

*На правах рукописи*

**КУЛИКОВА  
ЕЛИЗАВЕТА АЛЕКСАНДРОВНА**

**ВЛИЯНИЕ ПСИХОТРОПНОГО ПРЕПАРАТА ТС-2153 НА  
ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ  
СИСТЕМЫ И НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА  
МЫШЕЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К  
НЕЙРОПАТОЛОГИИ**

03.03.01 - физиология

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в лаборатории нейрогеномики поведения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институте цитологии и генетики» СО РАН, г.Новосибирск.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор  
Попова Нина Константиновна

Официальные оппоненты: Колпаков Аркадий Ростиславович,  
доктор медицинских наук, профессор,  
ГБОУ ВПО НГМУ Министерства  
здравоохранения Российской Федерации,  
профессор кафедры фармакологии,  
клинической фармакологии и доказательной  
медицины

Лавриненко Валентина Александровна,  
кандидат биологических наук, доцент,  
ФГАОУ ВО ННИГУ (НГУ),  
профессор кафедры физиология

Ведущая организация: Федеральное государственное  
бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В.  
Ломоносова», Москва

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета по защите диссертаций (Д 001.014.01) на соискание ученой степени кандидата биологических наук в ФГБУ «НИИ ФФМ» СО РАН в конференц-зале института по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ ФФМ» СО РАН и на сайте [www.physiol.ru/diss/](http://www.physiol.ru/diss/).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к.б.н.

Бузуева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Депрессия - это тяжелое психическое заболевание. Известно, что 26% женщин и 12% мужчин в развитых странах страдают депрессией. По данным Всемирной Организации Здравоохранения к 2030 году этот недуг займет второе место среди заболеваний, связанных с потерей трудоспособности (Lam, Mok, 2008). Депрессия характеризуется нарушением баланса позитивных и негативных эмоций. Предполагают, что причиной депрессивной симптоматики является нарушения медиаторных систем мозга. Особое внимание отводится снижению функции серотониновой (5-НТ) системы (Maes, Meltzer, 1995; Van Praag, 2004). Главным доказательством участия 5-НТ системы является то, что антидепрессанты увеличивают концентрацию 5-НТ в мозге (Korte-Bouwens et al., 1996; Smolders et al., 2008; Qu et al, 2009).

Антидепрессанты - это группа лекарств, подавляющих симптомы депрессии. Большинство клинически эффективных антидепрессантов классифицируют по структуре и механизму действия на ингибиторы фермента разрушения 5-НТ - моноаминоксидазы А (МАОА) (Shih, Thompson, 1999) и транспортера 5-НТ (Lesch, 2004). Последние делятся на трициклические антидепрессанты, такие как имипрамин, и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, такие как флуоксетин. Эти соединения увеличивают концентрацию 5-НТ в синаптической щели, блокируя либо его разрушение, либо обратный захват.

К сожалению, все известные на сегодняшний день антидепрессанты имеют множество недостатков. Большинство из них могут в первые дни приема вызывать негативный эффект, обостряя депрессию. Это связано с активацией 5-НТ<sub>1A</sub> ауторецепторов, тормозящих импульсную активность 5-НТ нейронов в мозге. При чрезмерно длительном приеме препаратов происходит снижение мРНК и уровней ключевых белков серотониновой системы (Moret, Briley, 1992; Pineyro, Blier, 1999; Mirza et al., 2007). Еще одним недостатком антидепрессантов является необходимость принимать их в течение нескольких недель или даже месяцев для достижения терапевтического эффекта (Willner, 1990; Nestler et al. 2002). Это связано со временем, необходимым для снижения уровня белка и мРНК 5-НТ<sub>1A</sub> ауторецепторов (Blier, de Montigny, 1994), а также с длительной адаптацией и изменениями в нейротрофических путях, связанных с активацией нейротрофического фактора мозга BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), участвующего в процессах выживания и роста нейронов (Duman, 1998). Прием препаратов может привести к возникновению различных побочных эффектов, ухудшающих самочувствие и качество жизни пациентов. Эти данные объясняют, почему около 20-40% больных являются устойчивыми к антидепрессантам.

Поэтому поиск новых антидепрессантов является крайне актуальной задачей. В Новосибирском институте органической химии СО РАН было синтезировано соединение 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-

амин гидрохлорид (ТС-2153) – синтетический аналог варацина, входящий в семейство бензопентатиепинов. Синтезированное вещество ТС-2153 имеет низкую токсичность ( $LD_{50} > 1000$  мг/кг) и обладает анксиолитическим и антиконвульсивными действиями (Khomenko, et al., 2009; 2011). Потенциальные психотропные свойства этого соединения вызывают существенный интерес.

Ключевой проблемой при исследовании механизма действия известных и поиска новых антидепрессантов является выбор адекватной экспериментальной модели. В последние годы особое внимание уделяется генетическим моделям. Это связано с тем, что генетические факторы составляют от 40 до 70% риска появления депрессии. В Институте цитологии и генетики СО РАН содержатся линии мышей, отличающиеся по предрасположенности к наследственной каталепсии. Каталепсия – это гипертрофированная реакция замирания. Животное или человек в состоянии каталепсии не способны менять приданную им неудобную позу в течение длительного времени (Карманова, 1964; Klemm, 1989). У человека каталепсия часто наблюдается при серьезных нарушениях функций центральной нервной системы, таких как депрессия и шизофрения (Колпаков, 1990; Singerman, Raheja, 1994). На базе двух родительских линий - некаталептической АКР (0% каталептиков) и каталептической СВА (50% каталептиков) были созданы уникальные каталептические линии мышей: конгенная АКР линия М76С (АКР.СВА-D13Mit76) и АСС (Antidepressant Sensitive Catalepsy). Линия М76С была получена переносом главного локуса каталепсии из генома мышей линии СВА в геном АКР. Было показано, что 50% животных этой линии проявляют каталепсию, также мыши линии М76С характеризуются плохой обучаемостью в тесте Морриса и повышенной агрессивностью (Kulikov et al., 2008a; Кондаурова и др., 2010; Kulikov et al., 2014). Линия мышей АСС была получена путем селекции на предрасположенность к наследственной каталепсии. Около 75% животных этой линии проявляют каталепсию. Мыши линии АСС характеризуются множественными депрессивноподобными нарушениями поведения (Базовкина и др., 2005, Кондаурова и др., 2007; Дубровина и др., 2008; Тихонова и др., 2010). Хроническое введение классических антидепрессантов (флуоксетина и имипрамина) и однократное введение BDNF подавляют выраженность каталепсии у мышей этой линии (Тихонова и др., 2006; 2009a; 2009b).

