрямого иммуноферментного анализа

Адсорбцию рекомбинантного *ресBDNF* в концентрации 10 мкг/мл в бикарбонатном буфере (0,1 М NaHCO_3 , pH 9.2) на поверхности лунок планшета («активацию») проводили в течение 12 часов при 4°C, после чего их раствор удаляли и планшеты промывали промывочным буферным раствором (PBS, 0.05% Твин-20, pH 7.4). Здесь и далее промывку осуществляли на автоматическом вошере PW-40 (Bio-Rad). После промывки в лунки вносили по 100 мкл исследуемых образцов, содержащих моноклональные антитела или поликлональные антитела. Эти растворы оставляли в лунках на 2 часа при комнатной температуре. За это время происходило связывание антител с адсорбированным антигеном. Несвязавшиеся белки отмывались тем же промывочным буфером, и лунки заполнялись кроличьими антителами к мышинным IgG, конъюгированными с пероксидазой (Thermo FS) или антителами козы к кроличьим IgG, также конъюгированными с пероксидазой (Thermo FS). Инкубацию с антителами проводили в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего несвязавшиеся антитела тщательно отмывали тем же буфером.

Проявление ферментативной активности пероксидазы проводили с использованием раствора хромогенного субстрата ТМБ (Amresco) в течение 5-15 мин. Затем ферментативную реакцию останавливали внесением раствора 1М

H₂SO₄. Считывание результатов проводили с помощью фотометра i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 450 нм.

2.10 Разработка тест-системы иммуноферментного анализа для количественного определения BDNF

На сегодняшний момент известно, что в сыворотке крови здорового человека концентрация BDNF исчисляется в значениях порядка 10^3 - 10^4 пкг/мл (Radka S. F., 1996). При исследованиях сывороток крови пациентов с различными психическими заболеваниями обнаружено снижение содержания BDNF (Wu Z. W., 2020). Для определения BDNF в периферической крови использовали различные методы измерения (Tesch S. P., 2013). В большинстве исследований, проводимых на людях, применяли коммерческие наборы ELISA для количественного определения уровня BDNF в крови пациентов с различными психическими заболеваниями, при этом во многих таких наборах концентрации стандартного антигена были в диапазонах от 1000 до 10 пг/мл. Поэтому экспериментальный подбор оптимальных концентраций стандартных проб с заданной концентрацией антигена для построения калибровочной кривой осуществляли в диапазоне концентраций рекомбинантного recBDNF от 1500 до 10 пг/мл.

Разработанная тест-система представляет собой сэндвич-вариант ИФА, где на дне лунок планшета адсорбированы полученные моноклональные анти-BDNF антитела, вторичными антителами являются биотинилированные поликлональные анти-BDNF антитела, в качестве стандарта для построения калибровочных кривых используется рекомбинантный recBDNF (рисунок 2.7).

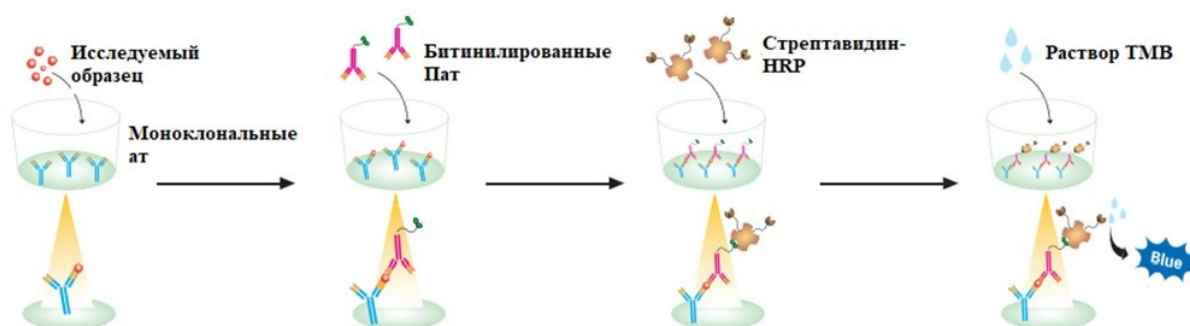


Рисунок 2.7. Схема разработанной тест-системы иммуноферментного анализа.

При разработке тест-системы необходимо было подобрать оптимальные условия – разведения полиκлональных антител и исследуемых сывороток. Для этого подготавливали раствор моноκлональных антител на бикарбонатном буфере (0,1 М NaHCO_3 , pH 9.2) (концентрация 10 мкг/мл). Адсорбцию этих антител на поверхности лунок планшета проводили в течение 12 часов при $+4^\circ\text{C}$, после чего их раствор удаляли и планшеты промывали промывочным буферным раствором (PBS, 0.05% Твин-20, pH 7.4). Здесь и далее промывку осуществляли на автоматическом вошере PW-40 (Bio-Rad). После промывки и блокирования неспецифического связывания (100 мкл на лунку 3% раствора БСА на PBS в течение 1 часа при комнатной температуре) в лунки вносили по 100 мкл стандартных проб с известной концентрацией антигена на 2 часа при комнатной температуре (концентрация recBDNF от 1500 до 10 пг/мл). После промывки лунки заполняли биотинилированными полиκлональными анти-BDNF антителами по 100 мкл в разведениях от 1:5000 до 1:40000 на 1 час при комнатной температуре (рисунок 2.8).

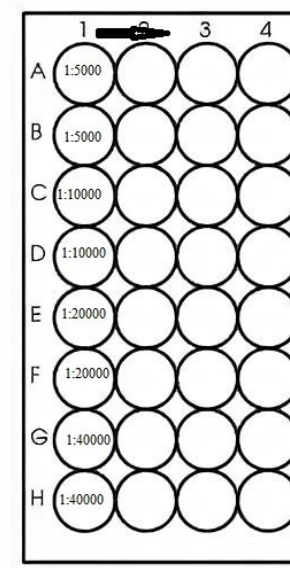


Рисунок 2.8. Схема титрования поликлональных антител (стрелкой обозначено направление титрования стандартного антигена).

Затем лунки заполняли раствором стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (HRP-Conjugated Streptavidin, Thermo Scientific, разведение 1:5000), и инкубировали 0,5 ч при комнатной температуре. После промывки проводили проявление ферментативной активности пероксидазы с помощью раствора хромогенного субстрата ТМБ (Amresco) в течение 15-20 мин. Затем ферментативную реакцию останавливали внесением раствора 1M H_2SO_4 . Считывание результатов проводили с помощью фотометра i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 450 нм.

Затем проводили подбор оптимальных разведений сывороток крови, для чего также иммобилизовали моноклональные антитела на дне лунок 96-луночного планшета (10 мкг/мл в бикарбонатном буфере) в течение 12 часов при +4°C. После промывки и блокирования неспецифического связывания (100 мкл на лунку 3% раствора БСА на PBS в течение 1 часа при комнатной температуре) в лунки вносили по 100 мкл 6 исследуемых образцов (сыворотки крови условно здоровых доноров) в разведениях от 1:2 до 1:2048 в 1% растворе БСА на PBS, инкубацию продолжали 2 часа при комнатной температуре. После промывки лунки заполняли

биотинилированными поликлональными анти-BDNF антителами по 100 мкл в разведении 1:10 000 на 1 час при комнатной температуре. После промывки лунки заполняли раствором стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (HRP-Conjugated Streptavidin, Thermo Scientific, разведение 1:5000), и инкубировали 0,5 ч при комнатной температуре. После промывки проводили проявление ферментативной активности пероксидазы с помощью раствора хромогенного субстрата ТМБ (Amresco) в течение 15-20 мин. Затем ферментативную реакцию останавливали внесением раствора 1М H₂SO₄. Считывание результатов проводили с помощью фотометра i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 450 нм.

Характеристики тест-системы иммуноферментного анализа BDNF

Для успешного использования разработанной тест-системы в практических целях необходимо добиться максимальной воспроизводимости получаемых результатов, а также охарактеризовать ее чувствительность, качество, надежность и специфичность.

Понятие качества иммуноферментной тест-системы является несколько общим и относится к стабильности аналитической системы (в первую очередь калибровочного графика), повышение которой достигается обязательным включением определенного диапазона стандартных образцов в исследуемую группу препаратов при каждой постановке иммуноферментного анализа.

Для определения численных концентраций искомых антигенов тест-система должна располагать калибровочными растворами (от 3 до 10 точек), содержащими известные нарастающие концентрации искомого вещества, а регистрация результатов, в нашем случае, должна проводиться в единицах оптической плотности, измеряемых спектрофотометрически. В диапазонах прямолинейности калибровочной кривой возможно определение искомых концентраций в исследуемых биопробах.

По результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигенов в стандартных пробах строили калибровочные кривые, которые использовали в дальнейшей работе для определения концентраций BDNF в исследуемых образцах сывороток крови.

Для определения точности и воспроизводимости калибровочной кривой иммуноферментного определения BDNF калибровали стандартный антиген в разведениях от 1500 до 10 пг/мл, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Исследования проводили в разное время, при постановке ИФА, одним и тем же исследователем в одинаковых условиях: времени инкубации, температура.

Чувствительность тест-системы зависит от аффинности и авидности взаимодействия используемых антител с используемым антигеном, от других реагентов, включенных в систему, от времени и температуры инкубаций. Обычно рассчитывается как минимальная концентрация искомого вещества в пробе, определяемая данным анализом и вычисляется как значение, которое выше среднего значения стандарта минимальной концентрации на 3 стандартных отклонения ± 2 стандартных отклонения.

Специфичность тест-системы — это ее способность выявлять в анализируемых смесях только то вещество, для определения которого эта система разрабатывалась. Для определения специфичности антител использовали иммуногисто- и иммуноцитохимические методы, а также аналитический электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблотом для подтверждения отсутствия перекрестной реакции с другими нейротрофинами.

Точность — это степень воспроизводимости теста ИФА, т.е. способность давать одинаковый ответ при повторном анализе той же самой пробы. При проверке на точность оценивали воспроизводимость результатов анализа на различных уровнях концентраций стандартного антигена при использовании стандартных реактивов, при этом качество тест-системы признавали

удовлетворительным, если коэффициент вариации для каждого уровня концентрации не превышал 10%.

Воспроизводимость выражается величиной, обратной коэффициенту вариации результатов. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость.

2.11 Статистический анализ

Статистический анализ данных и построение графиков проводили в программе PRISM 8.0 и Microsoft Excel 2016.

При оценке параметров валидации разработанной тест-системы ИФА рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал, прецизионность (характеризовалась коэффициентом вариации в %). Исследования проводили в разное время, при постановке ИФА, одним и тем же исследователем в одинаковых условиях: времени инкубации, температура (т.е. при статистическом анализе использовали 5 разных результатов ИФА).

Результаты количественного иммуноферментного анализа BDNF в сыворотках крови пациентов и контрольной группы представляли как медианы и межквартильные интервалы. В работе использовали следующие статистические тесты: непарный t-тест, непараметрический тест Манна-Уитни, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна. Статистический тест указан в подписях к рисункам.

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1 Получение штамма-продуцента *ресBDNF*

При амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелую форму BDNF, из кДНК библиотеки человека, были использованы праймеры, содержащие сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции NcoI и XhoI. После лигирования очищенного ампликона BDNF в вектор pET32a, посева на селективную среду и появления колоний было отобрано 10 случайных колоний трансформантов, которые были проверены на наличие вставки. Несколько колоний были отобраны для выделения плазмидной ДНК с целью последующего рестрикционного анализа методом электрофореза в агарозном геле, который выявил образцы, содержавшие вставки ожидаемого размера – 375 п.н. (рисунок 3.1).

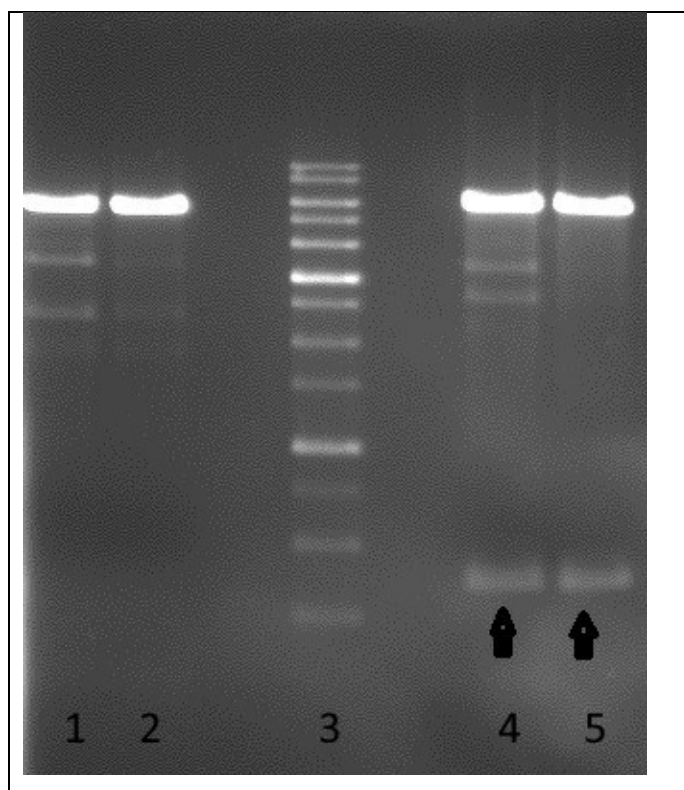


Рисунок 3.1. Результаты рестрикционного анализа плазмид (pET32a-BDNF).

3 - маркеры мол. массы (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, 1 kb),

1, 2, 4, 5 - плазмидные ДНК из рекомбинантных клонов (стрелками указаны вставки с ожидаемой молекулярной массой – 375 п.н.).

3.2 Культивирование штамма-продуцента *E.coli* и анализ интенсивности экспрессии рекомбинантного белка

После наращивания штамма-продуцента до $OD_{600} = 0,5 - 0,6$, добавляли ИПТГ и продолжали культивирование в течение 3 часов. Перед индукцией отбирали 0,5 мл неиндуцированной культуры для анализа. После индукции экспрессии пробы из каждой культуры отбирали через час по 0,5 мл для дальнейшего электрофореза.

При анализе эффективности экспрессии методом СДС-электрофореза в ПААГ был выявлен факт активного накопления продукта в первые 3 часа после индукции (рисунок 3.2). Дальнейшее культивирование не приводило к увеличению выхода

рекомбинантного recBDNF. При этом из 1 л индуцированной культуры штамма-продуцента *E. coli*, в среднем, можно выделить около 1,5 мг рекомбинантного белка.

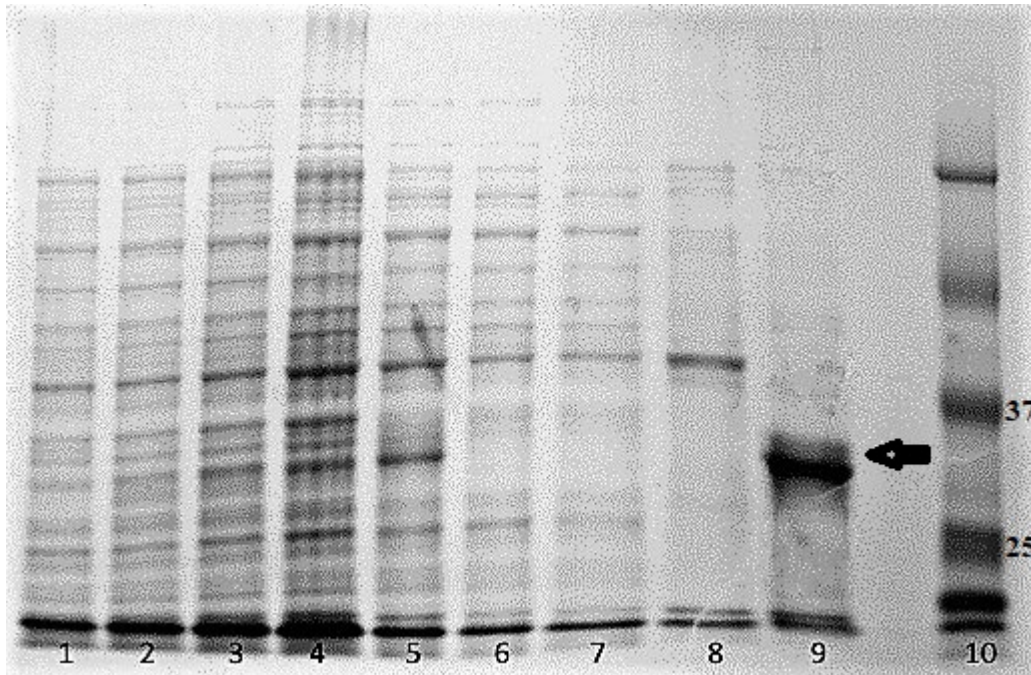


Рисунок 3.2. Электрофоретический анализ тотального белка из штамма-продуцента BDNF.

1. неиндуцированная культура
2. 1 час после индукции
3. 2 часа после индукции
4. 3 часа после индукции
5. Лизат индуцированной культуры
6. Проскок с Ni-NTA агарозы
7. Промывка 1 (pH=8,0)
8. Промывка 2 (pH=6,3)
9. Элюат (стрелкой обозначен recBDNF)
10. Маркеры молекулярных масс (кДа)

3.3 Препаративное выделение рекомбинантного recBDNF

Выделение рекомбинантного BDNF осуществляли по стандартным протоколам с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Затем белок концентрировали с помощью центрифужных концентраторов с диаметром

пор 10 кДа до концентрации 5 мг/мл. Полученные препараты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблот-анализа.

После металло-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, был проведен электрофоретический анализ элюатов, который выявил бенды с молекулярной массой около 32 кДа, что соответствует ожидаемой массе, так как рекомбинантный BDNF представляет собой белок слияния, состоящий из аминокислотной последовательности тиоредоксина, сайта распознавания тромбина, сайта распознавания энтерокиназы, последовательности зрелой формы BDNF и гексогистидинового тега на конце. Иммунохимическая идентификация данного белка подтверждена результатами иммуноблота с коммерческими анти-BDNF-антителами (рисунок 3.3).

