

На правах рукописи

**СЕМЁНОВА
АЛИНА АСАТОВНА**

**ВЛИЯНИЕ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО
ФАКТОРА (GDNF) НА ПОВЕДЕНИЕ И
СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА МЫШЕЙ С
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К
ПАТОЛОГИЧЕСКОМУ ПОВЕДЕНИЮ**

03.03.01 - физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в лаборатории нейрогеномики поведения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Научный руководитель –

Нина Константиновна Попова, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ИЦиГ СО РАН

Официальные оппоненты:

Людмила Федоровна Гуляева, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» (НИИМББ, г. Новосибирск)

Марина Валерьевна Храпова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (НИИФФМ, г. Новосибирск)

Ведущая организация –

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН, г. Пущино, Московская область)

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в 10 час. на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, г. Новосибирск, а/я 237, ул. Тимакова 4).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ НИИФФМ www.physiol.ru/.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 001.014.01
д-р биол. наук

В.Н. Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Нейротрофические факторы играют важную роль в структурной целостности нервной системы, и потому могут быть хорошими кандидатами в качестве терапевтических агентов для лечения нейродегенеративных заболеваний. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF), являясь отдаленным родственником семейства трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), широко распространен в мозге и играет важную роль в развитии, дифференциации и выживании различных нейронных популяций (Lin et al., 1993; Airaksinen, Saarma, 2002). GDNF и его влияние на поведение в основном изучено в контексте патологий, связанных с дофаминовой системой мозга (Tomac et al., 1995b; Kearns et al., 1997; Gill et al., 2003; Slevin et al., 2007). В то же время, связь GDNF с другим медиатором мозга, участвующим в регуляции практически всех физиологических и поведенческих функций, серотонином (5-НТ), пока нельзя описать четкой схемой.

In vitro было показано стимулирующее влияние 5-НТ на экспрессию и синтез GDNF (Hisaoaka et al., 2004). Существуют данные, что у пациентов с депрессивными расстройствами уровень GDNF снижен в крови (Takebayashi et al., 2006; Otsuki et al., 2008; Diniz et al., 2011; Pallavi et al., 2013), а антидепрессанты, в том числе и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), повышают уровень GDNF в сыворотке крови (Zhang et al., 2008; 2010). Кроме того, антидепрессант из группы СИОЗС флуоксетин значительно увеличивал уровень GDNF в мозге мышей с моделируемой множественной системной атрофией (Ubhi et al., 2012). Таким образом, рассматривается участие GDNF в патогенезе депрессивных заболеваний.

Другим распространенным психиатрическим синдромом, в развитии которого участвует 5-НТ система мозга, являются обсессивно-компульсивные расстройства или навязчивые состояния (Вальтер, 2010). Данные о регулирующей роли GDNF в патогенезе навязчивых состояний малочисленны и противоречивы (Fontenelle et al., 2012; Tunca et al., 2015).

Каталепсия в природе – это защитно-оборонительная реакция, характеризующаяся замиранием животного при виде опасности. В гипертрофированном виде каталепсия рассматривается как патологическое состояние и синдром нарушения функционирования мозга (Singerman, Raheja, 1994). В Институте цитологии и генетики СО РАН изучаются линии мышей с предрасположенностью к каталепсии. Линия мышей ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy) была получена путем селекции на предрасположенность к каталептическому замиранию из популяции бэккросов между мышами некаталептической линии AKR и каталептической

линии СВА (Базовкина и др., 2005). 70-80 % мышей ASC проявляют стойкую реакцию каталепсии. Селекция на высокую предрасположенность к каталепсии привела к формированию депрессивноподобных характеристик поведения, и этим линия ASC отличается от родительской линии СВА (Базовкина и др., 2005; Тихонова и др., 2010). У мышей каталептических линий ASC и СВА увеличена функциональная активность 5-HT_{1A} рецепторов (Науменко и др., 2006), снижена функциональная активность 5-HT_{2A} рецепторов и снижен уровень мРНК 5-HT_{2A} рецепторов во фронтальной коре по сравнению с некаталептической линией AKR (Naumenko et al., 2010). Таким образом, у мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии наблюдаются серьезные изменения в 5-HT системе мозга. Роль GDNF в регуляции данного типа патологического поведения – генетически детерминированной щипковой каталепсии совершенно не освещена в литературе.

Исследование взаимовлияния 5-HT и GDNF может внести ясность в механизмы реализации патологического поведения и этиологию психических заболеваний, связанных с дисфункцией 5-HT системы мозга.

Целью данной работы было исследование влияния однократного центрального введения GDNF на поведение и экспрессию ключевых генов серотониновой системы в мозге у мышей каталептической линии ASC, которая также характеризуется депрессивноподобным поведением, и каталептической «недепрессивной» линии мышей СВА.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить влияние GDNF на двигательную активность, тревожность, пространственное обучение и патологические формы поведения – каталепсию, депрессивноподобное и стереотипное обсессивно-компульсивное поведение.