Описанные особенности этих линий мышей, дают основание считать их, и прежде всего линию АСС, перспективными моделями для исследования участия 5-НТ системы и нейротрофического фактора мозга BDNF в механизмах наследственной нейропатологии, а также в механизмах действия психотропных препаратов.

**Целью** данной работы было изучение влияния препарата ТС-2153 (8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепина-6-амина гидрохлорида) на поведение, серотониновую систему и нейротрофический фактор мозга (BDNF) мышей, генетически предрасположенных к нейропатологии.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить морфологические особенности строения мозга у мышей с различной предрасположенностью к каталепсии;
2. Исследовать влияние препарата ТС-2153 на двигательную и исследовательскую активности, а также на тревожность и выраженность каталепсии;
3. Изучить возможности коррекции депрессивноподобного поведения у мышей линии ASC с помощью препарата ТС-2153;
4. Сопоставить поведенческие эффекты классических антидепрессантов (флуоксетина и имипрамина) и ТС-2153 у мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии;
5. Исследовать участие серотониновой системы (генов 5-HT<sub>1A</sub> рецептора, фермента MAOA, TTP-2 и транспортера серотонина) в механизме действия препарата ТС-2153;
6. Изучить влияние препарата ТС-2153 на уровень мРНК гена нейротрофического фактора мозга BDNF и гена одного из его транскрипционных факторов CREB (цАМФ-зависимый транскрипционный фактор).

**Научная новизна.** В нашей работе впервые показано, что

- 1) препарат ТС-2153 обладает антидепрессантными и антикаталептическими эффектами;
- 2) ТС-2153 снижает экспрессию генов, кодирующих 5-HT<sub>1A</sub> рецептор и MAOA, в среднем мозге;
- 3) ТС-2153 увеличивает экспрессию гена, кодирующего BDNF, в гиппокампе;
- 4) ТС-2153 не оказывает негативных побочных эффектов, таких как снижение двигательной и исследовательской активностей и увеличение тревожности, в отличие от классических антидепрессантов, флуоксетина и имипрамина;
- 5) мыши с наследственной предрасположенностью к каталепсии характеризуются меньшим размером гипофиза, чем некаталептические;
- 6) депрессивноподобная линия мышей ASC характеризуется меньшими размерами гипофиза, стриатума, мозолистого тела и промежуточного мозга по сравнению с родительскими линиями и линией AKR.CBA-D13Mit76.

**Теоретическая и научно-практическая ценность работы.** Основным вкладом этого исследования в изучение механизмов возникновения депрессии и способов ее коррекции является то, что были описаны эффекты соединения ТС-2153, такие как антидепрессантный и антикаталептический. Это соединение в средних дозах не оказывает видимых побочных эффектов на двигательную, исследовательскую активности и тревожность. Показано участие серотониновой системы и нейротрофического фактора мозга BDNF в механизме действия этого потенциального антидепрессанта. Обнаруженная связь морфологических изменений мозга и состояния каталепсии является

еще одним доводом в пользу использования линий мышей ASC и AKR.CBA-D13Mit76 как экспериментальных моделей психопатологии. Полученные данные используются в курсе лекций «Молекулярные механизмы поведения» для студентов 4 курса факультета естественных наук Новосибирского Государственного Университета.

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

1. Препарат ТС-2153 обладает антидепрессантными и антикаталептическими эффектами без видимых побочных эффектов на двигательную и исследовательскую активности, а также на тревожность у мышей линий CBA, ASC и AKR.CBA-D13Mit76;

2. Обнаружена связь морфологических изменений в мозге с наследственной предрасположенностью к каталепсии;

3. Животные линии ASC характеризуются уменьшением некоторых структур мозга по сравнению с родительскими линиями CBA, AKR и AKR.CBA-D13Mit76;

4. Серотониновая система и нейротрофический фактор мозга BDNF участвуют в механизме действия препарата ТС-2153.

**Апробация результатов.** Полученные результаты были представлены и обсуждены на 3 всероссийских и 3 международных конференциях.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 4 статьи в рецензируемых отечественных (1) и международных (3) журналах, 6 тезисов на всероссийских (3) и на международных конференциях (3).

**Структура и объем работы.** Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (226 источников). Работа изложена на 82 страницах, содержит 16 оригинальных рисунков и 6 таблиц.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовались мыши некаталептической линии AKR/J и каталептических линий: CBA/Lac, ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) и AKR.CBA-D13Mit76 (M76C). Животные содержались в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН. Все эксперименты были проведены в соответствии с российскими и зарубежными нормами гуманного обращения с животными.

### **Препараты**

Все препараты вводили в объеме 0.1 мл на 10 г веса, Животным контрольной группы вводили соответствующий растворитель в том же объеме.

В работе использовали соединение ТС-2153 в виде соли гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин. Было использовано два способа разведения препарата и два способа его введения. В первом ТС-2153 смешивали с каплей растворителя ТВИН-80, а затем доводили до нужного объема дистиллированной водой. Полученный раствор вводили в

желудок (per os) с помощью специального зонда. Во втором ТС-2153 разводили в 17% ДМСО и вводили внутривентриально. При per os введении эксперименты проводили на мышах линии ASC, использовали дозы 10, 20, 40 мг/кг веса для острого введения (1-2 дня) и 10 мг/кг веса для хронического (12-13 дней - для поведенческих тестов и 16 дней - для исследования экспрессии генов). При внутривентриальном введении эксперименты проводили на мышах линий AKR, CBA и M76C, использовали дозу 20 мг/кг веса для острого введения.

Клинически эффективные антидепрессанты флуоксетин и имипрамин (Sigma, USA), растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально в дозе 20 мг/кг мышам линий AKR, CBA и M76C.

#### **Поведенческие тесты**

Все поведенческие характеристики в тестах «открытое поле» (Kulikov et al., 2008), «предрасположенность к щипковой каталепсии» (Kulikov et al., 1993), «приподнятый крестообразный лабиринт» (Pорова, Kulikov, 1986) и «принудительное плавание» (Kulikov et al., 2010) оценивали по стандартным методикам. Поведение животных автоматически регистрировали при помощи цифровой видеокамеры, соединенной с компьютером, и анализировали, используя компьютерную программу EthoStudio (Kulikov et al., 2008).