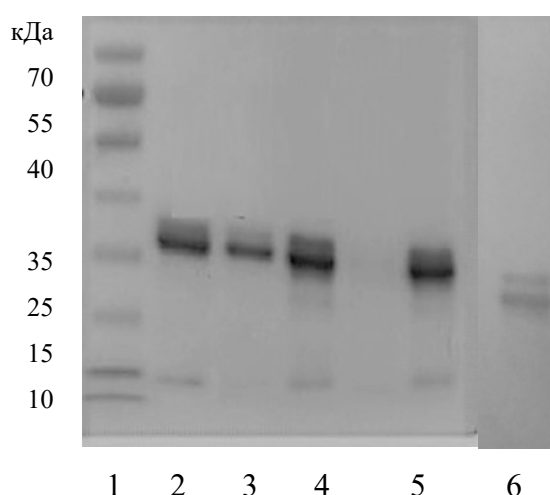


Рисунок 3.3. Электрофоретический анализ элюатов после проведения металло-хелатной хроматографии с последующим иммуноблотом.

- 1 – маркеры молекулярной массы (ThermoFisher, США)
- 2-5 – препараты рекомбинантного BDNF после хроматографии.
- 6 – иммуноблот с анти-BDNF-антителами (Abcam, США)

Анализ чистоты рекомбинантного recBDNF проводили методом диск-электрофореза с последующей денсиметрией полиакриламидных гелей, окрашенных кумасси R-250. Чистота полученного препарата составила более 95%.

Физико-химические характеристики рекомбинантного белка recBDNF:

молекулярная масса – ~ 32 кДа,

содержит 292 аминокислоты,

pI – 6,99,

коэффициент экстинции – 1,13 при 280 нм.

Этот препарат рекомбинантного белка был использован при иммунизации животных для получения полиспецифических сывороток и гибридом, продуцирующих моноклональные антитела.

Для наработки достаточного количества рекомбинантного белка проводили культивирование в 400 мл среды LB с добавлением 8 мл «стоковой» культуры штамма-продуцента и ампициллина в течение 1,5 часов на роторном шейкере (200 об./мин, 37°C), при этом OD₆₀₀ обычно достигала 0,5-0,6, затем проводили индукцию экспрессии добавлением IPTG. Культивирование продолжали в течение 2 часов, затем центрифугировали (3000 g, 20 мин), супернатант отбирали, осадок лизировали 8М мочевиной при постоянном помешивании. После чего проводили хроматографию на Ni-NT-агарозе по протоколу, описанному в разделе 3.4.8.

В нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, были обнаружены 5 видов редких кодонов (таблица 3.1).

ccg agg gga gct gag cgt gtg tga cag tat tag tga gtg ggt aac ggc ggc aga caa aaa gac tgc agt gga cat gtc ggg cgg gac ggt cac agt cct tga aaa ggt ccc tgt atc aaa agg cca act gaa gca ata ctt cta cga gac caa gtg caa tcc cat ggg tta cac aaa aga agg ctg cag ggg cat aga caa aag gca ttg gaa ctc cca gtg ccg aac tac cca gtc gta cgt gcg ggc cct tac cat gga tag caa aaa gag aat tgg ctg gcg att cat aag gat aga cac ttc
--

Таблица 3.1. Нуклеотидная последовательность BDNF (красным выделено редкие кодоны).

Тем не менее экспрессия рекомбинантного белка проходила эффективно и на достаточно высоком уровне, при этом из 1 л индуцированной культуры штамма-продуцента *E. coli* выделяли около 1,5 мг рекомбинантного белка. Полученный препарат recBDNF был использован для выделения поликлональных антител из антисывороток кролика с помощью иммуноаффинной хроматографии на CN-Br-сефарозе, а также как стандартный антиген при разработке тест-системы ИФА.

3.4 Получение поликлональных антител к рекомбинантному белку recBDNF

Получение полиспецифических антисывороток кролика проводили по стандартной методике с некоторыми модификациями протоколов иммунизации (раздел 3.5). После 3хкратной иммунизации проводили непрямой ИФА полученных сывороток кролика. По результатам этого анализа было отобрано 1 животное под номером 4 (рисунок 3.4).



Рисунок 3.4. Результаты ИФА сыворотки крови иммунизированных кроликов.

Кроме того, для подтверждения специфического связывания с нативным BDNF, были проведены иммуногисто- и цитохимические анализы полиспецифической антисыворотки на препаратах гиппокампа и культурах астроцитов (см. раздел 3.6).

Сыворотки, содержащие специфические антитела к BDNF, использовали для получения чистого препарата поликлональных антител. В результате иммуноаффинной хроматографии были получены элюаты поликлональных антител, которые анализировались методом ИФА (рисунок 3.5 А). После концентрирования с помощью центрифугирования концентрация антител составила – 1,6 мг/мл. Затем проводили биотинилирование данных антител, после элюции концентрация составила 1,2 мг/мл (рисунок 3.5 В).

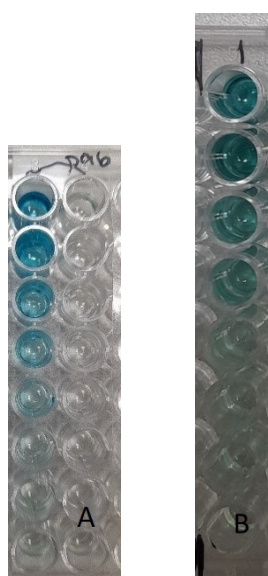


Рисунок 3.5. Результаты ИФА препарата поликлональных антител к recBDNF
А – после иммуноаффинной хроматографии (разведение антител начиналось с 1:5000). В – после биотинилирования (первое разведение составляло 1:5000).

Полученный препарат биотинилированных поликлональных антител к recBDNF использовали при разработке тест-системы ИФА и количественном определении нативного белка в сыворотках крови пациентов и условно здоровых доноров.

3.4 Получение моноклональных антител к рекомбинантному белку recBDNF

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, проводили по методу, предложенному Köhler G. и Milstein C. (Köhler G., 1975) в частичной нашей модификации (Гурина О.И., 2005). Модифицированная схема иммунизации препаратами рекомбинантного белка позволила получить у мышей Balb/c высокий титр специфических антител через два цикла иммунизации (раздел 2.6). Обнаружение специфических анти-BDNF-антител в сыворотке иммунизированных мышей проводили с помощью непрямого ИФА. По его результатам было выбрано одно животное, в сыворотке которого был обнаружен наибольший титр антител – животное №3 (рисунок 3.6).



Рисунок 3.6. Результаты ИФА сыворотки крови иммунизированных мышей.

Принципиальная схема процедуры получения гибридом, продуцирующих моноклональные анти-BDNF-антитела, и выделения антител, представлена на рисунке 2.5 (глава 2).

После слияния и роста в селективной среде НАТ в течение 2 недель, а затем в среде НТ в течение 1 недели, проводили смену среды на ростовую и визуальное наблюдение за растущими гибридами. Первые клоны гибридных клеток появлялись на 10-12 сутки (рисунок 3.7). Тестирование супернатантов из лунок проводили в случаях, когда клон состоял не менее, чем из 150-200 клеток.

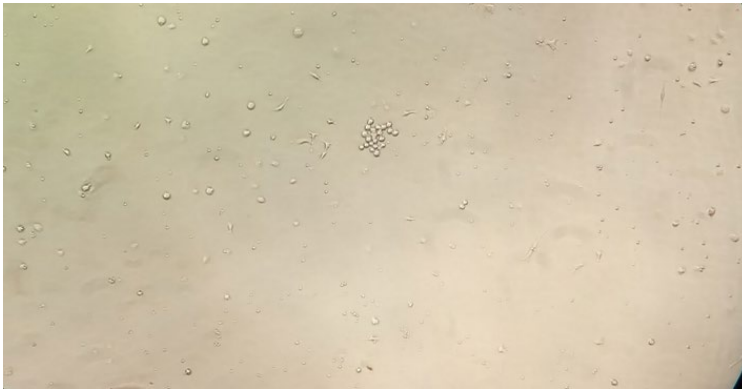


Рисунок 3.7. Начало клонального роста гибридных клеток. Фазово-контрастная микроскопия.

Отбор секретирующих клонов на первом этапе тестирования проводили с помощью непрямого ИФА (рисунок 3.8).

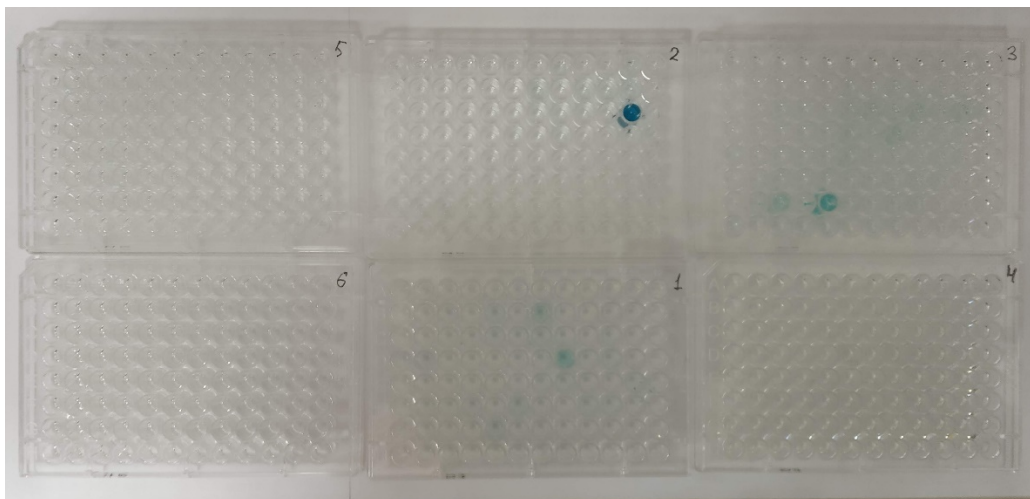


Рисунок 3.8. Результаты ИФА супернатантов среды, в которой культивировали гибридные клетки.

Далее было проведено клонирование гибридомы, секретирующей специфические моноклональные анти-ресBDNF антитела. Рост клеток оценивали визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии (рисунок 3.9).

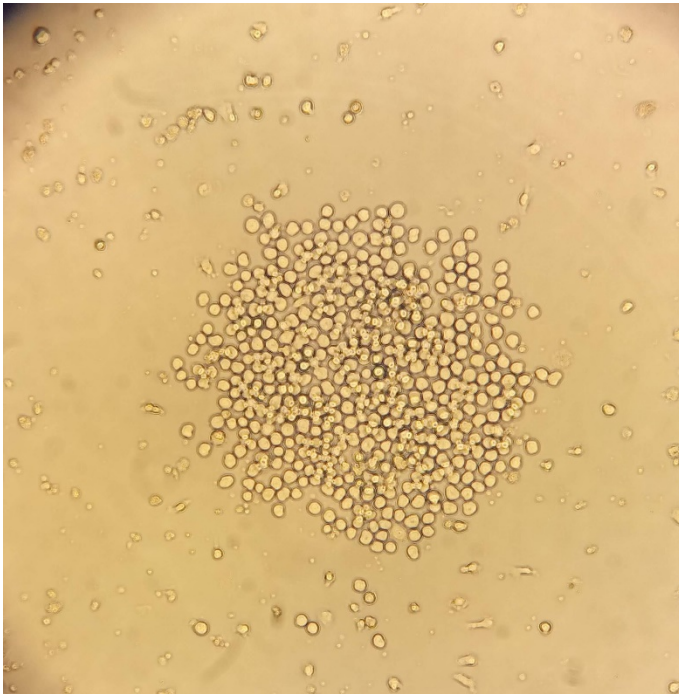


Рисунок 3.9. Гибридомные клетки (образование клона), фазово-контрастная микроскопия.

После образования достаточного количества клональных клеток был проведен непрямой ИФА клеточных супернатантов (рисунок 3.10).

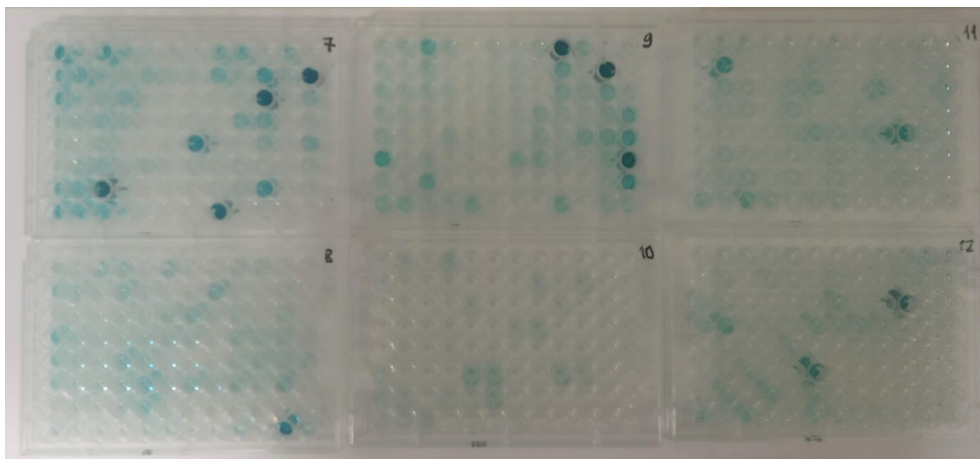


Рисунок 3.10. Результаты ИФА супернатантов среды, в которых культивировали гибридные клетки, после клонирования.

Следующим этапом было реклонирование гибридных клеток, продуцирующих специфические моноклональные антитела, для этого были

отобраны 7 клонов гибридных клеток. Тестирование клеточных супернатантов в динамике проводилось дважды (рисунки 3.11, 3.12). При проведении процедур дальнейшего реклонирования (всего было проведено четыре процедуры), для наращивания клеток отбирали те клоны, которые не только стабильно продуцировали анти-BDNF-антитела, но и в динамике показывали увеличение их концентрации.

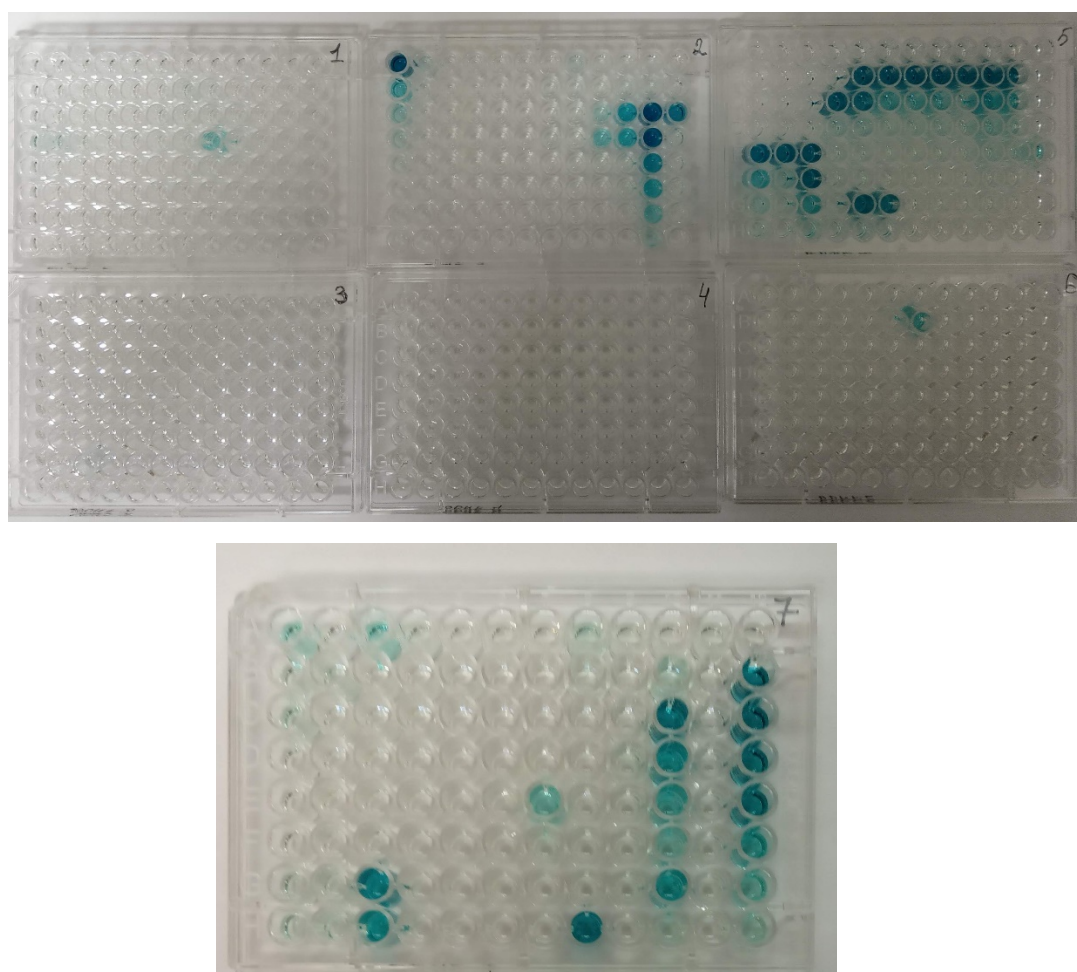


Рисунок 3.11. Результаты ИФА клеточных супернатантов гибридных клонов.