2. Определить влияние GDNF на экспрессию генов, кодирующих серотониновый транспортер (5-HTT), ключевой фермент синтеза серотонина в мозге триптофангидроксилазу-2 (ТПГ-2), а также 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} рецепторы и их функциональную активность.

Научная новизна:

1. Впервые было показано длительное снижение проявлений каталептического замирания мышей, генетически предрасположенных к каталепсии, в результате однократного центрального введения GDNF.

2. Установлено, что GDNF улучшает показатели обучения в водном лабиринте Морриса у мышей линии ASC.

3. Показано, что GDNF усиливает депрессивноподобное поведение мышей.
4. Обнаружено стимулирующее влияние GDNF на стереотипное обсессивно-компульсивное поведение мышей «депрессивной» линии ASC.
5. Под влиянием GDNF обнаружены значительные изменения в экспрессии ключевых генов серотониновой системы мозга мышей ASC.
6. Выявлена существенная роль генотипа в действии GDNF на поведение и на серотониновую систему мозга мышей.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты данной работы, полученные на моделях патологического поведения (каталептической «депрессивной» линии мышей ASC и не проявляющей депрессивноподобного поведения каталептической линии CBA), подтверждают существование взаимовлияния GDNF и серотониновой системы мозга. Вызванное однократным введением GDNF снижение выраженности генетически детерминированной каталепсии, снижение уровня тревожности, улучшение показателей обучения в водном тесте Морриса и изменения в экспрессии генов серотониновой системы указывают на нейропротекторный потенциал GDNF и свидетельствуют о перспективности GDNF для лечения нейродегенеративных и психических расстройств. С другой стороны, усугубление депрессивноподобного и обсессивно-компульсивного поведения у мышей свидетельствуют о неоднозначности поведенческих эффектов GDNF.

Положения, выносимые на защиту:

1. Однократное центральное введение GDNF оказывает генотипзависимое влияние на поведение и серотониновую систему мозга мышей. Мыши каталептической «депрессивной» линии ASC более чувствительны к GDNF, чем мыши «недепрессивной» линии CBA.
2. GDNF приводит к изменениям в поведении, как позитивным, таким как снижение выраженности каталепсии, снижения уровня тревожности и улучшение показателей обучения, так и негативным, таким как увеличение выраженности депрессивноподобного и обсессивно-компульсивного поведения.
3. Под действием GDNF у мышей линии ASC наблюдаются изменения в экспрессии ключевых генов серотониновой системы мозга.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены на 50-ой Международной научной студенческой конференции

«Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012), 7-ом сибирском съезде физиологов (Красноярск, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них 3 статьи в рецензируемых отечественных (1) и международных (2) журналах, 4 тезисов на всероссийских (3) и международных (1) конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (216 источников). Работа изложена на 98 страницах, содержит 16 рисунков и 8 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовались мыши каталептической линии СВА/Lac и каталептической «депрессивной» линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy). 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

GDNF (“Prepotech”, Англия) разводили в стерильной дистиллированной воде и вводили в дозе 0.8 мкг в объеме 5 мкл в левый боковой желудочек мозга (AP – 0.5 мм, L – 1.6 мм, DV – 2 мм) (Slotnick, Leonard, 1975). Контрольным животным вводили дистиллированную воду в эквивалентном объеме.

Селективные агонисты 5-НТ рецепторов (8-ОН-DPAT и DOI) растворяли в физиологическом растворе и вводили животным внутривентрикулярно в дозе 1.0 мг/кг.

Поведенческие тесты

Все поведенческие характеристики в тестах на щипковую каталепсию, «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «свет-темнота», принудительное плавание, «подвешивание за хвост», «закапывание шариков», водном лабиринте Морриса проводили по стандартным методикам. Поведение животных автоматически регистрировали при помощи цифровой видеокамеры, соединенной с компьютером, и анализировали, используя компьютерную программу EthoStudio (Kulikov et al., 2008).

Функциональную активность 5-НТ_{1A} рецепторов определяли по выраженности гипотермической реакции в ответ на введение селективного агониста 8-ОН-DPAT (Overstreet et al., 1996). Функциональная активность 5-НТ_{2A} рецепторов была определена по количеству опосредованных 5-НТ_{2A} рецепторами встряхиваний головой, вызванных агонистом 5-НТ_{2A} рецепторов – DOI (Canal, Morgan, 2012).

Определение уровня экспрессии генов, кодирующих белки 5HT_{1A}-рецептор, 5HT_{2A}-рецептор, триптофангидроксилазу-2 (ТПГ-2), 5-HT транспортер, проводили при помощи метода ОТ-ПЦР с использованием известных концентраций геномной ДНК мыши (линия C57BL/6J) в качестве внешнего стандарта и оценивали по числу копий кДНК на 100 копий кДНК глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, используемой в качестве внутреннего стандарта (Науменко, Куликов, 2006).