#### **Магнитно-резонансная томография**

Для исследования морфологических различий в размерах мозга у животных *in vivo* мы использовали горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). Изображения головного мозга получали в трех проекциях: аксиальной, коронарной и сагиттальной. Интересующие структуры измеряли с помощью программного обеспечения ROI.

**Определение уровня экспрессии генов**, кодирующих белки 5HT<sub>1A</sub>-рецептор, MAOA, триптофангидроксилазу-2 (ТПГ-2), транспортер 5-НТ, нейротрофический фактор мозга BDNF и транскрипционный фактор CREB (*Htr1a*, *Maoa*, *Tph2*, *Slc6a4*, *Bdnf* и *Creb1*, соответственно), проводили при помощи количественного метода ОТ-ПЦР (Kulikov, Naumenko et al., 2005; Науменко, Куликов, 2006).

#### **Статистическая обработка**

Число животных-каталептиков представляли как процентное отношение от общего числа животных в каждой экспериментальной группе и сравнивали с помощью двухстороннего точного критерия Фишера. Общий объем мозга (мм<sup>3</sup>) и площади мозга (мм<sup>2</sup>) представлены как  $M \pm m$  и проанализированы с помощью ковариационного анализа ANOVA, где ковариантой выступала масса животных. Значения, полученные при сравнении поведенческих эффектов препаратов (ТС-2153, флуоксетина и имипрамина) у мышей разных линий в тестах «открытое поле», «принудительное плавание» и «приподнятый крестообразный лабиринт», представлены как  $M \pm m$  и проанализированы с помощью двухфакторного анализа ANOVA. Все остальные полученные результаты представлены как

$M \pm m$  и проанализированы с помощью однофакторного анализа ANOVA. Для сравнения различий между отдельными экспериментальными группами был использован post-hoc LSD тест Фишера. Предварительно данные были проверены на принадлежность крайних вариантов к совокупности, выбраковка осуществлялась по критерию Диксона (Закс, 1976).

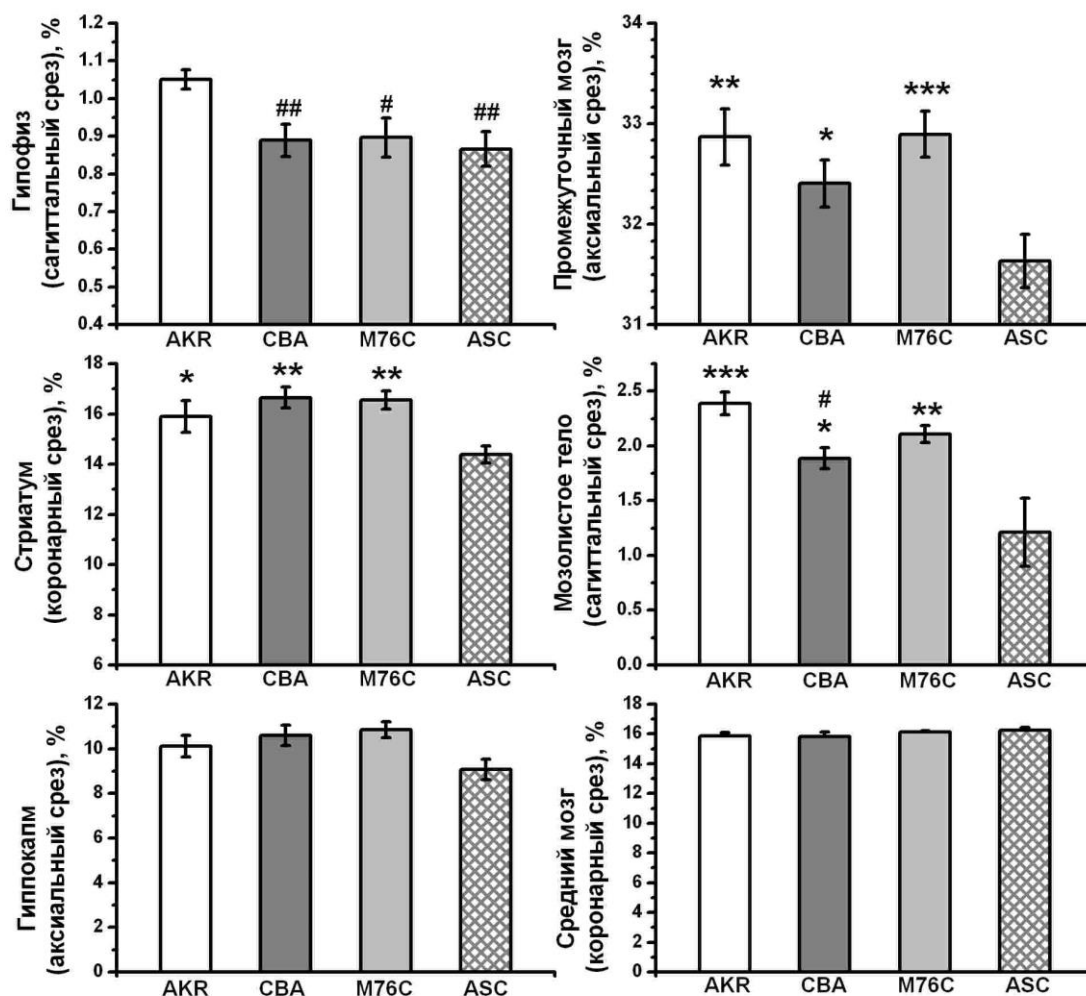
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Морфологические особенности мозга мышей, генетически предрасположенных к патологическому поведению**

Проведенные исследования показали ассоциацию между предрасположенностью к наследственной каталепсии и морфологическими изменениями в мозге. Размер гипофиза мышей каталептических линии (ASC, CBA и M76C) был достоверно меньше, чем у некаталептической линии мышей AKR ( $F_{3,34} = 9.07$ ,  $p < 0.001$ ). Это говорит о возможных изменениях в центральной нейроэндокринной регуляции.