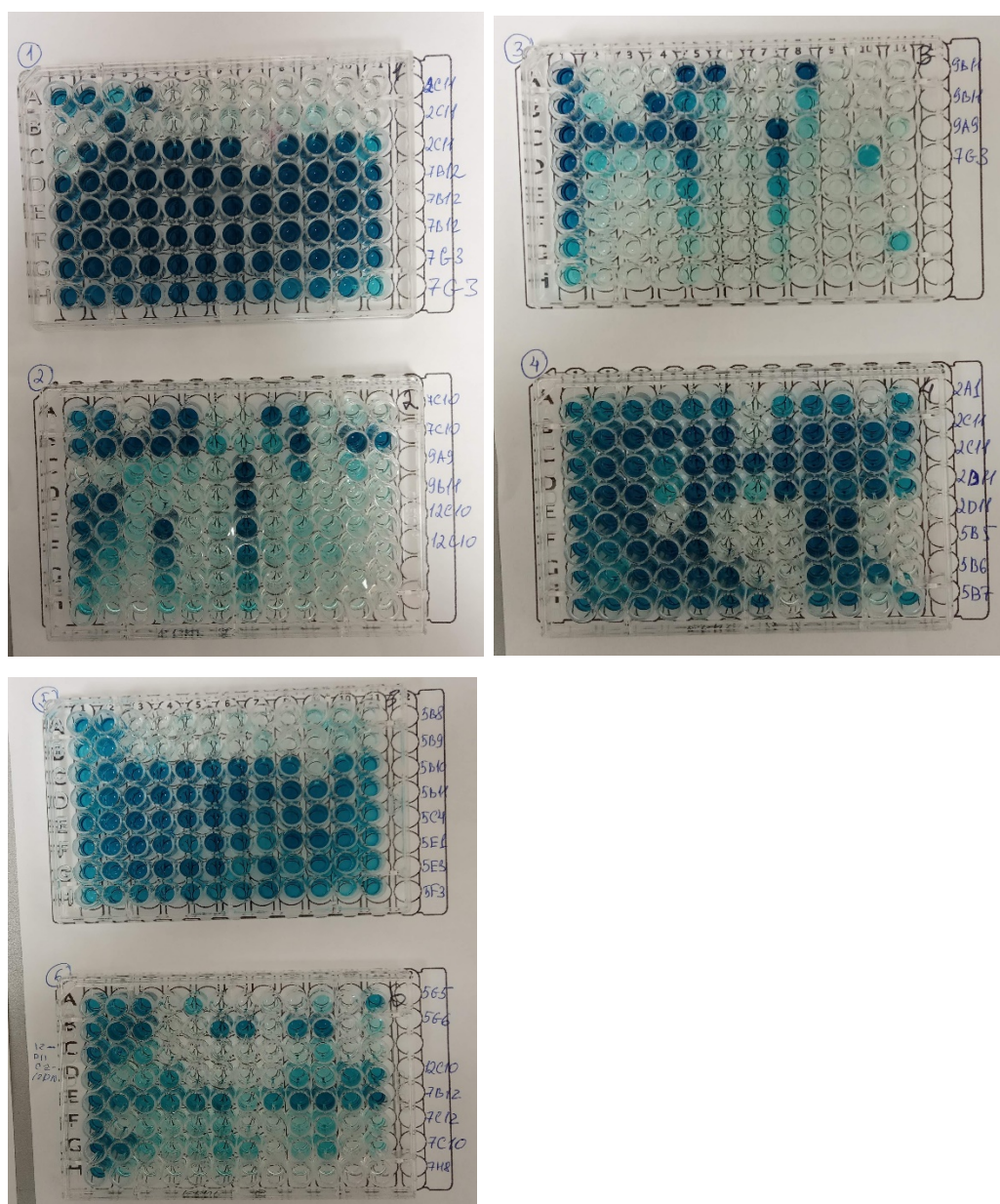


Рисунок 3.12. Результаты ИФА клеточных супернатантов гибридных клонов

После проведения иммуноферментного тестирования и процедур реклонирования, были отобраны 3 гибридомы, которые в динамике стабильно продуцировали анти-BDNF-антитела с увеличением концентрации.

Наращивание клеток от выбранных клонов проводили вначале в 24-луночных планшетах, а затем в культуральных матрасах. Часть гибридных клеток замораживали в среде для заморозки (Gibco) по 5×10^6 кл/мл и хранили в жидком азоте.

Для получения асцита, содержащего анти-BDNF-антитела, гибридомные клетки в количестве 5×10^6 в фосфатно-солевом буфере (PBS) вводили интраперитонеально самкам мышей линии Balb/C. За 5 дней до введения клеток, животным интраперитонеально вводили 0,5 мл пристаана (2,6,10,14-тетраметилпентадекан, Sigma) с целью подавления у них местного иммунного ответа. Непосредственно перед введением в брюшную полость, клетки отмывали от ростовой среды в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки.

Асцит в виде серозного или серозно-геморрагического выпота появлялся через 10-14 дней после инъекции клеток. Асцитическую жидкость собирали в пробирки, предварительно обработанные гепарином для предотвращения образования фибриновых сгустков. Объем полученной асцитической жидкости от одного животного в среднем составлял 5-10 мл, при этом концентрация специфических антител в 1 мл асцита составляла от 3 до 7 мг/мл. После сбора асцитическую жидкость центрифугировали в течение 10 минут при 3000 g, для отделения от клеток. Для длительного хранения полученный асцит замораживали и хранили при -70°C либо консервировали добавлением азида натрия и хранили при $+4^{\circ}\text{C}$. Полученный супернатант в дальнейшем применяли для выделения моноклональных анти-BDNF-антител с помощью аффинной хроматографии на протеин-A-агарозе.

Для наработки антител использовали также метод культивирования в суспензии в бессывороточной среде для гибридом. После 7 дней культивирования собирали супернатант, концентрировали и проводили выделение чистых препаратов моноклональных антител на протеин-A-агарозе.

После концентрирования до 3 - 2,5 мг/мл с помощью центрифужных концентраторов с размером пор 100 кДа исследовали иммунохимические свойства препаратов моноклональных антител с помощью методов аналитического электрофореза, иммуноблота, иммуноферментного, иммуногисто- и цитохимического анализов.

3.5 Изучение иммунохимических свойств моноклональных антител

Определение класса моноклональных антител

Класс иммуноглобулинов определяли с помощью аналитического электрофореза с СДС в ПААГ. Результаты представлены на рисунке 3.13. Полученные моноклональные антитела были отнесены к классу G.

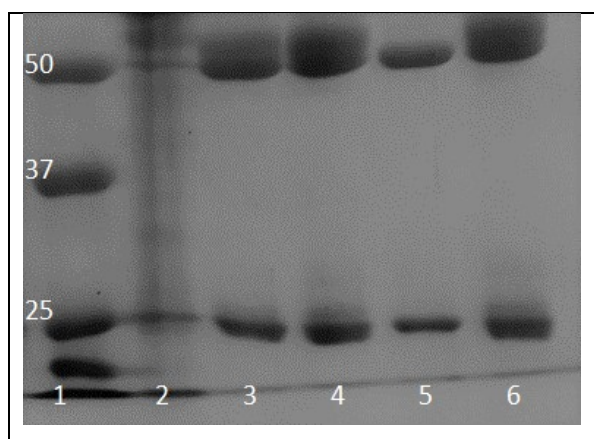


Рисунок 3.13. Электрофореграмма моноклональных антител

1 – маркеры молекулярных масс (Thermofisher)

2-6 – моноклональные антитела (2 – асцит, содержащий моноклональные антитела, 3-6 – чистые препараты моноклональных антител).

Определение константы аффинности моноклональных антител

Константы аффинности определяли для 2х видов моноклональных антител – mab02 и mab03 с помощью ИФА. Антиген (recBDNF) наносили в разведении от 1000 до 0,49 нг/мл. Моноклональные антитела использовали в разведении от 1000 до 15,6 пг/мл. По результатам ИФА были построены кривые доза-реакция (рисунки 3.14, 3.15) и определены константы аффинности для 2х видов антител (таблицы 3.2, 3.3).

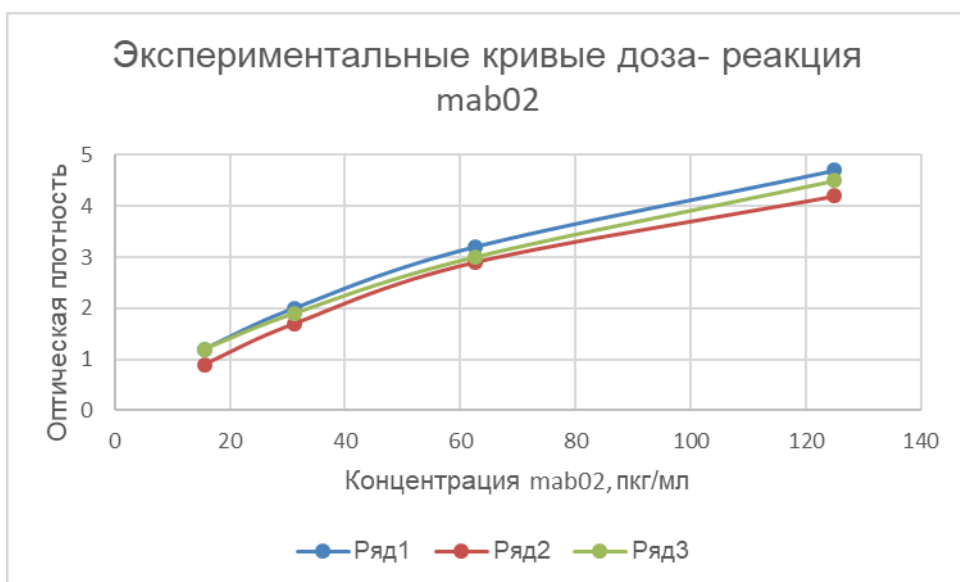


Рисунок 3.14. Экспериментальные кривые доза-реакция при 3 концентрациях антигена (рекомбинантный BDNF) для антител mab02:

Ряд 1 – 250 нг/мл, Ряд 2 – 125 нг/мл, Ряд 3 – 62,5 нг/мл.

Концентрация АГ, нг/мл	OD50	Концентрация mab, пг/мл	Kaff, $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$
250	1.75	25	0.18
125	1.65	32	0.085
62.5	1.65	25	0.13
Среднее значение Kaff=0,13 $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.			

Таблица 3.2. Определение константы аффинности по результатам ИФА для моноклональных антител mab02.

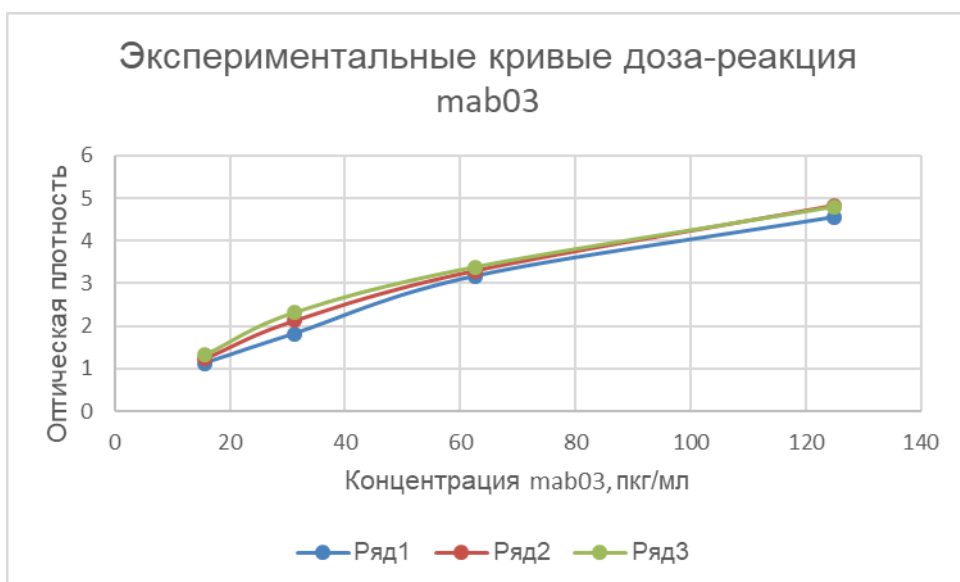


Рисунок 3.15. Экспериментальные кривые доза-реакция при 3 концентрациях антигена (рекомбинантный BDNF) для антител mab03:

Ряд 1 – 250 нг/мл, Ряд 2 – 125 нг/мл, Ряд 3 – 62,5 нг/мл.

Концентрация АГ, нг/мл	OD50	Концентрация mab, пг/мл	Kaff, $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$
250	1.025	27	0.15
125	1.03	18	0.13
62.5	1.03	11	0.1
Среднее значение Kaff=0,127 $\times 10^{15} \text{ M}^{-1}$.			

Таблица 3.3. Определение константы аффинности по результатам ИФА для моноклональных антител mab03.

Средние значения констант аффинности для обоих видов моноклональных антител превышают значения 10^9 - 10^{11} , следовательно, полученные антитела являются высокоаффинными.

Определение кросс-реактивности моноклональных антител

Проведенный аналитический электрофорез в ПААГ с последующим иммуноблотом с recBDNF и коммерческими препаратами NGF (Invitrogen, A42578,

Human Recombinant Protein) и NT-3 (Gibco, PHC7036, Human Recombinant Protein) не выявил перекрестного реагирования моноклональных антител с другими нейротрофинами (рисунок 3.16).

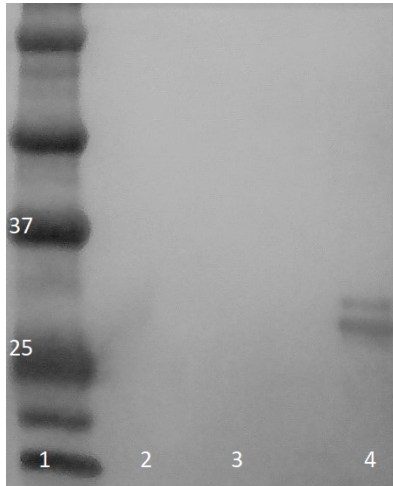


Рисунок 3.16. Результаты иммуноблоттинга с различными видами нейротрофинов.

- 1- Маркеры молекулярных масс (ThermoFS)
- 2- NGF
- 3- NT-3
- 4- recBDNF.

3.6 Иммунохимическая специфичность поли- и моноклональных антител

Для определения специфичного связывания с нативным BDNF поликлональные и моноклональные анти-BDNF-антитела анализировали с помощью иммуногистохимического метода на серийных срезах гиппокампа крыс (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023).

В результате проведенного анализа было продемонстрировано специфическое окрашивание, при этом иммунохимическая реакция в контрольных образцах отсутствовала (Рисунок 3.17).

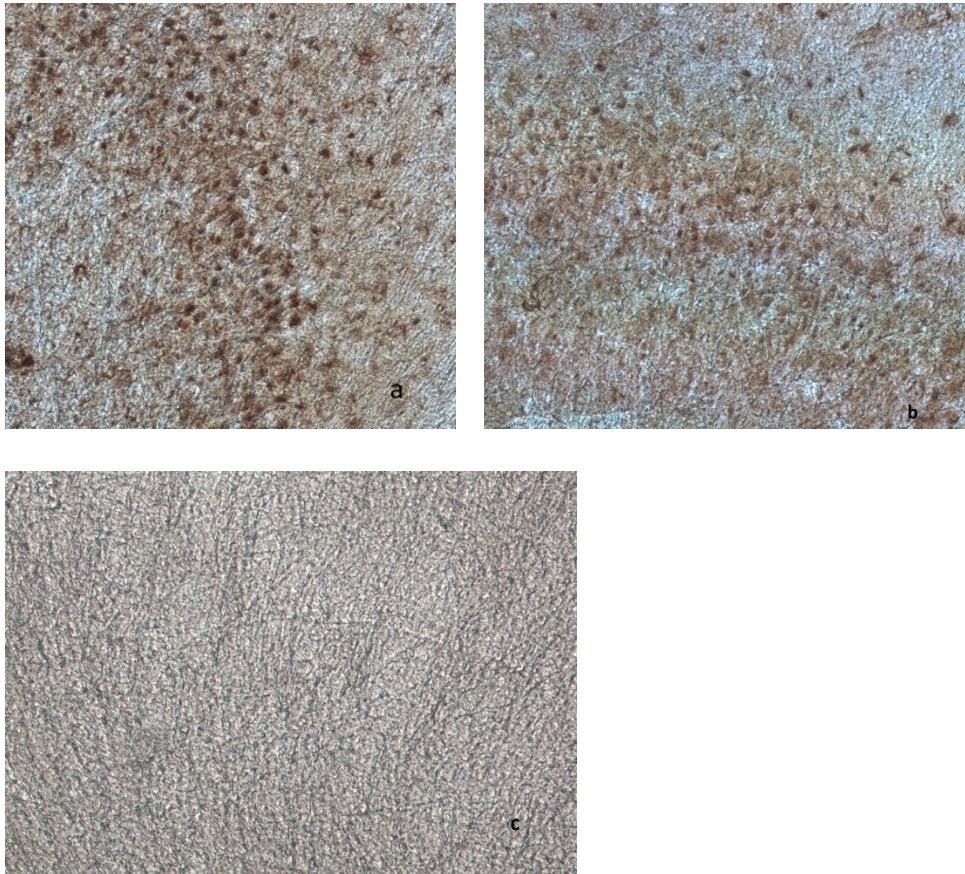


Рисунок 3.17. Иммуногистохимический анализ BDNF на срезах гиппокампа крысы с помощью моноклональных (а) и поликлональных (b) антител. Иммунопероксидазный метод. c – отрицательный контроль (без первых антител).

Для определения специфического связывания с нативным BDNF поликлональные и моноклональные анти-BDNF-антитела анализировали с помощью иммуноцитохимического метода на культурах эмбриональных астроцитов человека. В результате проведенного анализа было продемонстрировано специфическое окрашивание астроцитов, при этом иммунохимическая реакция в контрольных образцах отсутствовала (рисунок 3.18) (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023).