Было показано, что самым маленьким гипофизом обладает линия мышей ASC, характеризующаяся наибольшим процентом каталептиков и депрессивноподобными нарушениями поведения. Помимо этого у этой линии было обнаружено резкое уменьшение стриатума ( $F_{3,34} = 4.59$ ,  $p < 0.01$ ), промежуточного мозга ( $F_{3,34} = 4.88$ ,  $p < 0.01$ ) и мозолистого тела ( $F_{3,33} = 8.21$ ,  $p < 0.001$ ). Подобные изменения в разной степени наблюдаются у пациентов, страдающих депрессией и шизофренией (Han et al., 2013; Macmaster et al., 2013). При депрессии наблюдается также резкое уменьшение размеров гиппокампа (Schweitzer et al., 2001), однако в нашей работе мы не обнаружили различий ни в этой структуре ( $F_{3,34} = 2.823$ ,  $p > 0.05$ ), ни в размерах среднего мозга ( $F_{3,33} = 0.8$ ) у исследованных групп (Рис.1). Возможно, что обнаруженные морфологические изменения в мозге у этих мышей связаны специфически с предрасположенностью к каталепсии, однако в настоящее время нет работ, посвященных влиянию каталепсии на морфологические изменения мозга у людей. Ранее было показано, что введение в мозг BDNF приводит к исчезновению каталепсии у мышей ASC и CBA (Тихонова и др., 2009b; Naumenko et al., 2012; Tikhonova et al., 2012). Поскольку известно, что BDNF участвует в нейрогенезе, то эти данные являются косвенным доказательством того, что каталепсия связана с нейродегенеративными процессами в мозге.





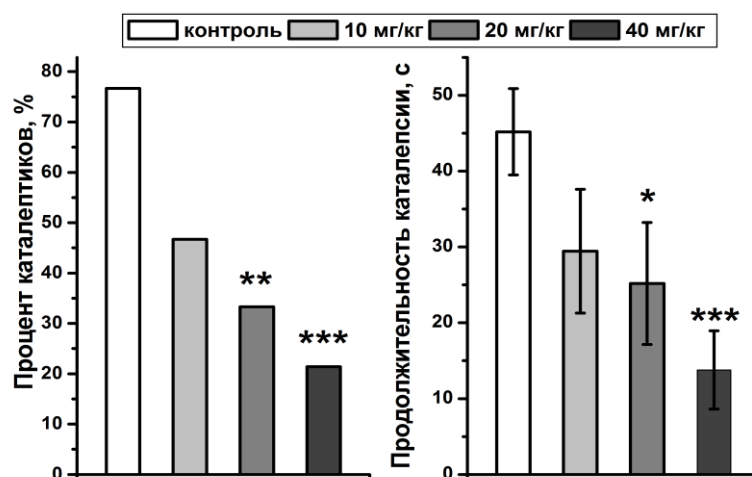
**Рис.1.** Размеры структур мозга у мышей, с генетической предрасположенностью к каталепсии: каталептиков - CBA, ASC и M76C; не каталептиков – AKR. Размеры структур представлены в процентах от общей площади мозга на соответствующем срезе.

$n=8-11$ ; #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$  по сравнению с AKR; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  по сравнению с ASC.

В то же время нами не было обнаружено существенных различий по объему ( $F_{3,33}=2.13$ ,  $p>0.05$ ) и площади мозга (аксиальный, коронарный и сагиттальный срезы) ( $F_{3,33} < 1$ ) у исследованных линий.

### **Влияние ТС-2153 на выраженность предрасположенности к «щипковой» каталепсии у мышей линии ASC**

В данном исследовании было обнаружено, что ТС-2153 достоверно уменьшал процент каталептиков ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ , дозы 20 и 40 мг/кг, соответственно) и время каталептического замирания ( $F_{3,69} = 4.10$ ,  $p<0.001$ ) у мышей ASC уже при однократном введении (Рис.2). В то же время, однократное введение классических антидепрессантов имипрамина (Тихонова и др., 2006) или флуоксетина (Тихонова и др., 2009а) в дозах 20 мг/кг не оказывало антикаталептического действия на мышей ASC. Полученный результат свидетельствует о том, что антикаталептическая активность ТС-2153 выше, чем у классических антидепрессантов.

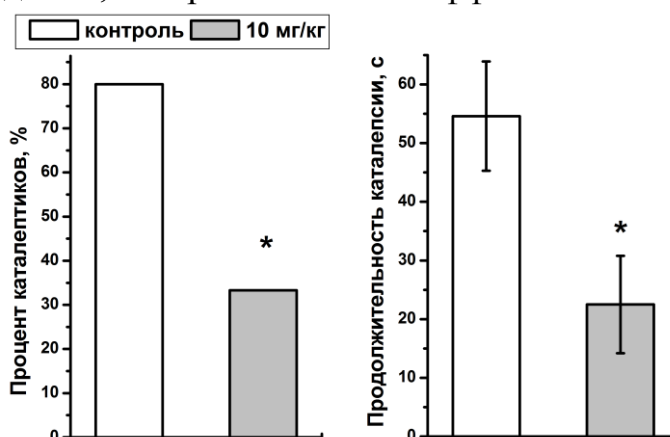


**Рис.2.** Изменение процента каталептиков и продолжительности катаlepsии у мышей линии ASC после острого введения различных доз ТС-2153 (10, 20, 40 мг/кг) и контроля.

$n=14-29$ ; \*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$  относительно контрольной группы.

При хроническом введении ТС-2153 (10 мг/кг, 12 дней) также достоверно уменьшал процент каталептиков ( $p<0.05$ ) и продолжительность катаlepsии ( $F_{1,28} = 6.60$ ,  $p<0.05$ ) у мышей линии ASC (Рис.3). Внутривентрикулярное введение классических антидепрессантов флуоксетина (Тихонова и др., 2009а) и имипрамина (Тихонова и др., 2006) (20 мг/кг, 14 дней) оказывало схожий антикаталептический эффект.

Следовательно, высокие дозы препарата ТС-2153 эффективны для подавления катаlepsии при однократном введении, тогда как более низкие дозы препарата эффективны при хроническом введении. Одна из основных проблем современных психотропных препаратов является необходимость их применения в течение длительного периода времени для получения терапевтического эффекта (Nestler et al., 2002), а способность ТС-2153 оказывать антикаталептический эффект, как при остром, так и при хроническом введении, говорит о высокой эффективности этого препарата.

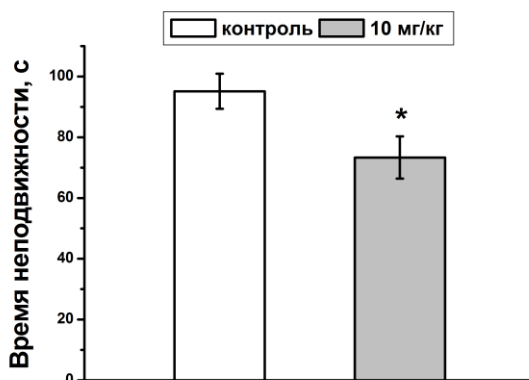


**Рис.3.** Изменение процента каталептиков и продолжительности катаlepsии у мышей линии ASC после хронического введения ТС-2153 (10 мг/кг).

$n=14-30$ ; \*  $p<0.05$ .

## Влияние ТС-2153 на поведение мышей линии ASC в тесте «принудительное плавание»

тест «принудительное плавание» (тест Порсолта) является классическим для определения эффективности клинических антидепрессантов. Однократное введение ТС-2153 снижало время неподвижности ( $F_{1,28} = 5.80$ ,  $p < 0.05$ ) (Рис.4) в этом тесте у мышей линии ASC. Таким образом, ТС-2153 оказывает антидепрессантный эффект.



**Рис.4.** Влияние ТС-2153 на время неподвижности в тесте «принудительное плавание».

$n=15$ ; \*  $p < 0.05$ .

## Влияние ТС-2153 на двигательную активность, исследовательскую активность и тревожность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»

Для изучения двигательной и исследовательской активности используют тест «открытое поле». Острое и хроническое введения ТС-2153 не повлияли на двигательную ( $F_{3,70} = 2.73$ ;  $F_{1,28} = 3.45$ ,  $p > 0.05$ , соответственно) и исследовательскую ( $F_{3,70} = 1.51$ ;  $F_{1,28} = 1.76$ ,  $p > 0.05$ , соответственно) активности у мышей линии ASC (Табл.1; Табл.2).

Основными тестами для оценки тревожности являются тест «открытое поле», где показателем анксиолитической активности является увеличение времени, проведенного в центре поля, и «приподнятый крестообразный лабиринт», где показателем является увеличение времени, проведенного в открытых рукавах (Kliethermes, 2005; Calabrese, 2008). Ни острое, ни хроническое введение ТС-2153 не оказали влияния на время, проведенное в открытых рукавах ( $F_{1,25} = 0.12$ ,  $F_{1,27} = 0.07$ , соответственно) (Табл.3). Однако высокая доза (40 мг/кг) ТС-2153 при остром введении достоверно снижала время в центре поля ( $F_{3,70} = 3.04$ ,  $p < 0.05$ ). Тогда как дозы 10 и 20 мг/кг при остром и доза 10 мг/кг при хроническом введении не оказали влияния на этот показатель ( $F_{1,28} = 2.22$ ,  $p > 0.05$ ) (Табл.1; Табл.2). Увеличение тревожности при остром введении антидепрессантов - частое явление в клинике и может быть спровоцировано даже средней дозой препарата (Birkett et al., 2011).

**Таблица 1.** Влияние острого введения ТС-2153 (10, 20, 40 мг/кг) на двигательную и исследовательскую активности, а также тревожность в тесте «открытое поле» у мышей линии ASC.

Исследуемые параметры	контроль	10 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг	F	p
Путь, см	785.7±37.89	911.2±48.84	842.5±70.89	679.0±65.36	$F_{3,70} = 2.73$	p>0.05
Число вертикальных стоек	13.8±1.98	12.7±2.02	18.0±3.36	10.2±1.98	$F_{3,70} = 1.51$	p>0.05
Время, проведенное в центре поля, %	14.2±1.81	17.2±1.61	11.1±1.58	8.3±2.50 *	$F_{3,69} = 3.04$	p<0.05

*n=14-30; \* p<0.05 относительно контрольной группы.*

**Таблица 2.** Влияние хронического введения ТС-2153 (10 мг/кг) на двигательную и исследовательскую активности, а также тревожность в тесте «открытое поле» у мышей линии ASC.

Исследуемые параметры	контроль	ТС-2153	F	p
Путь, см	653.5 ± 58.18	796.3 ± 50.13	$F_{1,28} = 3.45$	p>0.05
Число вертикальных стоек	4.6 ± 0.94	6.9 ± 1.48	$F_{1,28} = 2.22$	p>0.05
Время, проведенное в центре поля, %	17.8 ± 4.68	9.8 ± 2.51	$F_{1,28} = 1.76$	p>0.05

*n=15.*

**Таблица 3.** Влияние острого и хронического введений ТС-2153 (10 мг/кг) на поведение мышей линии ASC в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Воздействие	Время в открытых рукавах (%)		Значимость
	Контроль	ТС-2153	
Острое введение	31.5 ± 8.99	35.8 ± 7.88	$F_{1,25} = 0.12$
Хроническое введение (10 дней)	2.4 ± 1.69	3.1 ± 1.95	$F_{1,27} = 0.07$

*n=13-15.*

### **Сравнение влияния на поведение препарата ТС-2153 и классических антидепрессантов, ингибиторов обратного захвата серотонина, флуоксетина и имипрамина**

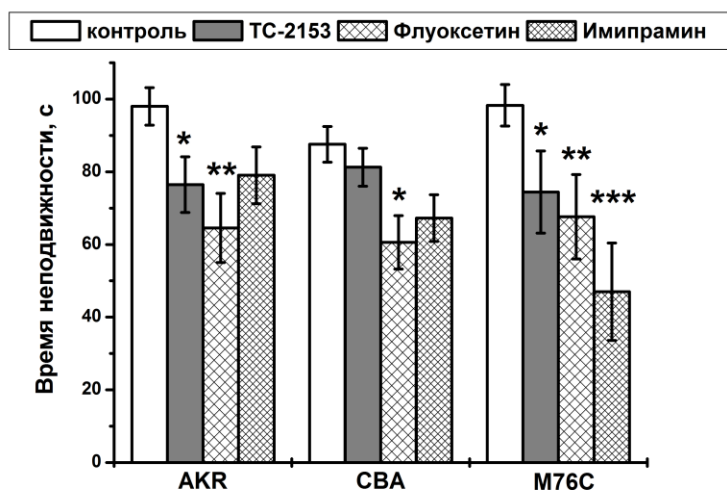
Не было обнаружено различий в поведении животных при введении им физиологического раствора или 17% ДМСО ни по одному из исследованных параметров в ниже приведенных тестах. В связи с этим, эти группы были объединены в одну контрольную группу.