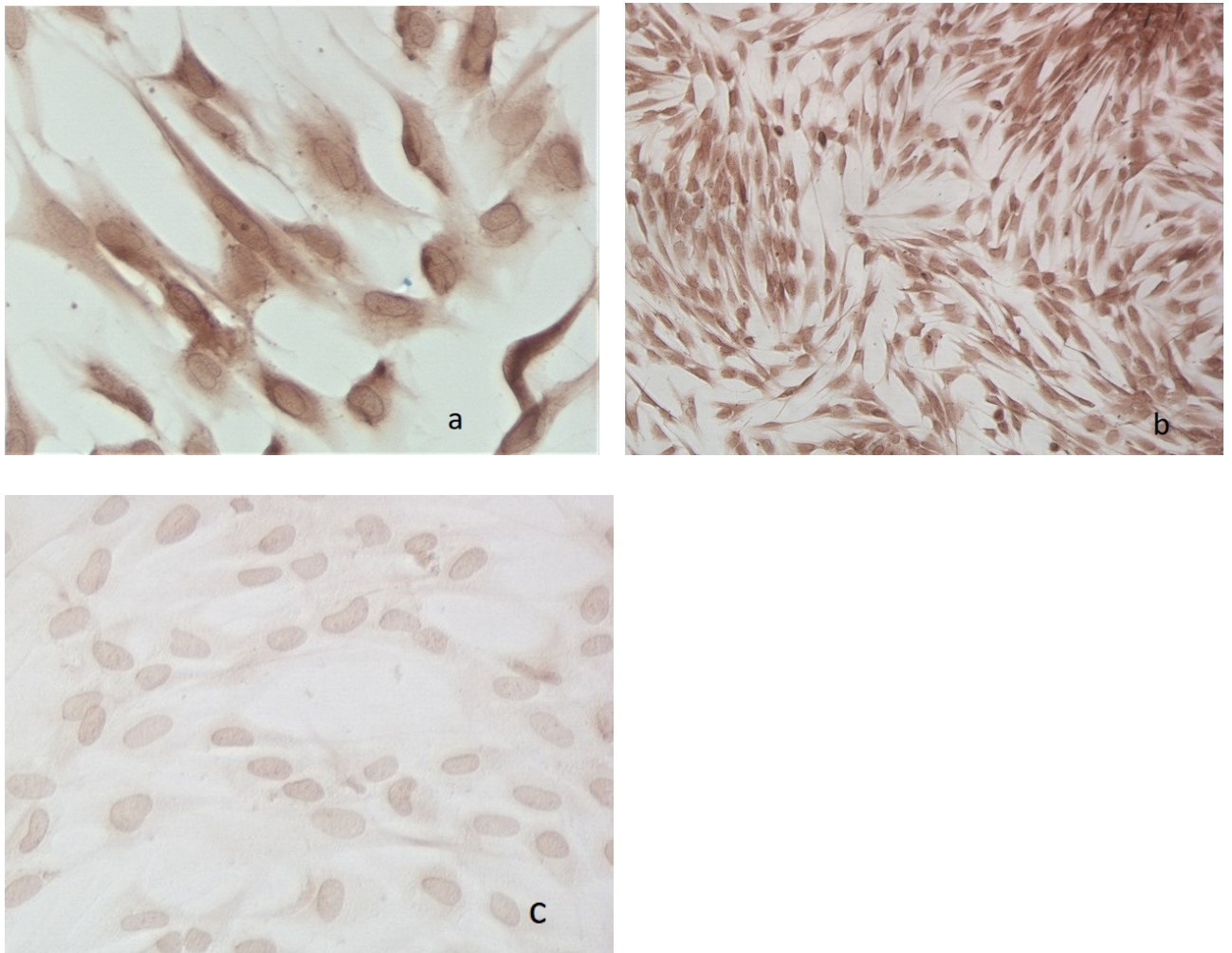


Рисунок 3.18. Иммуноцитохимический анализ BDNF в культурах эмбриональных астроцитов человека с помощью моноклональных (a) и поликлональных (b) антител. Иммунопероксидазный метод. c – отрицательный контроль (без первых антител).

3.7 Разработка тест-системы иммуноферментного анализа

Принцип метода сэндвич-варианта иммуноферментного анализа состоит в одновременном взаимодействии антигена с иммобилизованными на твердой матрице моноклональными антителами и с биотинилированными поликлональными антителами, затем такой комплекс выявляется конъюгатом стрептавидина с ферментом пероксидазой. Количество связанного конъюгата проявляется с помощью хромогенного субстрата, вступающего в реакцию с ферментом. При этом

интенсивность приобретенного окрашивания пропорциональна количеству антигена в образце.

При разработке тест-системы ИФА были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий проведения данного анализа, в результате которых было определено, что необходимое разведение поликлональных биотинилированных анти-BDNF-антител составляет 1:10000 (т.е. 1 нг/мл), учитывая, что для твердофазного ИФА рекомендуемое максимальное значение оптической плотности (ОП) не должно превышать 2,0 усл. ед., а значения ОП при разведениях от 1:20000 и более приближаются к значениям неспецифического фона (рисунок 3.19).

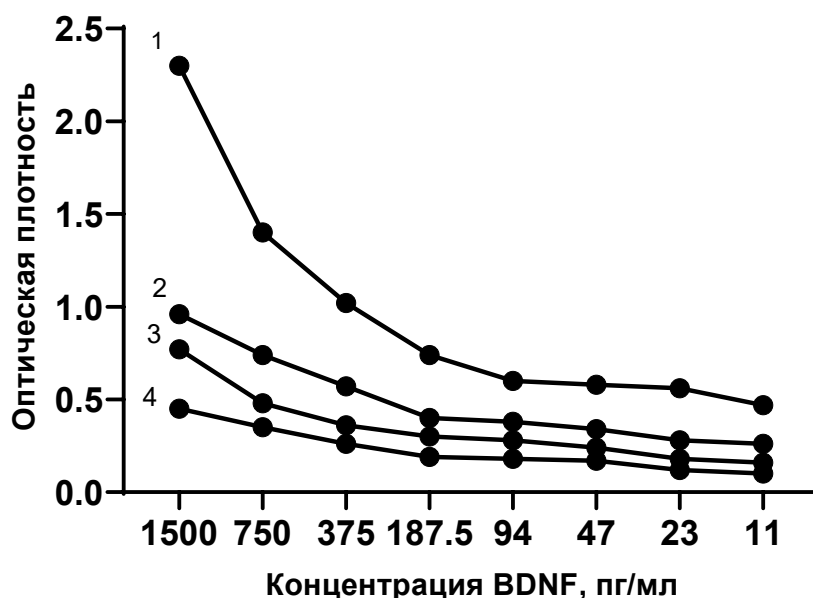


Рисунок 3.19. График зависимости оптической плотности от концентрации recBDNF в стандартных образцах при различных разведениях поликлональных анти- BDNF антител: 1 – 1:5 000, 2 – 1:10 000, 3 – 1:20 000, 4 – 1:40 000.

Также проводили подбор разведений сывороток крови методом ИФА, по результатам которого было определено, что оптимальное разведение лежит в диапазоне 1:32 – 1:64, так как при таких разведениях значения ОП максимальные,

а абсолютные концентрации BDNF будут превышать концентрации при более меньших разведениях (рисунок 3.20).

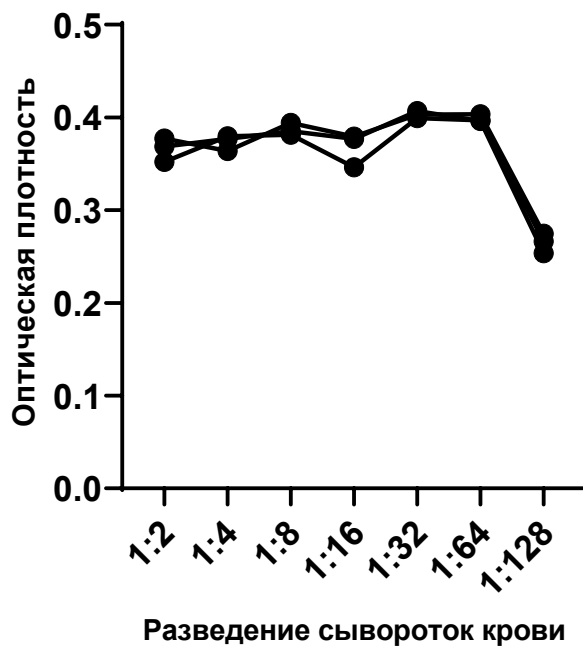


Рисунок 3.20. График зависимости оптической плотности от разведений сывороток крови.

Для успешного использования разработанной тест-системы в практических целях необходимо добиться максимальной воспроизводимости получаемых результатов, а также охарактеризовать ее чувствительность, качество, специфичность.

Понятие качества иммуноферментной тест-системы относится к стабильности аналитической системы (в первую очередь калибровочного графика), повышение которой достигается обязательным включением определенного диапазона стандартных образцов в исследуемую группу препаратов при каждой постановке иммуноферментного анализа.

Для тест-системы концентрации калибровочных растворов рекомбинантного белка *recBDNF* были взяты в количестве 8 точек последовательного снижения концентраций от 1500 до 10 пг/мл.

Регистрацию результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра *i-Mark* (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 450 нм, измерения отображали в единицах оптической плотности.

Калибровочные кривые были построены по результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигена (*recBDNF*) в стандартных пробах при каждой постановке ИФА *BDNF* в сыворотках крови пациентов и контрольных групп. В диапазонах прямолинейности калибровочных кривых проводили определение концентраций в исследуемых биообразцах. Один из вариантов такого графика представлен на рисунке 3.21.

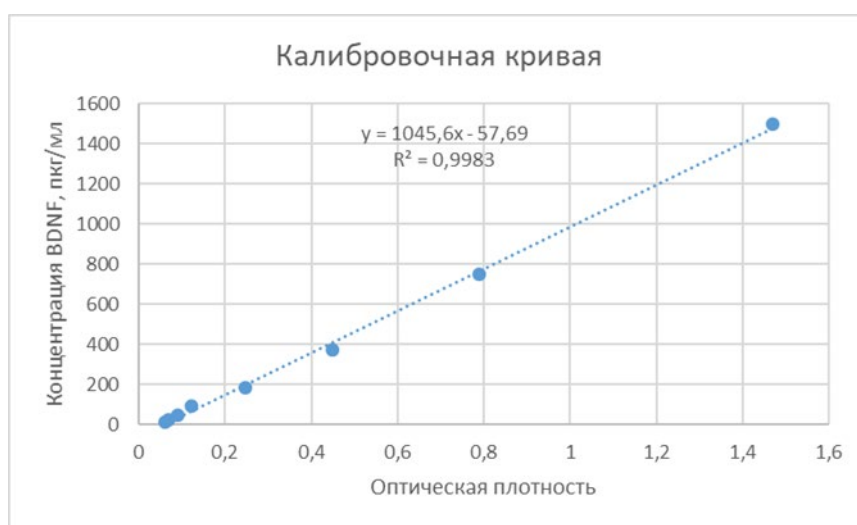


Рисунок 3.21. Калибровочный график зависимости концентраций *recBDNF* в стандартных образцах от значений оптической плотности.

Величина достоверности аппроксимации калибровочных кривых составляла не менее 0,98, что позволило адекватно оценивать концентрацию *BDNF* в заданном диапазоне.

Были выбраны 5 таких графиков и результатов иммуноферментных анализов, проведенных в разное время, при одних и тех же условиях. На основе этих данных был проведен статистический анализ для валидации разработанной тест-системы. При оценке параметров валидации рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, доверительный интервал и прецизионность, которая характеризовалась коэффициентом вариации и не превышала 10% (таблица 3.4) (Павлова О.В., Мурашко А.А., 2023).

Концентрации BDNF, пг/мл	Число определений	Среднее значение	Стандартное отклонение	Доверительный интервал	Коэффициент вариации, %
1500	5	1,139	0,014	1,125-1,153	1,2
750	5	0,819	0,0245	0,795-0,844	3
375	5	0,463	0,0093	0,454-0,472	2
187,5	5	0,252	0,0037	0,215-0,289	1,5
93,7	5	0,126	0,0039	0,122-0,130	3
46,8	5	0,096	0,0043	0,092-0,100	4,5
23,4	5	0,073	0,0037	0,069-0,077	5,1
11,7	5	0,065	0,0034	0,062-0,068	5,3

Таблица. 3.4. Точность и воспроизводимость калибровочных кривых иммуноферментного определения recBDNF.

Чувствительность тест-системы иммуноферментного анализа – это самая низкая определяемая концентрация анализируемого вещества, вычисляется как значение, которое выше среднего значения стандарта минимальной концентрации на 3 стандартных отклонения ± 2 стандартных отклонения. Для разработанной нами тест-системы чувствительность составила 40 $\pm$ 10 пг.

Специфичность тест-системы — это ее способность выявлять в анализируемых смесях только то вещество, для определения которого эта система разрабатывалась. Поли- и моноклональные антитела были получены при иммунизации животных высокоочищенным препаратом рекомбинантного recBDNF, который по иммунохимическим свойствам не отличался от нативного BDNF, что было доказано иммуногисто- и цитохимическими анализами. Также в

результате проведенного аналитического СДС-электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблотом с ресBDNF и коммерческими препаратами NGF и NT-3 не выявилось перекрестного реагирования антител с другими нейротрофинами.

Таким образом, постановку ИФА для определения концентраций BDNF в сыворотках крови с помощью разработанной тест-системы проводили по следующему протоколу:

1. Иммобилизация моноклональных анти-BDNF антител (10 мкг/мл в бикарбонатном буфере (0,1 М NaHCO_3 , pH 9.2)) в течение 12 часов при 4°C.
2. Промывка 3 раза по 300 мкл PBS с 0,05% Твин-20 с помощью автоматического вошера PW-40 (Bio-Rad).
3. Блокирование неспецифического связывания добавлением 3% раствора БСА на PBS в течение 1 ч при комнатной температуре на роторном шейкере (Biosan, Thermo-shaker PST-60HL, 350 об./мин).
4. Промывка 3 раза по 300 мкл PBS с 0,05% Твин-20.
5. Внесение стандартных образцов ресBDNF (концентрация от 1500 до 10 пг/мл) и исследуемых образцов (сыворотки крови пациентов или условно здоровых доноров в разведении 1:50), инкубация в течение 1,5 ч при комнатной температуре на роторном шейкере.
6. Промывка 3 раза по 300 мкл PBS с 0,05% Твин-20.
7. Внесение поликлональных биотинилированных анти-BDNF антител (1 нг/мл), инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре на роторном шейкере.
8. Промывка 3 раза по 300 мкл PBS с 0,05% Твин-20.
9. Внесение раствора стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (HRP-Conjugated Streptavidin, Thermo Scientific, разведение 1:5000), инкубация в течение 0,5 ч при комнатной температуре на роторном шейкере.
10. Промывка 3 раза по 300 мкл PBS с 0,05% Твин-20.

11. Проявление ферментативной активности пероксидазы с использованием раствора хромогенного субстрата ТМБ (Amresco) в течение 15-20 мин.
12. Внесение раствора 1М H₂SO₄ для остановки ферментативной реакции.
13. Считывание результатов с помощью фотометра i-Mark (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 450 нм, на основе полученных данных построение калибровочного графика и определение концентраций BDNF в исследуемых образцах.

Общее время анализа составляет в среднем около 5 часов, исключая время на иммобилизацию моноклональных антител (12 часов).

3.8 Количественный анализ BDNF в сыворотках крови пациентов с помощью разработанной тест-системы ИФА

Для верификации разработанной тест-системы был проведен эксперимент по определению уровней BDNF в сыворотке крови пациентов (общим количеством – 120 человек): 1 группа – с шизофренией (МКБ – F20), 2 группа – с депрессивными расстройствами, имеющих суицидальные попытки в анамнезе, 3 группа – с первым психотическим эпизодом, а также была использована сыворотка крови условно здоровых доноров (контрольная группа, 100 чел.) (Павлова О.В., Гурина О.И., 2023).

Результаты количественного определения BDNF в сыворотках крови с помощью разработанной тест-системы ИФА представлены на рисунках 3.22 и 3.23 (Павлова О.В., Гурина О.И., 2023).

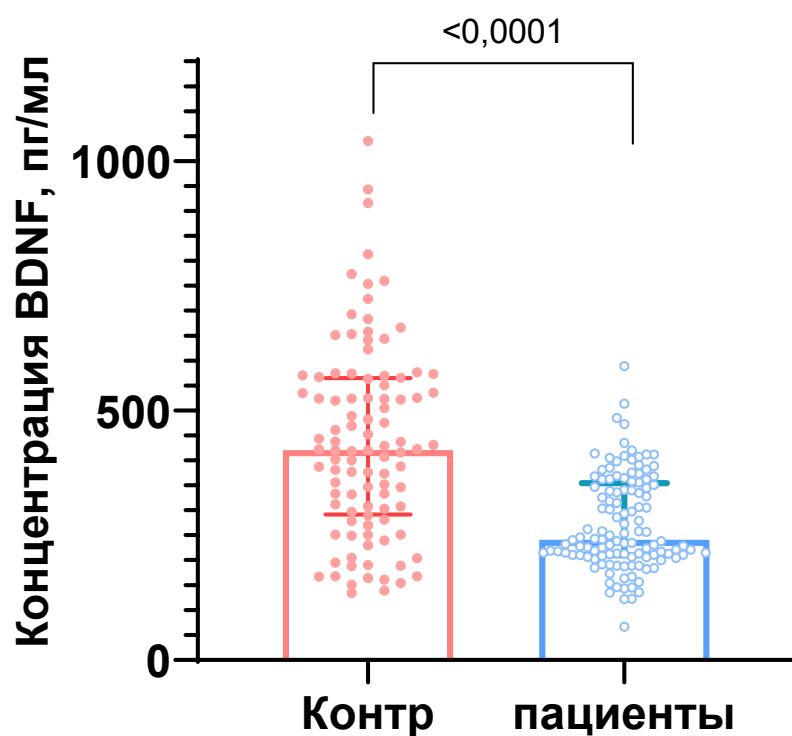


Рисунок 3.22. Результаты ИФА BDNF сывороток крови условно здоровых доноров (контр. группа) и пациентов с психическими заболеваниями (группа пациенты). Результаты представлены как количественные значения BDNF и показаны как медианы и межквартильные интервалы, непараметрический тест (тест Манна-Уитни).

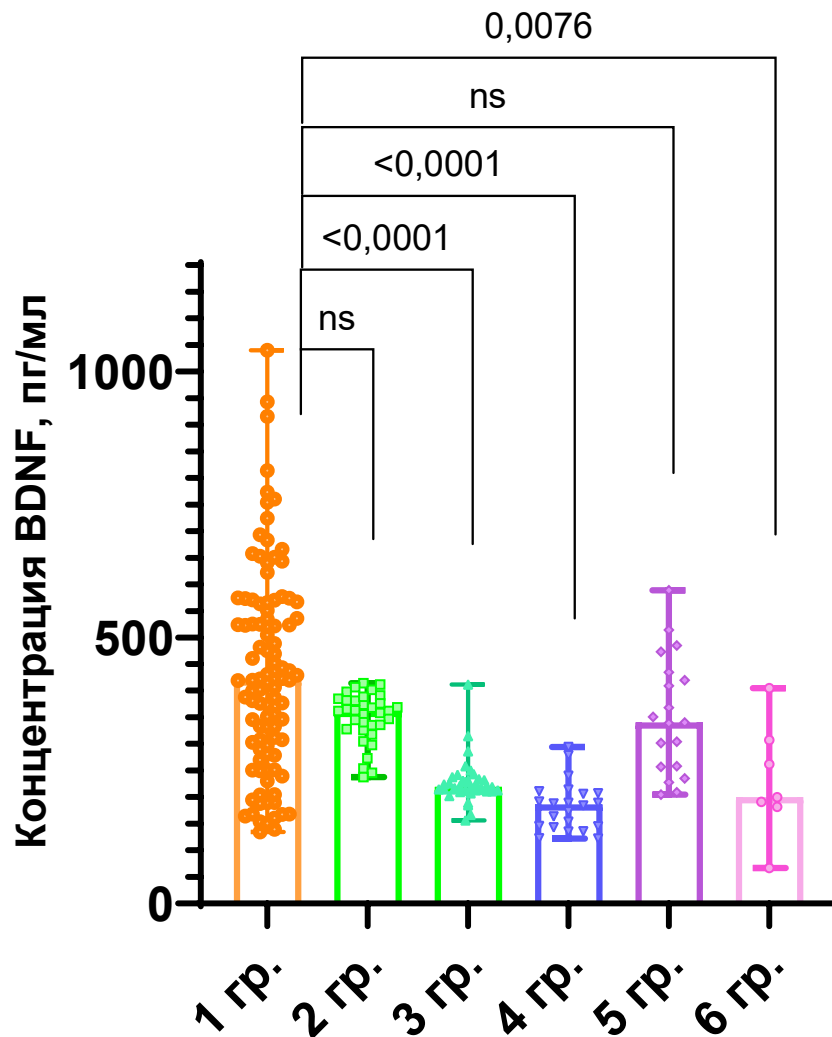


Рисунок. 3.23. Результаты ИФА BDNF сывороток крови условно здоровых доноров (1 группа) и пациентов с психическими заболеваниями: 2 гр. – шизофрения без депрессивных проявлений, 3 гр – шизофрения с депрессивными проявлениями, 4 гр. – депрессивные расстройства с суицидальными попытками в анамнезе, 5 гр. – первый психотический эпизод без аффективных нарушений, 6 гр. – первый психотический эпизод с маниакальными проявлениями. Результаты представлены как количественные значения BDNF и показаны как медианы и межквартильные интервалы, непараметрический вариант ANOVA Краскела-Уоллиса с последующим множественным сравнением Данна, ns – $>0,9999$.