В тесте «принудительное плавание» были обнаружены достоверные различия по времени неподвижности ( $F_{3,159} = 11.16$ ,  $p<0.001$ ). ТС-2153 уменьшал время неподвижности у мышей линий АКР ( $p<0.05$ ) и М76С ( $p<0.05$ ). Флуоксетин уменьшал время неподвижности у мышей всех исследуемых линий - АКР ( $p<0.01$ ), СВА ( $p<0.05$ ), М76С ( $p<0.01$ ). Имипрамин снижал время неподвижности только у одной линии М76С ( $p<0.001$ ). Таким образом, мы показали, что ТС-2153 оказывает выраженный антидепрессантный эффект в тесте «принудительное плавание», соизмеримый с действием клинически эффективных антидепрессантов. Наблюдаемые межлинейные различия в действии ТС-2153 на поведение

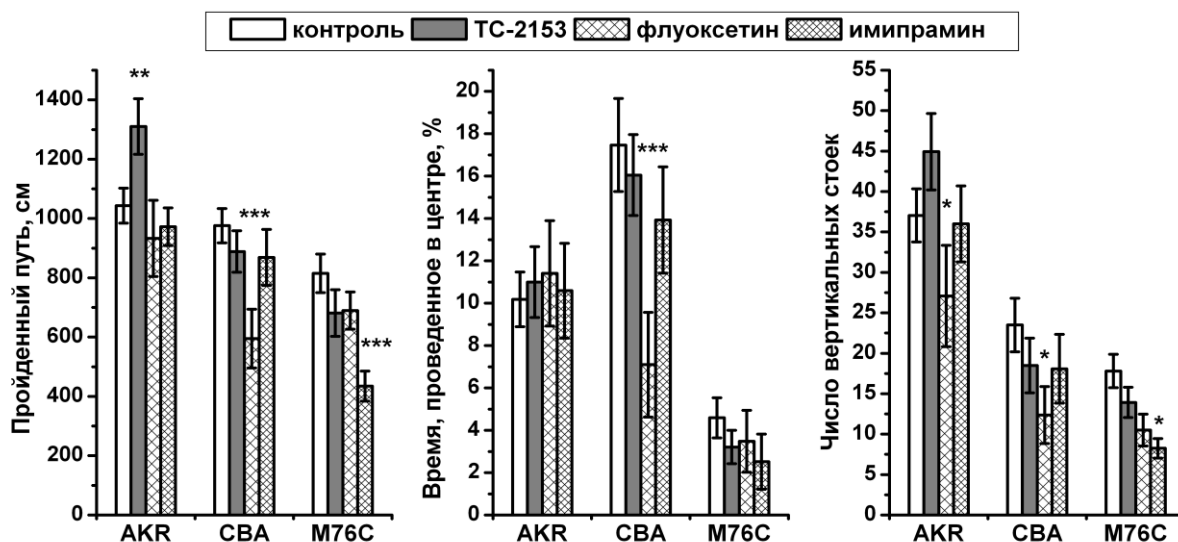
мышей в тесте «принудительное плавание» согласуются с отмеченным многими авторами влиянием генотипа на эффекты антидепрессантов (Servo et al., 2005; Kulikov et al., 2011) (Рис.5).

Несмотря на то, что флуоксетин оказывал антидепрессантный эффект на все три линии, он имел ряд негативных побочных эффектов, таких как: снижение двигательной и исследовательской активности («открытое поле»), повышение тревожности («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт») (Рис.6; Рис.7). Имипрамин подавлял двигательную и исследовательскую активности у М76С в тесте «открытое поле» (Рис.6). Препарат ТС-2153, в отличие от классических антидепрессантов, не проявлял негативных побочных эффектов на поведение. Более того, было обнаружено, что ТС-2153 увеличивает двигательную активность («открытое поле») и снижает тревожность («приподнятый крестообразный лабиринт») у мышей АКР (Рис.6; Рис.7).

В данном исследовании также было показано, что мыши линии М76С более чувствительны к действию антидепрессантов, чем животные линии СВА. Селекция, проводимая при создании линий М76С и АСC, привела к изменениям поведения в используемых тестах по сравнению с родительскими линиями. Известно, что эффекты антидепрессантов слабее проявляются на «нормальных» добровольцах, чем на депрессивных пациентах (Willner, 1990). Высокую чувствительность каталептических линий АСC и М76С к антидепрессантам можно рассматривать как еще одно доказательство связи наследственной каталепсии с механизмами депрессии.

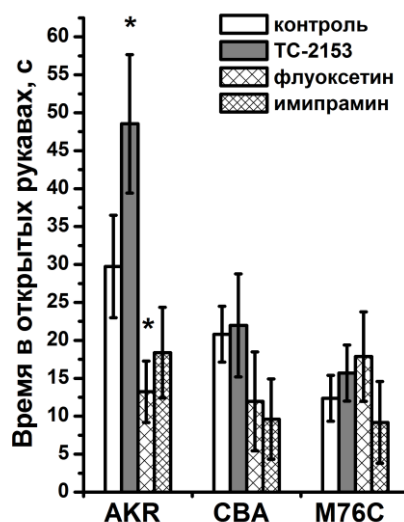


**Рис.5.** Влияние острого введения ТС-2153, имипрамина и флуоксетина в дозе 20 мг/кг на время неподвижности в тесте «принудительное плавание».  $n=7-22$ ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контрольными животными этой же линии.



**Рис.6.** Влияние острого введения ТС-2153, имипрамина и флуоксетина в дозе 20 мг/кг на пройденный путь, количество вертикальных стоек и на время, проведенное в центре, в тесте «открытое поле».

$n=12-21$ ; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  по сравнению с контрольными животными этой же линии.



**Рис.7.** Влияние острого введения ТС-2153, имипрамина и флуоксетина в дозе 20 мг/кг на время, проведенное в открытых рукавах, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

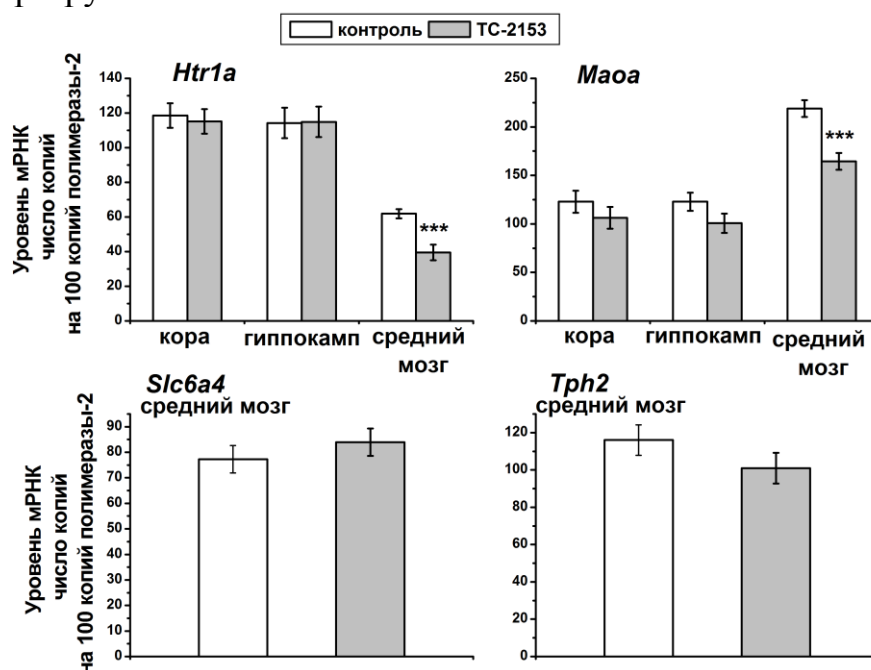
$n=7-26$ ; \*  $p<0.05$  по сравнению с контрольными животными этой же линии.

### Участие серотониновой системы в механизме действия препарата ТС-2153

В данном исследовании было показано, что хроническое введение соединения ТС-2153 (16 дней) не повлияло на экспрессию генов, кодирующих ТПГ-2 (*Tph2*) ( $F_{1,16} = 1.69$ ,  $p>0.05$ ) и 5-НТ транспортер (*Slc6a4*) ( $F_{1,16} = 0.76$ ) в среднем мозге (Рис.8). В то же время, препарат оказал значительный эффект на экспрессию других ключевых генов 5-НТ системы – 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора (*Htr1a*) ( $F_{1,16} = 17.6$ ,  $p<0.001$ ) и МАОА (*Maoa*) ( $F_{1,16} = 19.5$ ,  $p<0.001$ ) в среднем мозге, однако не повлиял на экспрессию этих генов в коре

( $F_{1,16} = 0.11$  для *Htr1a* и  $F_{1,16} = 1.07$ ,  $p > 0.05$  для *Maoa*) и гиппокампе ( $F_{1,16} = 0.003$  для *Htr1a* и  $F_{1,16} = 2.68$ ,  $p > 0.05$  для *Maoa*) (Рис.8). Снижение экспрессии гена 5-НТ<sub>1A</sub> рецептора в телах 5-НТ нейронов говорит о влиянии соединения ТС-2153 на ауторецепторы этих нейронов. Подобная картина снижения уровня мРНК и белка 5-НТ<sub>1A</sub> ауторецепторов наблюдается при хроническом введении классических антидепрессантов (Blier, de Montigny, 1994), а также при действии анксиолитиков буспиронового ряда (Savitz et al., 2009) и агонистов 5НТ<sub>1A</sub> рецептора (Porova et al., 2010).

Можно предположить, что антикаталептический и антидепрессантный эффекты ТС-2153 связаны с увеличением концентрации 5-НТ в тканях мозга, которое возникает как результат уменьшения количества 5-НТ<sub>1A</sub>-ауторецепторов, блокирующих импульсную активность 5-НТ нейрона, и фермента разрушения 5-НТ - МАОА.



**Рис.8.** Влияние хронического введения ТС-2153 на уровень мРНК генов *Tph2* и *Scl6a4* в среднем мозге и генов *Htr1a* и *Maoa* в среднем мозге, коре и гиппокампе. Уровень мРНК генов *Tph2*, *Scl6a4*, *Htr1a* и *Maoa* в исследуемых структурах был рассчитан как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.

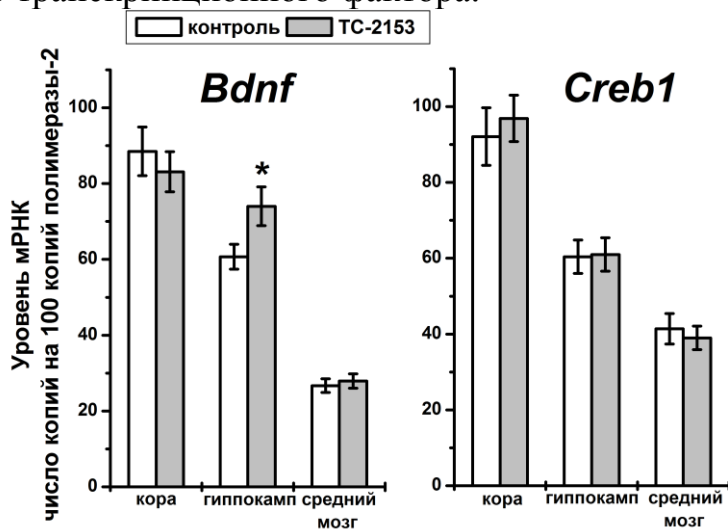
$n=8-9$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  относительно контрольной группы.

### **Влияние ТС-2153 на экспрессию генов нейротрофического фактора мозга BDNF и его транскрипционного фактора CREB**

В данной работе было показано, что ТС-2153 увеличивает уровень мРНК нейротрофического фактора мозга BDNF, кодируемого геном *Bdnf*, в гиппокампе ( $F_{1,18} = 4.81$ ,  $p < 0.05$ ) у мышей линии ASC, но не было обнаружено изменений по экспрессии данного гена в других исследованных структурах (Рис.9). Клинически эффективные антидепрессанты также увеличивают уровень мРНК гена *Bdnf* в гиппокампе, где наблюдается наибольшая концентрация этого нейротрофического фактора (Pandey et al.,



2010). В то же время, ТС-2153 не повлиял на экспрессию гена *Creb1*, который кодирует транскрипционный фактор CREB, ни в одной из исследованных структур мозга (Рис.9). Тот факт, что не было обнаружено изменений в экспрессии гена *Creb1* говорит о возможности увеличения экспрессии BDNF за счет другого транскрипционного фактора.



**Рис.9.** Влияние хронического введения ТС-2153 (10 мг/кг) на уровень мРНК генов *Bdnf* и *Creb1* во фронтальной коре, гиппокампе и среднем мозге. Уровень мРНК генов *Bdnf* и *Creb1* в исследуемых структурах был рассчитан как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.  $n=8-9$ ; \*  $p<0.05$  относительно контрольной группы.