В результате проведенного иммуноферментного анализа BDNF выявилось, что содержание этого белка в сыворотках крови контрольной группы по сравнению с группой пациентов значимо выше ($p < 0,0001$), несмотря на довольно широкий диапазон концентраций (минимальное значение - 134,3, максимальное – 1040).

При разделении пациентов на группы, значимые отличия по сравнению с контролем выявляются у 3х групп пациентов: с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе и с шизофренией с депрессивными проявлениями ($p < 0,0001$), а также у группы пациентов с первым психотическим эпизодом с маниакальными проявлениями ($p < 0,0076$).

В целом результаты проведенных экспериментов по сравнению уровней BDNF у здоровых людей и больных психическими расстройствами согласуются с данными мировых исследований. Дополнительно были выявлены некоторые различия в группах пациентов, что в дальнейшем может применяться для дифференциальной диагностики, а также для прогнозирования суицидального поведения.

Глава 4. Обсуждение

Открытие технологии рекомбинантных ДНК и методов переноса генов из одного организма в другой совершила настоящую революцию в биологии. Благодаря динамично развивающимся системам для трансгенной экспрессии белков, на настоящий момент у исследователя существует целый арсенал инструментов для быстрого клонирования, экспрессии, выделения и очистки интересующего белка. Основной целью данной работы была разработка тест-системы иммуноферментного анализа BDNF в сыворотке крови с использованием рекомбинантного белка BDNF и антител, полученных при иммунизации этим антигеном, что требует достаточное количество белковых препаратов. Традиционные биохимические процедуры выделения из гомогенатов ткани мозга весьма трудоемки и малопродуктивны из-за небольшого содержания этого белка в мозге и многоступенчатой и сложной очистки. А также возникают сложности при стандартизации такого препарата, необходимой для достижения высоких качественных показателей: специфичности и чувствительности диагностической тест-системы. Впервые BDNF был выделен и очищен из мозга свиньи в 1982 г., при этом из 1,5 кг мозга свиньи получили 1 мкг чистого препарата белка (Barde Y.A., 1982). Но и сегодня получение нативного белка биохимическими методами является трудоемкой и дорогой процедурой, что соответственно отражается на стоимости подобного продукта. Если же биологическая активность белка не является критическим фактором, поскольку для успешного получения моно- и поликлональных антител требуется только правильная аминокислотная последовательность белка, гораздо более продуктивными являются методы получения рекомбинантных белков в *E. coli* (Francis D. M., 2010). В настоящее время подобные генно-инженерные процедуры стали уже рутинными. Создав однократно эффективный бактериальный штамм-продуцент, можно в дальнейшем получать высококачественный белок в неограниченных количествах.

При получении рекомбинантного белка recBDNF был использован штамм *E. coli* BL2[DE3], содержащий в своем геноме ген РНК-полимеразы фага T7 в составе

профага λ , помещенный под контроль *lac*-промотора. Этот штамм трансформировали плазмидой pET32a, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую mBDNF, под контролем T7-промотора, который обеспечивает эффективную и высокую экспрессию рекомбинантного белка (Глик Б., 2002). При добавлении в среду ИПТГ происходила индукция гена РНК-полимеразы T7, при этом синтезировалась РНК-полимераза и происходила транскрипция и трансляция клонированной последовательности. Штамм BL2[DE3] с экспрессирующей плазмидой pET32a часто используют для получения разнообразных рекомбинантных белков с высоким выходом целевого белка (Krishnan G., 2019; Gholami M., 2018).

Причиной низкой эффективности экспрессии рекомбинантных белков в прокариотических системах также может быть возникновение стабильной вторичной структуры РНК в области сайта инициации трансляции, затрудняющей связывание малой субъединицы рибосомы с мРНК, кодирующей рекомбинантный белок (Ivanov A. V., 2006; Hatfield G. W., 2007). В данной работе использовалась вставка, которая кодировала последовательность тиоредоксина, что позволило избежать этой проблемы, так как трансляция мРНК, кодирующей рекомбинантный белок, начинается с трансляции последовательности N-терминального белка тиоредоксина и обеспечивает отсутствие образованных РНК вторичных структур в области сайта связывания рибосомы и, следовательно, эффективную инициацию трансляции (LaVallie E. R., 2003).

Другой причиной снижения экспрессии в *E. coli* является наличие редких кодонов в эукариотических генах, которые с низкой частотой встречаются в бактериальных геномах. При экспрессии гетерологичных генов, содержащих редкие кодоны, нарушения при трансляции могут привести к низкому выходу, агрегации и образованию телец включения (Correddu D., 2020). В нуклеотидной последовательности, которая кодирует mBDNF, были обнаружены 5 видов редких кодонов, тем не менее экспрессия проходила эффективно и на достаточно высоком уровне (из 1 л культуры штамма *E. coli* было получено, в среднем, 1,5 мг recBDNF).

Рекомбинантный белок *recBDNF* является белком слияния, состоящим из аминокислотной последовательности тиоредоксина, последовательности *mBDNF* и гексогистидинового тега на конце, что позволяет выделить с помощью металл-хелатной хроматографии достаточное количество рекомбинантного белка для иммунизации животных, получения чистых препаратов поликлональных антител с помощью иммуноаффинной хроматографии и разработки тест-системы иммуноферментного анализа.

Основной проблемой получения антител к *BDNF* является высокий процент гомологии с *BDNF* человека (Keifer J., 2021), что значительно снижает, либо сводит на нет эффективность иммунизации животных (кроликов и мышей). С целью получения поли- и моноклональных антител были использованы модифицированные протоколы, что привело к возникновению адекватного иммунного ответа, при этом высокий титр специфических антител наблюдался уже через два цикла иммунизации. Полученные моноклональные антитела были высокоаффинными со средней константой аффинности $0,13 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$, и не проявляли перекрестной иммунореактивности с другими нейротрофинами, несмотря на 50% гомологию аминокислотных последовательностей с *BDNF* (Bothwell M., 2014).

Специфичность поли- и моноклональных антител по связыванию нативного белка *BDNF* была подтверждена иммуногистохимическим анализом срезов гиппокампа крыс, где было продемонстрировано специфическое окрашивание, и иммуноцитохимическим анализом культуры астроцитов со специфическим окрашиванием данных клеток. Выбор астроцитарной культуры клеток обусловлен тем фактом, что астроциты *in vitro* являются реактивными, что подтверждается высоким уровнем экспрессии GFAP, при этом известно, что реактивные астроциты способны экспрессировать *BDNF* и другие факторы (Patabendige A., 2021).

Разработанная тест-система представляет собой твердофазный сэндвич-вариант иммуноферментного анализа, где на поверхность твердой фазы прикрепляются моноклональные анти-*BDNF*-антитела, распознающие один из эпитопов анализируемого антигена. После добавления образца, содержащего

антиген, на поверхности «твердой фазы» образуются иммунные комплексы, к которым присоединяются поликлональные анти-BDNF-антитела, направленные к разным эпитопам антигена. В результате образуются тройные комплексы — «сэндвичи», в которых молекула антигена оказывается «зажатой» между молекулой моноклональных антител и молекулой поликлональных антител. Благодаря такому бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигена, в сэндвич-методе могут образовываться очень прочные циклические комплексы, и показано, что, будучи энергетически более выгодными, эти циклические структуры формируются даже при низкой концентрации антигена, при этом многократно увеличивается аналитическая чувствительность метода (Ehrlich P. H., 1983).

При валидации тест-системы были определены воспроизводимость получаемых результатов, чувствительность и качество, а также подобраны оптимальные условия проведения данного анализа (разведение сывороток крови — 1:50, концентрация поликлональных биотинилированных анти-BDNF антител — 1 нг/мл). Чувствительность, как самая низкая определяемая концентрация анализируемого вещества, составила 40 ± 10 пг/мл. Качество иммуноферментной тест-системы было исследовано при построении калибровочных графиков по результатам определения оптической плотности и известным концентрациям антигенов в стандартных пробах, при этом отмечается прямолинейность таких зависимостей на графиках, а также значения коэффициентов детерминации R^2 не меньше 0,98. Воспроизводимость оценивалась по калибровочным графикам иммуноферментного определения BDNF (проведенных в разное время, при одних и тех же условиях), при этом использовали несколько разведений стандартного антигена, измеряя оптическую плотность при каждом варианте концентрации 5 раз. Рассчитанный по результатам измерений коэффициент вариации не превышал 10% при каждом варианте. Таким образом, тест-система твердофазного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена и антител, полученных при иммунизации антигеном, для количественного

определения BDNF в сыворотке крови человека является специфичной, легко воспроизводимой и стандартизированной системой.

Изменения уровней BDNF связаны с этиологией и патогенезом психических заболеваний, кроме того, многие исследователи рассматривают возможность использовать данный белок в качестве потенциального биомаркера при диагностике и оценке эффективности лечения депрессивных расстройств, шизофрении, болезни Альцгеймера (Узбеков М. Г., 2016; Woods A. G., 2019; Peng S., 2018; Gao L., 2022).

Разработанная тест-система сэндвич-варианта ИФА была апробирована в эксперименте по количественному определению BDNF в сыворотках крови пациентов с психическими заболеваниями и контрольной группы условно здоровых доноров. Проведенные исследования показали, что уровни BDNF в группе пациентов значимо ниже, чем в контрольной выборке.

Наименьший уровень BDNF оказался в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе. Такое снижение может служить возможным предиктором склонности к суицидальному поведению, что весьма важно для прогноза развития депрессивных расстройств.

Снижение экспрессии BDNF ранее было описано для группы пациентов, покончивших жизнь самоубийством, при сравнении с контрольной группой людей, умерших в результате ДТП (Erbay L. G., 2021). Более ранние исследования, проведенные на пациентах с суицидальными попытками и здоровых людях, также обнаружили значительную связь низких уровней BDNF в сыворотке крови с суицидальным поведением (Devesi A., 2007). С другой стороны, при изучении взаимосвязи между уровнями BDNF в сыворотке крови и недавними попытками самоубийства (в течение последних трех месяцев) в большой клинической выборке с использованием метода случай-контроль, выяснилось, что уровень BDNF не был достоверно связан с попыткой самоубийства (Eisen R. B., 2016). В основе таких неоднозначных результатов могут лежать: разная этиология заболеваний,

неоднородность выборки (пол, возраст и др.) и измерений (плазма, сыворотка). Недавний мета-анализ подтверждает такие выводы – между двумя группами сравнения (психиатрические пациенты с попытками самоубийства в анамнезе и пациенты без попыток) не было обнаружено существенных различий в уровнях периферического BDNF, хотя анализ подгрупп показал, что уровни BDNF были снижены в плазме, но не в сыворотке (Fusar-Poli L., 2021).

У пациентов с шизофренией также было обнаружено снижение BDNF по сравнению с контрольной группой. Такие результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями содержания BDNF у пациентов с шизофренией, где показано снижение уровней этого белка в сыворотке крови пациентов по сравнению со здоровыми людьми (Zhu X., 2022; Han D., 2021), при этом у пациентов с депрессивной симптоматикой обнаруживались более низкие показатели BDNF (Manchia M., 2022).

Выявленное снижение уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с первым психотическим эпизодом с маниакальными проявлениями описано в литературе, когда у пациентов с биполярным расстройством обнаружилась значительная положительная корреляция между оценками по шкале мании Янга и снижением уровней BDNF в сыворотке крови пациентов с маниями по сравнению со здоровыми людьми (Chiou Y.-J., 2019).

Последней группой пациентов, у которых количественно определяли BDNF с помощью разработанной тест-системы, были пациенты с первым психотическим эпизодом (ППЭ) без аффективных нарушений. Эта группа не показала значимых отличий по уровню BDNF в сыворотке крови по сравнению с контрольной выборкой. По данным литературы результаты исследований в этой области несколько неоднородны. С одной стороны, не было обнаружено значимой корреляции между BDNF и баллами по шкале оценки позитивных и негативных синдромов (PANSS) у пациентов с ППЭ (Hatziagelaki E., 2019), при этом, сравнение проводилось в группе пациентов. С другой стороны, у пациентов с неаффективным ППЭ средние уровни BDNF были снижены по сравнению со здоровыми людьми

(Aydin M. S., 2020). Также недавний мета-анализ данных о периферических уровнях BDNF у пациентов с ППЭ показал достоверное снижение BDNF в группе пациентов при сравнении со здоровыми контрольными группами, при этом, учитывая большую гетерогенность исследований, дополнительный сравнительный анализ выявил, что корреляции низкого уровня BDNF были связаны с более молодым возрастом, тяжестью симптомов и отсутствием лечения (Singh S., 2022).

В целом результаты проведенных экспериментов по сравнению уровней BDNF у здоровых людей и больных психическими расстройствами согласуются с данными мировых исследований. Дополнительно были выявлены некоторые различия в группах пациентов, что в дальнейшем может применяться для дифференциальной диагностики, а также для прогнозирования суицидального поведения.

Таким образом, разработанная тест-система количественного определения BDNF в сыворотке крови является диагностически значимой, учитывая выявленные статистически достоверные отличия уровня BDNF у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой, а также у групп пациентов с депрессивными проявлениями. Важным преимуществом данной тест-системы, созданной на основе рекомбинантного препарата BDNF человека, является возможность стандартизовать все компоненты системы. Трансформированный штамм-продуцент *E. coli* синтезирует один и тот же белок, обладающий одинаковыми физико- и иммунохимическими характеристиками, с другой стороны, антительные компоненты являются специфичными, способны выявлять нативный белок в сыворотках крови, что позволяет производить стандартные тест-системы неограниченно долго и, практически, в любых количествах.

Внедрение данной тест-системы в практическое здравоохранение позволит расширить возможности скрининга, мониторинга течения и эффективности проводимой терапии пациентов с психическими заболеваниями.

ВЫВОДЫ

- Клонирование вставки, кодирующей последовательность mBDNF человека, в вектор pET32a с последующей трансформацией штамма *E. coli* (BL21[DE3]) обеспечивает высокую экспрессию рекомбинантного белка, при этом одноэтапная очистка индуцированных бактериальных культур на Ni-NTA агарозе позволяет получать чистые препараты белка, иммунохимически идентичного нативному BDNF, что подтверждается результатами иммуногисто- и цитохимического анализов.
- Полученные путем иммунизации рекомбинантным препаратом recBDNF по модифицированным протоколам, поликлональные и моноклональные антитела способны специфично распознавать и связываться с нативным BDNF в таких видах иммунохимического анализа как иммуноблот анализ, иммуноцито- и гистохимический анализ, твердофазный иммуноферментный анализ и не проявляют кросс-реактивности с другими нейротрофинами (NGF, NT-3).
- Разработанная тест-система твердофазного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантного антигена и антител, полученных при иммунизации антигеном, для количественного определения BDNF в сыворотке крови человека является специфичной, легко воспроизводимой, стандартизированной системой и характеризуется порогом чувствительности 40 +/- 10 пг/мл.
- При скрининге сывороток крови с использованием разработанной тест-системы ИФА BDNF выявлено достоверное снижение уровня BDNF у пациентов с психическими расстройствами по сравнению с группой условно здоровых доноров. Наименьший уровень BDNF оказался в группе пациентов с депрессивными расстройствами с суицидальными попытками в анамнезе. Такое снижение может служить предиктором склонности к суицидальному поведению, что весьма важно для прогноза развития депрессивных

расстройств. Разработанная тест-система обладает высокой диагностической значимостью, учитывая выявленные статистически достоверные отличия уровня BDNF у пациентов с психическими заболеваниями по сравнению с контрольной группой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Москва «Мир», 2002.
2. Голимбет В. Е., Алфимова М. В., Коровайцева Г. И., Лежейко Т. В. Полиморфизм Val66Met BDNF модифицирует проявления шизофрении. Молекулярная биология, 2014, том 48, № 1, с. 81–88. DOI: 10.7868/S0026898414010030
3. Гуляева Н. В. (а). Молекулярные механизмы нейропластичности: расширяющаяся Вселенная. Биохимия. 2017а, Т. 82, № 3, стр. 365–371. – EDN YKUPUZ.
4. Гуляева Н.В. (б). Взаимодействие системы BDNF и глутаматергической системы в мозге: краткий обзор и связь с патогенезом депрессии. Биохимия, 2017, Т. 82, № 3, стр. 441–448. doi: 10.1134/S0006297917030087.
5. Гурина О.И. Моноклональные антитела к нейроспецифическим антигенам. Получение, иммунохимический анализ, исследование проницаемости гематоэнцефалического барьера. Дис. докт. мед. наук. М., 2005.
6. Иванова С. А., Лосенков И. С., Левчук Л. А. и др. Депрессивные расстройства: гипотезы патогенеза и потенциальные биологические маркеры. – Новосибирск: Новосибирское отделение издательства "Наука", 2018. – 199 с. – ISBN 978-5-7692-1590-2. – EDN HPAPDQ.
7. Павлова О.В., Гурина О.И., Шпорт С.В., Павлов К.А. Нейротрофический фактор мозга как потенциальный диагностический маркер психических расстройств. Российский психиатрический журнал, 2023, №2, стр. 76-85.
8. Павлова О.В., Мурашко А.А., Андрющенко Н.В., Гурина О.И., Павлов К.А. Разработка количественного иммуноферментного анализа нейротрофического фактора мозга на основе рекомбинантного антигена. Нейрохимия, 2023, Т. 40, № 1, стр. 86-91, DOI: 10.31857/S1027813323010156.