### Заклучение

Таким образом, в данной работе была обнаружена связь морфологических изменений в мозге с наследственной предрасположенностью к каталепсии, а также с депрессивноподобным поведением. Обнаружены антикаталептический и антидепрессантный эффекты соединения ТС-2153 без видимых негативных побочных действий. В то же время было показано, что антидепрессантный эффект препарата зависит от генотипа. Полученные данные свидетельствуют о том, что оптимальной при остром введении является доза 20 мг/кг, а при хроническом введении достаточно дозы 10 мг/кг. Обнаруженные после введения ТС-2153 изменения поведения животных, а также изменения экспрессии генов в мозге можно считать доказательством способности ТС-2153 проходить гематоэнцефалический барьер.

Влияние ТС-2153 на 5-НТ систему головного мозга и на экспрессию гена нейротрофического фактора мозга BDNF, его антикаталептический и антидепрессантный эффекты, а также ранее показанные антиконвульсивный эффект и низкая токсичность (Khomenko et al., 2009), в сочетании с отсутствием влияния на двигательную активность, исследовательскую активность и тревожность, говорит о его психотропных свойствах и указывают на высокую эффективность.



## ВЫВОДЫ

1. Методом магнитно-резонансной томографии у мышей, различающихся по предрасположенности к наследственной каталепсии были выявлены различия в размерах некоторых структур мозга (гипофиз, промежуточный мозг, стриатум, мозолистое тело), при неизменном общем объеме мозга у этих животных.
2. Мыши конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76, генетически предрасположенные к каталепсии, характеризуются повышенной чувствительностью к действию антидепрессантов (имипрамин, флуоксетин, ТС-2153).
3. Выявлено существенное антидепрессантное действие ТС-2153 на мышей линий ASC, AKR и AKR.CBA-D13Mit76.
4. Выявлено существенное дозозависимое антикаталептическое действие ТС-2153 на мышей линии ASC.
5. Хроническое введение препарата ТС-2153 (10.0 мг/кг) оказывает антикаталептический эффект, но не оказывает влияния на двигательную активность, исследовательскую активность, тревожность в тесте «открытое поле» и тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей линии ASC.
6. В отличие от флуоксетина и имипрамина препарат ТС-2153 (10.0 и 20.0 мг/кг) не понижает двигательную и исследовательскую активности и не увеличивает тревожность у исследованных животных.
7. Выявлено влияние хронически вводимого ТС-2153 на экспрессию в среднем мозге ключевых генов, кодирующих белки серотониновой системы: снижение экспрессии гена *Htr1a*, кодирующего 5-HT<sub>1A</sub>-рецептор, и гена *Maoa*, кодирующего основной фермент разрушения серотонина MAOA.
8. При хроническом введении ТС-2153 обнаружено увеличение в гиппокампе уровня мРНК гена *Bdnf*, кодирующего нейротрофический фактор мозга BDNF, но не гена *Creb1*, кодирующего цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕФЕРИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ИЗ СПИСКА ВАК

1. Куликов, А.В. Влияние нового психотропного препарата гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амина на экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм и рецепцию медиатора серотонина, в головном мозге мышей / А.В. Куликов, М.А. Тихонова, Е.А. Куликова, Т.М. Хоменко, Д.В. Корчагина, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, Н.К. Попова // Мол. Биол. — 2011. — Т. 45. — № 2. — С. 282-288.

2. Kulikov, A.V. A new synthetic varacin analogue, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), decreased hereditary catalepsy and increased the BDNF gene expression in the hippocampus in mice / A.V. Kulikov, M.A. Tikhonova, **E.A. Kulikova**, K.P. Volcho, T.M. Khomenko, N.F. Salakhutdinov, N.K. Popova // *Psychopharmacology (Berl)*. — 2012. — Vol.221. — № 3. — P. 469-478.
3. Tikhonova, M.A. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response / M.A. Tikhonova, A.V. Kulikov, D.V. Bazovkina, **E.A. Kulikova**, A.S. Tsybko, E.Y. Bazhenova, V.S. Naumenko, A.E. Akulov, M.P. Moshkin, N.K. Popova // *Behav. Brain Res.* — 2013. — Vol.243. — P. 53-60.
4. Kulikov, A.V. Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): comparison with classical antidepressants / A.V. Kulikov, M.A. Tikhonova, **E.A. Kulikova**, K.P. Volcho, T.M. Khomenko, N.F. Salakhutdinov, N.K. Popova // *Lett Drug Des Discov.* — 2014. — Vol.11. — №. 2. — P. 169-173.

#### **ТЕЗИСЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В СБОРНИКАХ КОНФЕРЕНЦИЙ.**

1. **Куликова, Е.А.** Влияние нового психотропного препарата гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепина-6-амина на экспрессию генов серотониновой системы в головном мозге мышей линии ASC / **Е.А. Куликова** // XLVIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». — 2011. — Новосибирск.
2. Куликов, А.В. Участие генов, кодирующих метаболизм и рецепцию серотонина, в молекулярном механизме действия нового психотропного препарата гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепина-6-амина / А.В. Куликов, М.А. Тихонова, **Е.А. Куликова**, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, Н.К. Попова // II международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика и биоинформатика». — 2011. — Новосибирск.
3. **Куликова, Е.А.** Влияние нового психотропного препарата гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепина-6-амина на поведение и экспрессию генов BDNF и CREB в головном мозге мышей линии ASC / **Е.А. Куликова** // 50-ая юбилейная Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». — 2012. — Новосибирск.
4. **Kulikova, E.A.** Effect of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine-hydrochloride (TC-2153) on behavior and the BDNF gene expression in the mouse brain / **E.A. Kulikova** // International Summer School: “Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies”. — 2012. — Zvenigorod.

5. **Kulikova, E.A.** Hereditary catalepsy in mice is associated with brain dysmorphology / **E.A. Kulikova**, M.A. Tikhonova, A.V. Kulikov // FENS Featured Regional Meeting. — 2013. — Prague.
6. **Kulikova, E.A.** Antidepressant activity of new psychotic drug 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentatien-6-amine hydrochloride (TC-2153) in comparison with classical antidepressants / **E.A. Kulikova**, M.A. Tikhonova, A.V. Kulikov, N.K. Popova // FENS Featured Meeting. — 2014. — Milan.