9. Узбеков М. Г., Гурович И. Я., Иванова С. А. Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода. Социальная и клиническая психиатрия. 2016. Т. 26. № 1. С. 77-94.
10. Ушакова В. М., Морозова А. Ю., Резник А. М., Костюк Г. П., Чехонин В. П. Молекулярно-биологические аспекты депрессивных состояний: современный взгляд на проблему. Молекулярная биология, 2020, Т. 54, № 5, стр. 725-749. DOI: 10.31857/S0026898420050110.
11. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Гурина О.И. и др. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам. Монография, Москва, 2007 г.
12. Aatonen M. T., Ohman T., Nyman T. A., Laitinen S., Grönholm M., Siljander P. R.-M. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2014 Aug 6;3. doi: 10.3402/jev.v3.24692.
13. Abe M., Goto T., Wolfenbarger D., Weiss D. T., Solomon A. Novel immunization protocol and ELISA screening methods used to obtain and characterize monoclonal antibodies specific for human light chain variable-region subgroups. Hybridoma. 1993 Aug;12(4):475-83. doi: 10.1089/hyb.1993.12.475.
14. Aizawa S., Ishitobi Y., Masuda K., Inoue A., Oshita H., Hirakawa H. et al. Genetic association of the transcription of neuroplasticity-related genes and variation in stress-coping style. Brain Behav. 2015 Sep;5(9): e00360. doi: 10.1002/brb3.360.
15. Albuquerque Filho M. O., De Freitas B. S., Garcia R. C. L., Crivelaro P. C. D. F., Schröder N., De Lima M. N. M. Dual influences of early-life maternal deprivation on histone deacetylase activity and recognition memory in rats. Neuroscience. 2017 Mar 6; 344: 360-370. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.12.054.
16. Anastasia A., Deinhardt K., Chao M. V., Will N. E., Irmady K., Lee F. S., Hempstead B. L., Bracken C. Val66Met Polymorphism of BDNF Alters Prodomain Structure to Induce Neuronal Growth Cone Retraction. Nat Commun. 2013; 4: 2490. doi: 10.1038/ncomms3490.
17. Anders Q. S., Ferreira L. V. B., de Melo Rodrigues L. C., Nakamura-Palacios E. M. BDNF mRNA Expression in Leukocytes and Frontal Cortex Function in Drug Use Disorder. Front Psychiatry. 2020; 11: 469. doi: 10.3389/fpsyt.2020.00469.

18. Avdoshina V., Mocchetti I., Liu C., Young M. A., Anastos K., Cohen M. et al. Single-nucleotide polymorphisms in TrkB and risk for depression: findings from the women's interagency HIV study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Oct 1;64(2):138-41. doi: 10.1097/QAI.0b013e3182a468e9.
19. Aydemir C., Yalcin E. S., Aksaray S., Kisa C., Yildirim S. G., Uzbay T., Goka E. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 Sep 30;30(7):1256-60. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.03.025.
20. Aydın M. S., Bolu A., Kılınçkaya M. F., Öznur T., Çelik C., Uzun Ö., Özmenler K. N. Brain-derived neurotrophic factor levels and psychopathology scores in drug-naïve first-episode psychosis. *Asia Pac Psychiatry*. 2020 Dec;12(4):e12415. doi: 10.1111/appy.12415.
21. Bai M., Zhu X., Zhang Y., Zhang S., Zhang L., Xue L., Yi J., Yao S., Zhang X. Abnormal hippocampal bdnf and mir-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. *PLoS One*. 2012;7(10):e46921. doi: 10.1371/journal.pone.0046921.
22. Barbey A. K., Colom R., Pau E., Forbes C., Krueger F., Goldman D., Grafman. J. Preservation of general intelligence following traumatic brain injury: contributions of the Met66 brain-derived neurotrophic factor. *PLoS One*. 2014 Feb 26;9(2):e88733. doi: 10.1371/journal.pone.0088733.
23. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-53. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x.
24. Bayas A., Hummel V., Kallmann B. A., Karch C., Toyka K. V., Rieckmann P. Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine*. 2002 Jul 21;19(2):55-8. doi: 10.1006/cyto.2002.0892.
25. Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods*. 1987 Jun 26;100(1-2):173-9. doi: 10.1016/0022-1759(87)90187-6.

26. Begliuomini S., Lenzi E., Ninni F., Casarosa E., Merlini S., Pluchino N., Valentino V., Luisi S., Luisi M., Genazzani A. R. Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J Endocrinol.* 2008 May;197(2):429-35. doi: 10.1677/JOE-07-0376.
27. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* *J Bacteriol.* 1951 Sep;62(3):293-300. doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
28. Bjorkholm C., Monteggia L. M. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology.* 2016 Mar; 102: 72-9. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.034.
29. Block H., Maertens B., Spriestersbach A. et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol.* 2009; 463:439-73. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63027-5.
30. Blugeot A., Rivat C., Bouvier E., Molet J., Mouchard A., Zeau B., Bernard C., Benoliel J.-J., Becker C. Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers. *J Neurosci.* 2011 Sep 7;31(36):12889-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1309-11.2011.
31. Bocchio-Chiavetto L., Maffioletti E., Bettinsoli P., Giovannini C., Bignotti S., Tardito D., Corrada D., Milanesi L., Gennarelli M. Blood microRNA changes in depressed patients during antidepressant treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013 Jul;23(7):602-11. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.06.013.
32. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
33. Bosse K. E., Maina F. K., Birbeck J. A., France M. M., Roberts J. J. P., Colombo M. L., Mathews T. A. Aberrant striatal dopamine transmitter dynamics in brain-derived neurotrophic factor-deficient mice. *J Neurochem.* 2012 Feb;120(3):385-95. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07531.x.
34. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220:3-15. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_1.

35. Boulle F., van den Hove D. L. A., Jakob S. B., Rutten B. P., Hamon M., van Os J., Lesch K.-P., Lanfumey L., Steinbusch H. W., Kenis G. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2012 Jun;17(6):584-96. doi: 10.1038/mp.2011.107.
36. Bourin M. Neurogenesis and Neuroplasticity in Major Depression: Its Therapeutic Implication. *Adv Exp Med Biol*. 2021; 1305: 157-173. doi: 10.1007/978-981-33-6044-0_10.
37. Brown D. T., Vickers J. C., Stuart K. E., Cechova K., Ward D. D. The BDNF Val66Met Polymorphism Modulates Resilience of Neurological Functioning to Brain Ageing and Dementia: A Narrative Review. *Brain Sci*. 2020 Mar 25;10(4):195. doi: 10.3390/brainsci10040195.
38. Bueller J. A., Aftab M., Sen S., Gomez-Hassan D., Burmeister M., Zubieta J.-K. BDNF Val66Met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 2006 May 1;59(9):812-5. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.09.022.
39. Burnette W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981 Apr;112(2):195-203.
40. Carlberg L., Scheibelreiter J., Hassler M. R., Schloegelhofer M., Schmoeger M., Ludwig B., Kasper S., Aschauer H., Egger G., Schosser A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-epigenetic regulation in unipolar and bipolar affective disorder. *J Affect Disord*. 2014 Oct;168:399-406. doi: 10.1016/j.jad.2014.07.022.
41. Carter M. J., Milton I. D. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res*. 1993 Feb 25;21(4):1044.
42. Casarotto P. C., Giryh M., Fred S. M., Kovaleva V., Moliner R., Enkavi G., Biojone C. et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*. 2021 Mar 4;184(5):1299-1313.e19. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.034.

- 43.Castren E., Monteggia L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biol Psychiatry*. 2021 Jul 15;90(2):128-136. doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008.
- 44.Chacon-Fernandez P., Säuberli K., Colzani M., Moreau T., Ghevaert C., Barde Y.-A. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2016 May 6;291(19):9872-81. doi: 10.1074/jbc.M116.720029.
- 45.Chen W. W., Bala L., Liao L. M., Samuels M. L., Kotsopoulos S. K., Maguire C. A., Loguidice L., Soto H., Garrett M., Zhu L. D., Sivaraman S., Chen C., Wong E. T., Carter B. S., Hochberg F. H., Breakefield X. O., Skog J. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Jul 23;2(7):e109. doi: 10.1038/mtna.2013.28.
- 46.Chen E. S., Ernst C., Turecki G. The epigenetic effects of antidepressant treatment on human prefrontal cortex BDNF expression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Apr;14(3):427-9. doi: 10.1017/S1461145710001422.
- 47.Chen Z.-Y., Jing D., Bath K. G., Ieraci A., Khan T., Siao C.-J., Herrera D. G., Toth M., Yang C., McEwen B. S., Hempstead B. L., Lee F. S. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):140-3. doi: 10.1126/science.1129663.
- 48.Chen Z.-Y., Patel P. D., Sant G., Meng C.-X., Teng K. K., Hempstead B. L., Lee F. S. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*. 2004 May 5;24(18):4401-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0348-04.2004.
- 49.Chervyakov A. V., Chernyavsky A. Yu., Sinitsyn D. O., Piradov M. A. Possible Mechanisms Underlying the Therapeutic Effects of Transcranial Magnetic Stimulation. *Front Hum Neurosci*. 2015 Jun 16; 9: 303. doi: 10.3389/fnhum.2015.00303.
- 50.Chiaruttini C., Vicario A., Li Z., Baj G., Braiuca P., Wu Y., Lee F. S., Gardossi L., Baraban J. M., Tongiorgi E. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by

- translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 22;106(38):16481-6. doi: 10.1073/pnas.0902833106.
51. Chiou Y.-J., Huang T.-L. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2019 Apr;274:395-399. doi: 10.1016/j.psychres.2019.02.051.
 52. Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W., Helling R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Nov;70(11):3240-4.
 53. Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7777. doi: 10.3390/ijms21207777.
 54. Correddu D., de Jesús Montaña López J., Angermayr S. A., Middleditch M. J., Payne L. S., Leung I. K. H. Effect of consecutive rare codons on the recombinant production of human proteins in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*. 2020, 72 (2), 266-274. doi: 10.1002/iub.2162.
 55. Crowe J., Döbeli H., Gentz R., Hochuli E., Stüber D., Henco K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol*. 1994; 31:371-87.
 56. D'Addario C., Dell'Oso B., Galimberti D., Palazzo M.C., Benatti B., Di Francesco A. Epigenetic modulation of BDNF gene in patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatr*. 2013; 73:e6–e7. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.07.009.
 57. Davey F. R., Busch G. J. Immunohistochemistry of glomerulonephritis using horseradish peroxidase and fluorescein-labeled antibody: a comparison of two technics. *Am J Clin Pathol*. 1970 Apr;53(4):531-6. doi: 10.1093/ajcp/53.4.531.
 58. Davies P., Ijaz S., Williams C. J., Kessler D., Lewis G., Wiles N. Pharmacological interventions for treatment-resistant depression in adults. *Multicenter Study Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Dec 17;12(12):CD010557. doi: 10.1002/14651858.CD010557.pub2.

59. Dean J., Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr.* 2017 Jun; 27:101-111. doi: 10.1016/j.ajp.2017.01.025.
60. Deveci A., Aydemir O., Taskin O., Taneli F., Esen-Danaci A. Serum BDNF levels in suicide attempters related to psychosocial stressors: a comparative study with depression. *Neuropsychobiology.* 2007;56(2-3):93-7. doi: 10.1159/000111539.
61. Dower W.J. Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet Eng (N Y).* 1990; 12:275-95.
62. Du Y., Wu H.-T., Qin X.-Y., Cao C., Liu Y., Cao Z.-Z., Cheng Y. Postmortem Brain, Cerebrospinal Fluid, and Blood Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Mol Neurosci.* 2018 Jul;65(3):289-300. doi: 10.1007/s12031-018-1100-8.
63. Duhamel R.C., Schur P.H., Brendel K., Meezan E. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *J Immunol Methods.* 1979;31(3-4):211-7. doi: 10.1016/0022-1759(79)90133-9.
64. Duman R.S., Deyama S., Fogaca M. V. Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: activity dependent effects distinguish rapid acting antidepressants. *Eur J Neurosci.* 2021 Jan; 53(1): 126–139. doi: 10.1111/ejn.14630.
65. Duman R. S., Monteggia L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1116-27. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013.
66. Dunham J. S., Deakin J. F. W., Miyajima F., Payton A., Toro C. T. Expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor and its receptors in Stanley consortium brains. *J Psychiatr Res.* 2009 Sep;43(14):1175-84. doi: 10.1016/j.jpsychires.2009.03.008.
67. Egan M. F., Kojima M., Callicott J. H., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D. R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003 Jan 24;112(2):257-69. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00035-7.

- 68.Ehrlich P. H., Moyle W. R. Specificity considerations in cooperative immunoassays. *Clin. Chem.* 1984, 30(9):1523-1532., Jackson A.P., Siddle K., Thompson R.J. A monoclonal antibody to human brain-type creatine kinase. Increased avidity with mercaptans. *Biochem J.* 1983, 215(3):505-512.
- 69.Eisen R. B., Perera S., Bawor M., Dennis B. B., El-Sheikh W., DeJesus J., Rangarajan S., Vair J., Sholer H., Hutchinson N. et al. Exploring the association between serum BDNF and attempted suicide. *Sci. Rep.* 2016; 6:25229. doi: 10.1038/srep25229.
- 70.Esvald E.-E., Tuvikene J., Sirp A., Patil S., Bramham C.R., Timmusk T. CREB Family Transcription Factors Are Major Mediators of BDNF Transcriptional Autoregulation in Cortical Neurons. *J Neurosci.* 2020 Feb 12;40(7):1405-1426. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0367-19.2019.
- 71.Erbay L. G., Karlıdag R., Oruc M., Çigremiş Y., Celbis O. Association of BDNF / TrkB and NGF / TrkA Levels in Postmortem Brain with Major Depression and Suicide. *Psychiatr Danub.* Winter 2021;33(4):491-498. doi: 10.24869/psyd.2021.491.
- 72.Erickson K.I., Kim J.S., Suever B.L., Voss M.W., Francis B.M., Kramer A.F. Genetic contributions to age-related decline in executive function: a 10-year longitudinal study of COMT and BDNF polymorphisms. *Front Hum Neurosci.* 2008 Sep 23; 2:11. doi: 10.3389/neuro.09.011.2008.
- 73.Fang Y., Qiu Q., Zhang S., Sun L., Li G., Xiao S., Li X. Changes in miRNA-132 and miR-124 levels in non-treated and citalopram-treated patients with depression. *J Affect Disord.* 2018 Feb; 227:745-751. doi: 10.1016/j.jad.2017.11.090.
- 74.Favalli G., Li J., Belmonte-de-Abreu P., Wong A. H., Daskalakis Z. J. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2012 Jan;46(1):1-11. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.09.022.
- 75.Francis D. M., Page R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. *Curr Protoc Protein Sci.* 2010 Aug; Chapter 5(1):5.24.1-5.24.29. doi: 10.1002/0471140864.ps0524s61.

- 76.Fusar-Poli L., Aguglia A., Amerio A., Orsolini L., Salvi V., Serafini G., Volpe U., Amore M., Aguglia E. Peripheral BDNF levels in psychiatric patients with and without a history of suicide attempt: A systematic review and meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021 Dec 20; 111:110342. doi: 10.1016/j.pnpbp.2021.110342.
- 77.Gadad B. S., Vargas-Medrano J., Ramos E. I., Najera K., Fagan M., Forero A., Thompson P. M. Altered levels of interleukins and neurotrophic growth factors in mood disorders and suicidality: an analysis from periphery to central nervous system. *Transl Psychiatry*. 2021 Jun 2;11(1):341. doi: 10.1038/s41398-021-01452-1.
- 78.Gao L., Zhang Y., Sterling K., Song W. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener*. 2022 Jan 28;11(1):4. doi: 10.1186/s40035-022-00279-0.
- 79.Gelle T., Samey R. A., Plansont B., Bessette B., Jauberteau-Marchan M.-O., Lalloué F., Girard M. BDNF and pro-BDNF in serum and exosomes in major depression: Evolution after antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021 Jul 13; 109: 110229. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110229.
- 80.Gholami M., Ravanshad M., Baesi K., Samiee S. M., Rozbahani N. H., Mohraz M. Preparation and Evaluation of Ribonuclease-Resistant Viral HIV RNA Standards Based on Armored RNA Technology. *Iran Biomed J*. 2018 Nov;22(6):394-400. doi: 10.29252/22.6.394.
- 81.Giacobbo B. L., Doorduyn J., Klein H. C., Dierckx R. A. J. O., Bromberg E., de Vries E. F. J. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(5): 3295–3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
- 82.Gratacos M., Gonzalez J.R., Mercader J.M., de Cid R., Urretavizcaya M., Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2007 Apr 1;61(7):911-22. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.08.025.

83. Gothe F., Enache D., Wahlund L. O., Winblad B., Crisby M., Løkke J., Aarsland D. Cerebrovascular diseases and depression: epidemiology, mechanisms and treatment. *Panminerva Med.* 2012 Sep;54(3):161-70.
84. Gottmann K., Mittmann T., Lessmann V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res.* 2009 Dec;199(3-4):203-34. doi: 10.1007/s00221-009-1994-z.
85. Guillin O., Demily C., Thibaut F. Brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and its relation with dopamine. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 78: 377-95. doi: 10.1016/S0074-7742(06)78012-6.
86. Guo J., Ji Y., Ding Y., Jiang W., Sun Y., Lu B., Nagappan G. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell Death Dis.* 2016 Jun 16;7(6):e2264. doi: 10.1038/cddis.2016.166.
87. Halaris A. Inflammation-Associated Co-morbidity Between Depression and Cardiovascular Disease. *Curr Top Behav Neurosci.* 2017; 31: 45-70. doi: 10.1007/7854_2016_28.
88. Han D., Sun D., Xiu M., Su X., Wang J., Li J., Wang D. Association between the improvement in depressive symptoms and serum BDNF levels in drug-naïve first episode patients with schizophrenia: A longitudinal follow-up. *Psychoneuroendocrinology.* 2021 Nov; 133: 105392. doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105392.
89. Hariri A. R., Goldberg T. E., Mattay V. S., Kolachana B. S., Callicott J. H., Egan M. F., Weinberger D. R. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci.* 2003 Jul 30;23(17):6690-4. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-17-06690.2003.
90. Harrisberger F., Spalek K., Smieskova R., Schmidt A., Coyne D., Milnik A. et al. The association of the BDNF Val66Met polymorphism and the hippocampal volumes in healthy humans: a joint meta-analysis of published and new data. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 May;42:267-78. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.011.

- 91.Hasbi A., Fan T., Alijaniam M., Nguyen T., Perreault M. L., O'Dowd B. F. et al. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:21377–21382.
- 92.Hatfield G. W., Roth D. A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering. *Biotechnol Annu Rev*. 2007; 13:27-42.
- 93.Hatziagelaki E., Tsiavou A., Gerasimou C., Vavougiou G. D., Spathis A., Laskos E. et al. Effects of olanzapine on cytokine profile and brain-derived neurotrophic factor in drug-naive subjects with first-episode psychosis. *Exp Ther Med*. 2019 Apr;17(4):3071-3076. doi: 10.3892/etm.2019.7285.
- 94.Hempstead B. L. Brain-derived neurotrophic factor: three ligands, many actions. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2015; 126:9-19.
- 95.Hess E. M., Riggs L. M., Michaelides M., Gould T. D. Mechanisms of ketamine and its metabolites as antidepressants. *Biochem Pharmacol*. 2022 Mar; 197: 114892. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114892.
- 96.Hing B., Davidson S., Lear M., Breen G., Quinn J., McGuffin P., MacKenzie A. A polymorphism associated with depressive disorders differentially regulates brain derived neurotrophic factor promoter IV activity. *Biol Psychiatry*. 2012 Apr 1;71(7):618-26. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.11.030.
- 97.Hing B., Sathyaputri L., Potash J. B. A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2018 Mar;177(2):143-167. doi: 10.1002/ajmg.b.32616.
- 98.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 Jun; 43: 35-47. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.012.
- 99.Hsieh M.-T., Lin C.-C., Lee C.-T., Huang T.-L. Abnormal Brain-Derived Neurotrophic Factor Exon IX Promoter Methylation, Protein, and mRNA Levels

- in Patients with Major Depressive Disorder. *J Clin Med*. 2019 May; 8(5): 568. doi: 10.3390/jcm8050568.
100. Huang T.-L., Lee C.-T., Liu Y.-L. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res*. 2008 Jun;42(7):521-5. doi: 10.1016/j.jpsychires.2007.05.007.
 101. Ivanov A. V., Korovina A. N., Tunitskaya V. L., Kostyuk D. A., Rechinsky V. O., Kukhanova M. K., Kochetkov S. N. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr Purif*. 2006, Jul;48(1):14-23.
 102. Januar V., Ancelin M.-L., Ritchie K., Saffery R., Ryan J. BDNF promoter methylation and genetic variation in late-life depression. *Transl Psychiatry*. 2015 Aug 18;5(8):e619. doi: 10.1038/tp.2015.114.
 103. Juhasz G., Dunham J. S., McKie S., Thomas E., Downey D., Chase D., Lloyd-Williams K., Toth Z. G., Platt H., Mekli K. et al. The CREB1-BDNF-NTRK2 pathway in depression: multiple gene-cognition-environment interactions. *Biol Psychiatry*. 2011 Apr 15;69(8):762-71. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.11.019.
 104. Kailainathan S., Piers T. M., Yi J. H., Choi S., Fahey M. S. et al. Activation of a synapse weakening pathway by human Val66 but not Met66 pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF). *Pharmacol Res*. 2016 Feb;104:97-107. doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.008.
 105. Karege F., Schwald M., Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002 Aug 16;328(3):261-4. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00529-3.
 106. Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol*. 2005 May 20;136(1-2):29-37. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.12.020.
 107. Keifer J. Comparative Genomics of the BDNF Gene, Non-Canonical Modes of Transcriptional Regulation, and Neurological Disease. *Mol Neurobiol*. 2021 Jun;58(6):2851-2861. doi: 10.1007/s12035-021-02306-z.

108. Keifer J., Zheng Z., Ambigapathy G. A MicroRNA-BDNF Negative Feedback Signaling Loop in Brain: Implications for Alzheimer's Disease. *Microna*. 2015;4(2):101-8. doi: 10.2174/2211536604666150813152620.
109. Kheirollahi M., Kazemi E., Ashouri S. Brain-derived neurotrophic factor gene Val66Met polymorphism and risk of schizophrenia: a meta-analysis of case-control studies. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Jan;36(1):1-10. doi: 10.1007/s10571-015-0229-z.
110. Kim J.-W., Autry A. E., Na E. S., Adachi M., Bjorkholm C., Kavalali E. T., Monteggia L. M. Sustained effects of rapidly-acting antidepressants require BDNF-dependent MeCP2 phosphorylation. *Nat Neurosci*. 2021 August; 24(8): 1100–1109. doi:10.1038/s41593-021-00868-8.
111. Kim S. W., Lee J. Y., Kang H. J., Kim S. Y., Bae K. Y., Kim J. M. Gender-specific associations of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with neurocognitive and clinical features in schizophrenia. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2016 Aug 31;14(3):270-8. doi: 10.9758/cpn.2016.14.3.270.
112. Kitzlerova E., Fišar Z., Lelková P., Jiráček R., Zvěřová M. et al. Interactions Among Polymorphisms of Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease or Depressive Disorder. *Med Sci Monit*. 2018 Apr 28; 24:2599-2619. doi: 10.12659/MSM.907202.
113. Klein A. B., Williamson R., Santini M. A., Clemmensen C., Ettrup A., Rios M., Knudsen G. M., Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Apr;14(3):347-53. doi: 10.1017/S1461145710000738.
114. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*. 1971 Mar 14;56(2):341-61. doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4.

115. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7. doi: 10.1038/256495a0.
116. Kolbeck R., Bartke I., Eberle W., Barde Y. A. Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J Neurochem*. 1999 May;72(5):1930-8. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0721930.x.
117. Koo J. W., Chaudhury D., Han M.-H., Nestler E. J. Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. *Biol Psychiatry*. 2019 Nov 15;86(10):738-748. doi: 10.1016/j.biopsych.2019.05.020.
118. Kowianski P., Lietzau G., Czuba E., Waskow M., Steliga A., J. Morys. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr;38(3):579-593. doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
119. Kraus C., Kadriu B., Lanzenberger R., Zarate Jr. C.A., Kasper S. Prognosis and improved outcomes in major depression: a review. *Transl Psychiatry*. 2019; 9: 127. Published online 2019 Apr 3. doi: 10.1038/s41398-019-0460-3.
120. Krishnan G., Roy U. Role of Molecular Interactions and Oligomerization in Chaperone Activity of Recombinant Acr from *Mycobacterium tuberculosis*. *Iran J Biotechnol*. 2019 Sep 1;17(3):e2370. doi: 10.229252/ijb.2370.
121. Krueger F., Pardini M., Huey E. D., Rayment V., Solomon J., Lipsky R. H., Hodgkinson C. A., Goldman D., Grafman J.T he role of the Met66 brain-derived neurotrophic factor allele in the recovery of executive functioning after combat-related traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2011 Jan 12;31(2):598-606. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1399-10.2011.
122. Kumar V., Zhang M.-X., Swank M. W., Kunz J., Wu G.-Y.J. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11288-99. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005.

123. Kunugi H., Hori H., Adachi N., Numakawa T. Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010 Oct;64(5):447-59. doi: 10.1111/j.1440-1819.2010.02135.x.
124. Kwon M., Fernández J. R., Zegarek G. F., Lo S. B., Firestein B. L. BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin. *J Neurosci.* 2011 Jun 29;31(26):9735-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6785-10.2011.
125. Lang U. E., Hellweg R., Seifert F., Schubert F., Gallinat J. Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity. *Biol Psychiatry.* 2007 Sep 1;62(5):530-5. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.01.002.
126. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
127. LaVallie E. R., DiBlasio-Smith E. A., Collins-Racie L. A., Lu Z., McCoy J. M. Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in *E. coli*. *Methods Mol Biol.* 2003; 205:119-40.
128. Le Blanc J., Fleury S., Boukhatem I., Bélanger J.-C., Welman M., Lordkipanidzé M. Platelets Selectively Regulate the Release of BDNF, But Not That of Its Precursor Protein, proBDNF. *Front Immunol.* 2020 Nov 25;11:575607. doi: 10.3389/fimmu.2020.575607.
129. Lee B.-H., Kim Y.-K. BDNF mRNA expression of peripheral blood mononuclear cells was decreased in depressive patients who had or had not recently attempted suicide. *J Affect Disord.* 2010 Sep;125(1-3):369-73. doi: 10.1016/j.jad.2010.01.074.
130. Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology,* 2003, 69, 341–374. doi:10.1016/S0301-0082(03)00019-4.
131. Li H., Lin L.-Y., Zhang Y., Lim Y., Rahman M., Beck A., Al-Hawwas M., Feng S., Bobrovskaya L., Zhou X.-F. Pro-BDNF Knockout Causes Abnormal

- Motor Behaviours and Early Death in Mice. *Neuroscience*. 2020 Jul 1;438:145-157. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.007.
132. Li Y.-J., Xu M., Gao Z.-H., Wang Y.-Q., Yue Z., Zhang Y.-X., Li X.-X., Zhang C., Xie S.-Y., Wang P.-Y. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. *PLoS One*. 2013 May 21;8(5): e63648. doi: 10.1371/journal.pone.0063648.
 133. Lieb K., Dreimuller N., Wagner S., Schlicht K., Falter T., Neyazi A. BDNF plasma levels and BDNF exon IV promoter methylation as predictors for antidepressant treatment response. *Front Psychiatr*. 2018; 9:511. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00511.
 134. Lim Y. Y., Laws S. M., Perin S., Pietrzak R. H., Fowler C., Masters C. L., Maruff P., AIBL Research Group. BDNF VAL66MET polymorphism and memory decline across the spectrum of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav*. 2021 Jun;20(5):e12724. doi: 10.1111/gbb.12724.
 135. Lim Y., Zhong J.-H., Zhou X.-F. Development of mature BDNF-specific sandwich ELISA. *J Neurochem*. 2015 Jul;134(1):75-85. doi: 10.1111/jnc.13108.
 136. Lin C.-C., Tsai M.-C., Lee C.-T., Sun M.-H., Huang T.-L. Antidepressant treatment increased serum miR-183 and miR-212 levels in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res*. 2018 Dec;270:232-237. doi: 10.1016/j.psychres.2018.09.025.
 137. Liu W., Ge T., Leng Y., Pan Z., Fan J., Yang W., Cui R. The role of neuronal plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. *Neural Plast*. 2017; 2017: 6871089. doi: 10.1155/2017/6871089.
 138. Liu Y., Yang X., Zhao L., Zhang J., Li T., Ma X. Increased miR-132 level is associated with visual memory dysfunction in patients with depression. *Neuropsychiatric Dis Treat*. 2016; 12:2905–2911. doi: 10.2147/NDT.S116287.
 139. Loomans E. E., Roelen A. J., Van Damme H. S., Bloemers H. P., Gribnau T. C., Schielen W. J. Assessment of the functional affinity constant of monoclonal antibodies using an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods*. 1995 Aug 18;184(2):207-217. doi: 10.1016/0022-1759(95)00089-s.

140. Lopez J. P., Mamdani F., Labonte B., Beaulieu M. M., Yang J. P., Berlim M. T. et al. Epigenetic regulation of BDNF expression according to antidepressant response. *Mol Psychiatry*. 2013 Apr;18(4):398-9. doi: 10.1038/mp.2012.38.
141. Lopresti A. L., Maker G. L., Hood S. D., Drummond P. D. A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2014, 48, 102–111.
142. Louhivuori V., Arvio M., Soronen P., Oksanen V., Paunio T., Castrén M. L. The Val66Met polymorphism in the BDNF gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res.* 2009 Jul;85(1):114-7. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.01.005.
143. Luo H.-Y., Rahman M., Bobrovskaya L., Zhou X.-F. The level of proBDNF in blood lymphocytes is correlated with that in the brain of rats with photothrombotic ischemic stroke. *Neurotox Res.* 2019 Jul;36(1):49-57. doi: 10.1007/s12640-019-00022-0.
144. Luscher C., Malenka R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Jun 1;4(6): a005710. doi: 10.1101/cshperspect.a005710.
145. Ma D. K., Jang M.-H., Guo J. U., Kitabatake Y., Chang M.-L., Pow-Anpongkul N., Flavell R. A., Lu B., Ming G.-L., Song H. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science.* 2009 Feb 20;323(5917):1074-7. doi: 10.1126/science.1166859.
146. Malhi G. S., Mann J. J. Depression. *Lancet.* 2018 Nov 24;392(10161):2299-2312. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31948-2.
147. Malik S., Singh R., Arora G., Dangol A., Goya S. Biomarkers of Major Depressive Disorder: Knowing is Half the Battle. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2021 Feb 28;19(1):12-25. doi: 10.9758/cpn.2021.19.1.12.
148. Mandolini G. M., Lazzaretti M., Pigoni A., Delvecchio G., Soares J. C., Brambilla P. The impact of BDNF Val66Met polymorphism on cognition in

Bipolar Disorder: A review: Special Section on "Translational and Neuroscience Studies in Affective Disorders" Section Editor, Maria Nobile MD, PhD. This Section of JAD focuses on the relevance of translational and neuroscience studies in providing a better understanding of the neural basis of affective disorders. The main aim is to briefly summaries relevant research findings in clinical neuroscience with particular regards to specific innovative topics in mood and anxiety disorders. J Affect Disord. 2019 Jan 15;243:552-558. doi: 10.1016/j.jad.2018.07.054.

149. Manchia M., Isayeva U., Collu R., Primavera D., Deriu L. et al. Converging Evidence Points to BDNF as Biomarker of Depressive Symptoms in Schizophrenia-Spectrum Disorders. Brain Sci. 2022 Dec 4;12(12):1666. doi: 10.3390/brainsci12121666.
150. Marie C., Pedard M., Quirié A., Tessier A., Garnier P., Totoson P., Demougeot C. Brain-derived neurotrophic factor secreted by the cerebral endothelium: A new actor of brain function? J Cereb Blood Flow Metab. 2018 Jun;38(6):935-949. doi: 10.1177/0271678X18766772.
151. Martinelli S., Anderzhanova E. A., Bajaj T., Wiechmann S., Dethloff F., Weckmann K. et al. Stress-primed secretory autophagy promotes extracellular BDNF maturation by enhancing MMP9 secretion Nat Commun. 2021 Jul 30;12(1):4643. doi: 10.1038/s41467-021-24810-5.
152. Martinowich K., Hattori D., Wu H., Fouse S., He F., Hu Y., Fan G., Sun Y. E. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. Science. 2003 Oct 31;302(5646):890-3. doi: 10.1126/science.1090842.
153. Martinowich K., Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. Neuropsychopharmacology. 2008 Jan;33(1):73-83. doi: 10.1038/sj.npp.1301571.
154. McHughen S. A., Rodriguez P. F., Kleim J. A., Kleim E. D., Crespo L. M., Procaccio V., Cramer S. C. BDNF Val66Met Polymorphism Influences Motor System Function in the Human Brain. Cereb Cortex. 2010 May; 20(5): 1254–1262. doi: 10.1093/cercor/bhp189.

155. Molendijk M. L., Haffmans J. P. M., Bus B. A. A., Spinhoven P., Penninx B. W. J. H., Prickaerts J., Voshaar R. C. O., Elzinga B. M. Serum BDNF concentrations show strong seasonal variation and correlations with the amount of ambient sunlight. *PLoS One*. 2012;7(11): e48046. doi: 10.1371/journal.pone.0048046.
156. Monnier A., Prigent-Tessier A., Quirié A., Bertrand N., Savary S., Gondcaille C., Garnier P., Demougeot C., Marie C. Brain-derived neurotrophic factor of the cerebral microvasculature: a forgotten and nitric oxide-dependent contributor of brain-derived neurotrophic factor in the brain. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Apr;219(4):790-802. doi: 10.1111/apha.12743. Epub 2016 Jul 15.
157. Montag C., Basten U., Stelzel C., Fiebach C. J., Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism and anxiety: support for animal knock-in studies from a genetic association study in humans. *Psychiatry Res*. 2010 Aug 30;179(1):86-90. doi: 10.1016/j.psychres.2008.08.005.
158. Mellios N., Huang H.S., Grigorenko A., Rogaev E., Akbarian S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 1;17(19):3030-42. doi: 10.1093/hmg/ddn201.
159. Montag C., Weber B., K Fliessbach, Elger C., Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. *Psychol Med*. 2009 Nov;39(11):1831-9. doi: 10.1017/S0033291709005509.
160. Morozova A., Zorkina Y., Abramova O., Pavlova O., Pavlov K., Soloveva K., Volkova M., Alekseeva P., Andryshchenko A., Kostyuk G., Gurina O., Chekhonin V. Neurobiological highlights of cognitive impairment in psychiatric disorders. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 22;23(3):1217. doi: 10.3390/ijms23031217.
161. Morozova A., Zorkina Y., Pavlov K., Pavlova O., Abramova O., Ushakova V., Mudrak A.V., Zozulya S., Otman I., Sarmanova Z., Klyushnik T., Reznik A., Kostyuk G., Chekhonin V. Associations of genetic polymorphisms and neuroimmune markers with some parameters of frontal lobe dysfunction in

- schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2021; 12: 655178. doi: 10.3389/fpsy.2021.655178.
162. Mowla S. J., Farhadi H. F., Pareek S., Atwal J. K., Morris S. J., Seidah N. G. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):12660-6. doi: 10.1074/jbc.M008104200.
 163. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 1992; 24:17-27.
 164. Mustapic M., Eitan E., Werner Jr J. K., Berkowitz S. T., Lazaropoulos M. P., Tran J., Goetzl E. J., Kapogiannis D. Plasma Extracellular Vesicles Enriched for Neuronal Origin: A Potential Window into Brain Pathologic Processes. *Front Neurosci*. 2017 May 22; 11:278. doi: 10.3389/fnins.2017.00278.
 165. Naegelin Y., Dingsdale H., Säuberli K., Schädelin S., Kappos L., Barde Y.-A. Measuring and Validating the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Serum. *eNeuro*. 2018 Mar 22;5(2): ENEURO.0419-17.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0419-17.2018.
 166. Nakamura R. M. Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. *Clin Physiol Biochem*. 1983;1(2-5):160-72.
 167. Nassan M., Veldic M., Winham S., Frye M. A., Larrabee B., Colby C., Biernacka J., Bellia F., Pucci M., Terenius L., Vukojevic V., D'Addario C. Methylation of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Val66Met CpG site is associated with early onset bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2020 Apr 15;267:96-102. doi: 10.1016/j.jad.2020.02.002.
 168. Nawa H., Carnahan J., Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci*. 1995 Jul 1;7(7):1527-35. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01148.x.
 169. Nibuya M., Morinobu S., Duman R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug

- treatments. *J Neurosci*. 1995 Nov;15(11):7539-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-11-07539.19950.
170. Noga O., Englmann C., Hanf G., Grützkau A., Seybold J., Kunkel G. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy*. 2003 May;33(5):649-54. doi: 10.1046/j.1365-2222.2003.01586.x.
 171. Nolan M., Roman E., Nasa A., Levins K. J., O'Hanlon E., O'Keane V., Roddy D. W. Hippocampal and Amygdalar Volume Changes in Major Depressive Disorder: A Targeted Review and Focus on Stress. *Chronic Stress* (Thousand Oaks). 2020 Sep 22; 4: 2470547020944553. doi: 10.1177/2470547020944553.
 172. Okamoto T., Yoshimura R., Ikenouchi-Sugita A., Hori H., Umene-Nakano W., Inoue Y., Ueda N., Nakamura J. Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Jul 1;32(5):1185-90. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.02.009.
 173. Otte C., Gold S., Penninx B. Pariante C. M., Etkin A., Fava M., Mohr D. C., Schatzberg A. F. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Sep 15;2: 16065. doi: 10.1038/nrdp.2016.65.
 174. Pan W., Banks W. A., Fasold M. B., Bluth J., Kastin A. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *J. Neuropharmacology*. 1998 Dec;37(12):1553-61. doi: 10.1016/s0028-3908(98)00141-5.
 175. Pandey G. N., Dwivedi Y., Rizavi H. S., Ren X., Zhang H., Pavuluri M. N. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 May 30;34(4):645-51. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.03.003.
 176. Patabendige A., Singh A., Jenkins S., Sen J., Chen R. Astrocyte Activation in Neurovascular Damage and Repair Following Ischaemic Stroke. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 20;22(8):4280. doi: 10.3390/ijms22084280.

177. Peng S., Li W., Lv L., Zhang Z., Zhan X. BDNF as a biomarker in diagnosis and evaluation of treatment for schizophrenia and depression. *Discov Med*. 2018 Oct;26(143):127-136.
178. Peters R. B., Xavier J., Mondin T. C., de A Cardoso T., Ferreira F. B., Teixeira L., Gräeff K., de A Quevedo L., Jansen K., Souza L. D., Oses J. P., Pinheiro R. T., da Silva R. A., Ghisleni G. BDNF Val66Met polymorphism and resilience in major depressive disorder: the impact of cognitive psychotherapy. *Randomized Controlled Trial Braz J Psychiatry*. 2021 Feb 1;43(1):22-28. doi: 10.1590/1516-4446-2019-0726.
179. Petryshen T. L., Sabeti P. C., Aldinger K. A., Fry B., Fan J. B., Schaffner S. F., Waggoner S. G., Tahl A. R., Sklar P. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry*. 2010 Aug;15(8):810-5. doi: 10.1038/mp.2009.24.
180. Pezawas L., Verchinski B. A., Mattay V. S., Callicott J. H., Kolachana B. S., Straub R. E., Egan M. F., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D. R. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci*. 2004 Nov 10;24(45):10099-102. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2680-04.2004.
181. Phillips C. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plast*. 2017;2017: 7260130. doi: 10.1155/2017/7260130.
182. Pius-Sadowska E., Machaliński B. BDNF - A key player in cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. 2017 Sep; 110:54-60. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.07.007.
183. Pivac N., Kim B., Nedić G., Joo Y. H., Kozarić-Kovačić D., Hong J. P., Muck-Seler D. Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in croatian and korean healthy participants. *Croat Med J*. 2009 Feb;50(1):43-8. doi: 10.3325/cmj.2009.50.43.
184. Pluchino N., Cubeddu A., Begliuomini S., Merlini S., Giannini A., Bucci F., Casarosa E., Luisi M., Cela V., Genazzani A. R. Daily variation of brain-derived

- neurotrophic factor and cortisol in women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause. *Hum Reprod.* 2009 Sep;24(9):2303-9. doi: 10.1093/humrep/dep119.
185. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Metalcholate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation // *Nature.* 1975. V. 258. P. 598–599.
 186. Poyhonen S., Er S., Domanskyi A., Airavaara M. Effects of Neurotrophic Factors in Glial Cells in the Central Nervous System: Expression and Properties in Neurodegeneration and Injury. *N Front Physiol.* 2019 Apr 26;10:486. doi: 10.3389/fphys.2019.00486.
 187. Prowse N., Hayley S. Microglia and BDNF at the crossroads of stressor related disorders: Towards a unique trophic phenotype. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021 Dec; 131: 135-163. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.09.018.
 188. Qin L., Jing D., Parauda S., Carmel J., Ratan R.R., Lee F.S., Cho S. An adaptive role for BDNF Val66Met polymorphism in motor recovery in chronic stroke. *J Neurosci.* 2014 Feb 12;34(7):2493-502. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4140-13.2014.
 189. Qin L., Kim E., Ratan R., Lee F.S., Cho S. Genetic variant of BDNF (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing antiangiogenic mediator CD36 expression. *J Neurosci.* 2011 Jan 12;31(2):775-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4547-10.2011.
 190. Radka S. F., Holst P. A., Fritsche M., Altar C. A. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res.* 1996 Feb 12;709(1):122-301. doi: 10.1016/0006-8993(95)01321-0.
 191. Ramesh V., Venkatesan V., Chellathai D., Silamban S. Association of Serum Biomarker Levels and BDNF Gene Polymorphism with Response to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Indian Patients with Major Depressive Disorder. *Neuropsychobiology.* 2021;80(3):201-213. doi: 10.1159/000507371.

192. Ramezani M., Ruskey J.A., Martens K., Kibreab M., Javer Z., Kathol I., Hammer T., Cheetham J., Leveille E., Martino D., Sarna J. R., Gan-Or Z., Pfeffer G., Ismail Z., Monchi O. Association Between BDNF Val66Met Polymorphism and Mild Behavioral Impairment in Patients With Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2021 Jan 14;11:587992. doi: 10.3389/fneur.2020.587992.
193. Rana T., Behl T., Sehgal A., Srivastava P., Bungau S. Unfolding the Role of BDNF as a biomarker for treatment of depression. *J Mol Neurosci.* 2021 Oct;71(10):2008-2021. doi: 10.1007/s12031-020-01754-x.
194. Rasmusson A. M., Shi L., Duman R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Aug;27(2):133-42. doi: 10.1016/S0893-133X(02)00286-5.
195. Redei E. E., Mehta N. S. The promise of biomarkers in diagnosing major depression in primary care: the present and future. *Curr Psychiatry Rep.* 2015 Aug;17(8):601. doi: 10.1007/s11920-015-0601-1.
196. Renart J., Reiser J., Stark G.R. Transfer of proteins from gels to diazobenzylloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Jul;76(7):3116-20.
197. Rihmer Z., Gonda X., Döme P., Serafini G., Pompili M. Suicid risk in mood disorders - can we better prevent suicide than predict it? *Psychiatr Hung.* 2018;33(4):309-315.
198. Rosa R. F., Ugolini-Lopes M. R., Gandara A. P. R., Vendramini M. B. G., Campanholo K. R., Dutra L., de Andrade D. C. O. Cognitive dysfunction and serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in primary anti-phospholipid syndrome (PAPS). *Rheumatology (Oxford).* 2021 Jan 5;60(1):179-187. doi: 10.1093/rheumatology/keaa252.
199. Roy B., Shelton R. C., Dwivedi Y. DNA methylation and expression of stress related genes in PBMC of MDD patients with and without serious suicidal ideation.

- Journal of Psychiatric Research, 2017, 89, 115–124. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.005.
200. Saris P. E., Paulin L. Easy selection of recombinant clones. *Biotechniques*. 1990 Dec;9(6):694, 696-7.
 201. Sartorius A., Hellweg R., Litzke J., Vogt M., Dormann C., Vollmayr B., Danker-Hopfe H., Gass P. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry*. 2009 Nov;42(6):270-6. doi: 10.1055/s-0029-1224162.
 202. Seo M. K., Ly N. N., Lee C. H., Cho H. Y., Choi C. M., Nhu L. H., Lee J. G., Lee B. J., Kim G.-M., Yoon B. J., Park S. W., Kim Y. H. Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 2016 Jun; 105:388-397. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.009.
 203. Shimizu E., Hashimoto K., Iyo M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Apr 1;126B(1):122-3. doi: 10.1002/ajmg.b.20118.
 204. Sidhu M. K., Thompson P. J., Wandschneider B., Foulkes A., de Tisi J., Stretton J., Perona M., Thom M., Bonelli S. B., Burdett J., Williams E., Duncan J. S., Matarin M. The impact of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on cognition and functional brain networks in patients with intractable partial epilepsy. *CNS Neurosci Ther*. 2019 Feb;25(2):223-232. doi: 10.1111/cns.13003.
 205. Singh S., Roy D., Marzouk T., Zhang J.-P. Peripheral Blood Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with First Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Sci*. 2022 Mar 22;12(4):414. doi: 10.3390/brainsci12040414.
 206. Smisek D. L., Hoagland D. A. Electrophoresis of flexible macromolecules: evidence for a new mode of transport in gels. *Science*. 1990 Jun 8;248(4960):1221-3.

207. Sohrabji F., Lewis D. K. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol.* 2006 Dec;27(4):404-14. doi: 10.1016/j.yfrne.2006.09.003.
208. Sokoloff P., Guillin O., Diaz J., Carroll P., Griffon N. Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders *Neurotox Res.* 2002 Nov-Dec;4(7-8):671-678. doi: 10.1080/1029842021000045499.
209. Stenz L., Zewdie S., Laforge-Escarra T., Prados J., La Harpe R., Dayer A., Paoloni-Giacobino A., Perroud N., Aubry J.-M. BDNF promoter I methylation correlates between post-mortem human peripheral and brain tissues. *Neurosci Res.* 2015 Feb; 91:1-7. doi: 10.1016/j.neures.2014.10.003.
210. Suire C., Eitan E., Shaffer N. C., Tian Q., Studenski S., Mattson M. P., Kapogiannis D. Walking Speed Decline in Older Adults is Associated with Elevated Pro-BDNF in Plasma Extracellular Vesicles. *Exp Gerontol.* 2017 Nov; 98: 209–216. doi: 10.1016/j.exger.2017.08.024.
211. Tadic A., Muller-Engling L., Schlicht K.F., Kotsiari A., Dreimuller N., Kleimann A. Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. *Mol Psychiatr.* 2014; 19:281–283. doi: 10.1038/mp.2013.58.
212. Tamura S., Suzuki H., Hirowatari Y., Hatase M., Nagasawa A., Matsuno K., Kobayashi S., Moriyama T. Release reaction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through PAR1 activation and its two distinct pools in human platelets. *Thromb Res.* 2011 Nov;128(5): e55-61. doi: 10.1016/j.thromres.2011.06.002.
213. Tartt A. N., Mariani M. B., Hen R., Mann J. J., Boldrini M. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications. *Mol Psychiatry.* 2022 Jun;27(6):2689-2699. doi: 10.1038/s41380-022-01520-y.
214. Teche S. P., Nuernberg G. L., Sordi A. O., de Souza L. H., Remy L., Ceresér K. M. M., Rocha N. S. Measurement methods of BDNF levels in major depression:

- a qualitative systematic review of clinical trials. *Psychiatr Q.* 2013 Dec;84(4):485-97. doi: 10.1007/s11126-013-9261-7.
215. Trifu S. C., Trifu A. C., Aluas E., Tataru M. A., Costea R. V. Brain changes in depression. *Rom J Morphol Embryol.* 2020 Apr-Jun;61(2):361-370. doi: 10.47162/RJME.61.2.06.
 216. Tsai S.-J. Down-regulation of the Trk-B signal pathway: the possible pathogenesis of major depression. *Med Hypotheses.* 2004;62(2):215-8. doi: 10.1016/S0306-9877(03)00299-8.
 217. Tsankova N. M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R. L., Nestler E. J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci.* 2006 Apr;9(4):519-25. doi: 10.1038/nn1659.
 218. Tylee D. S., Kawaguchi D. M., Glatt S. J. On the outside, looking in: a review and evaluation of the comparability of blood and brain "-omes". *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013 Oct;162B(7):595-603. doi: 10.1002/ajmg.b.32150.
 219. Verhagen M., van der Meij A., van Deurzen P.A., Janzing J.G., Arias-Vasquez A., Buitelaar J.K. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatr.* 2010;15: 260–271.
 220. Voineskos A. N., Lerch J. P., Felsky D., Shaikh S., Rajji T. K., Miranda D. et al. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and prediction of neural risk for Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry.* 2011, 68:198–206. 10.1001/archgenpsychiatry.2010.194.
 221. Walker F.R., Nilsson M., Jones K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets.* 2013 Oct;14(11):1262-76. doi: 10.2174/13894501113149990208
 222. Walsh J. J., Friedman A. K., Sun H., Heller E. A., Ku, S. M., Juarez B., Burnham V. L. et al. Stress gates neural activation of BDNF in the mesolimbic reward pathway. *Nat Neurosci.* 2014 Jan; 17(1): 27–29. doi: 10.1038/nn.3591.
 223. Wang H.-Y., Crupi D., Liu J., Stucky A., Cruciata G., Di Rocco A., Friedman E., Quartarone A., Ghilardi M. F. Repetitive transcranial magnetic stimulation

- enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte. *J Neurosci.* 2011 Jul 27;31(30):11044-54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2125-11.2011.
224. Wang M., Xie Y., Qin D. Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2021 Jan; 166: 172-184. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.005.
 225. Weaver K. R., Mustapic M., Kapogiannis D., Henderson W. A. Neuronal-enriched extracellular vesicles in individuals with IBS: A pilot study of COMT and BDNF. *Neurogastroenterol Motil.* 2022 Jan;34(1): e14257. doi: 10.1111/nmo.14257.
 226. Woods A. G., Wormwood K. L., Iosifescu D. V., Murrough J., Darie C. C. Protein Biomarkers in Major Depressive Disorder: An Update. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1140:585-600. doi: 10.1007/978-3-030-15950-4_35.
 227. Wu Z. W., Shi H., Chen D. C., Chen S., Xiu M. H., Zhang X. Y. BDNF serum levels and cognitive improvement in drug-naïve first episode patients with schizophrenia: A prospective 12-week longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology.* 2020 Dec; 122:104879. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104879.
 228. Yang J., Siao C.-J., Nagappan G., Marinic T., Jing D., McGrath K. et al. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 2009 Feb;12(2):113-5. doi: 10.1038/nn.2244.
 229. Yoshii A., Constantine-Paton M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 2007 Jun;10(6):702-11. doi: 10.1038/nn1903.
 230. Yoshii A., Constantine-Paton M. Post-synaptic BDNF-TrkB Signaling in Synapse Maturation, Plasticity and Disease. *Dev Neurobiol.* 2010 Apr; 70(5): 304–322. doi: 10.1002/dneu.20765.
 231. Yu Iu E. C., Chan C. B. Is Brain-Derived Neurotrophic Factor a Metabolic Hormone in Peripheral Tissues? *Biology (Basel).* 2022 Jul; 11(7): 1063. doi: 10.3390/biology11071063.

232. Zanos P., Gould T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*. 2018 Apr;23(4):801-811. doi: 10.1038/mp.2017.255.
233. Zagrebelsky M., Tacke C. Korte M. BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines. *Cell Tissue Res*. 2020 Oct;382(1):185-199. doi: 10.1007/s00441-020-03226-5.
234. Zhang X. Y., Liang J., Chen D. C., Xiu M. H., Yang F. D., Kosten T. A., Kosten T. R. Low BDNF is associated with cognitive impairment in chronic patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Jul;222(2):277-84. doi: 10.1007/s00213-012-2643-y.
235. Zhang X.-Y., Liu F., Chen Y., Guo W.-C., Zhang Z.-H. Proprotein convertase 1/3-mediated down-regulation of brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons induced by oxygen-glucose deprivation. *Neural Regen Res*. 2020 Jun;15(6):1066-1070. doi: 10.4103/1673-5374.270314.
236. Zhang J., Rong P., Zhang L., He H., Zhou T., Fan Y., Mo L. et al. IL4-driven microglia modulate stress resilience through BDNF-dependent neurogenesis. *Sci Adv*. 2021 Mar 17;7(12):eabb9888. doi: 10.1126/sciadv.abb9888.
237. Zhao M., Chen L., Yang J., Han D., Fang D., Qiu X., Yang X., Qiao Z. et al. BDNF Val66Met polymorphism, life stress and depression: A meta-analysis of gene-environment interaction. *J Affect Disord*. 2018 Feb; 227:226-235. doi: 10.1016/j.jad.2017.10.024.
238. Zhao X., Huang Y., Chen K., Li D., Han C., Kan Q. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is not associated with schizophrenia: an updated meta-analysis of 11,480 schizophrenia cases and 13,490 controls. *Psychiatry Res*. 2015 Jan 30;225(1-2):217-220. doi: 10.1016/j.psychres.2014.11.015.
239. Zheleznyakova G. Y., Cao H., Schioth H. B. BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders: literature review and open access database analysis. *Behav Brain Funct*. 2016, 12:17. DOI 10.1186/s12993-016-0101-4.

240. Zhu X., Chen D., Xiu M., Li S., Zhang X. Y. Serum BDNF levels, glycolipid metabolism in deficit schizophrenia: A case-control study Asian J Psychiatr. 2022 Mar; 69:103003. doi: 10.1016/j.ajp.2022.103003.