Статистическая обработка

Все данные представлены как $M \pm m$ и проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по Фишеру. Для оценки результатов, полученных в водном лабиринте Морриса, использовали дисперсионный анализ «repeated measures» ANOVA. Число животных-каталептиков представляли как процентное отношение от общего числа животных в каждой экспериментальной группе и сравнивали с помощью двухстороннего точного критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние GDNF на поведение мышей линий CBA и ASC

Однократное центральное введение GDNF значительно повлияло на поведение мышей обеих линий в тесте на щипковую каталепсию. Введение GDNF привело к снижению процента каталептиков среди линии ASC ($p < 0.05$; рис. 1А) и к значительному снижению времени неподвижности у мышей обеих линий ($F_{1,15} = 5.28$, $p < 0.05$, рис. 1Б).

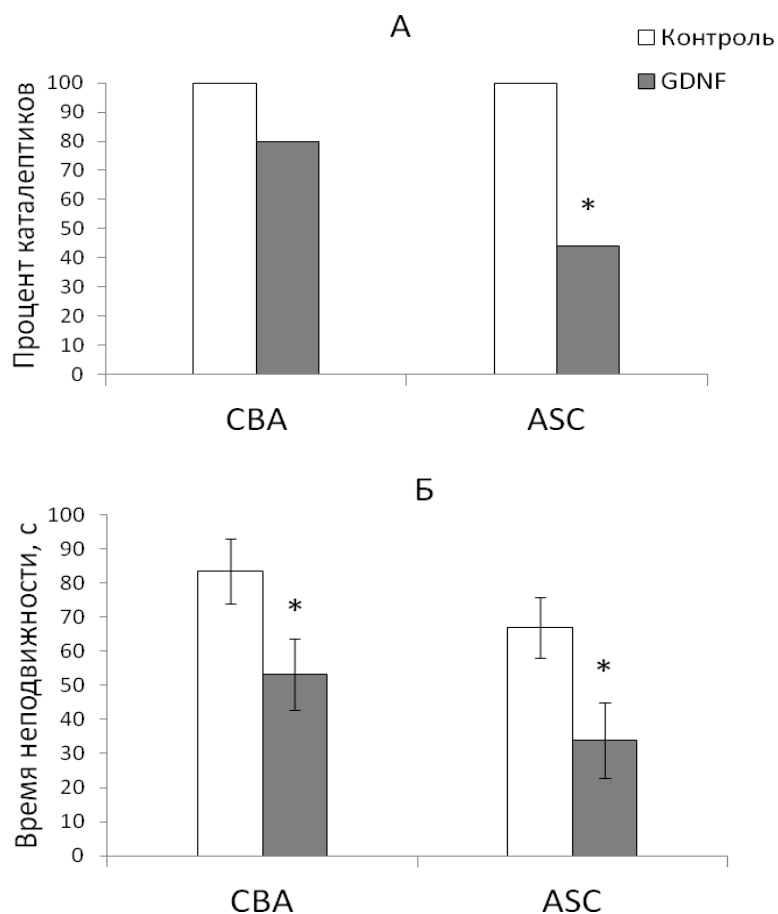


Рис.1. Влияние GDNF на процент каталептиков (А) и на время неподвижности (Б) мышей линий CBA и ASC в тесте на каталепсию.

$n = 8-11$; * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой этой же линии.

В тесте «открытое поле» GDNF значительно повлиял на поведение мышей исследуемых линии (таблица 1). Величина пройденного пути у мышей линии ASC значительно возросла в результате введения GDNF ($F_{1, 15} = 4.81$, $p < 0.05$). Влияние GDNF на пройденный путь у мышей CBA оказалось незначительным ($p = 0.07$), однако GDNF достоверно увеличил время нахождения в центре арены ($p < 0.01$).

Повышение двигательной активности животных в результате действия GDNF показано неоднократно, и зачастую сопровождается возрастанием уровня дофамина в различных структурах мозга (Hudson et al., 1995; Bowenkamp et al., 1997; Gerhardt et al., 1999; Biju et al., 2010). У исследуемых нами мышей ASC повышение двигательной активности в тесте «открытое поле» в результате однократного введения GDNF сопровождалось увеличением уровня дофамина в стриатуме (Семёнова и др., 2013) и повышением экспрессии генов D1 и D2 дофаминовых рецепторов в прилежащих ядрах (Naumenko et al., 2014).

Таблица 1. Влияние GDNF на поведение мышей CBA и ASC в тесте «открытое поле».

Линия мышей	CBA		ASC	
	Контроль	GDNF	Контроль	GDNF
Пройденный путь, см	621.3 ± 65.3	782.7 ± 52.6	409.0 ± 84.8	629.1 ± 57.4*
Время в центре арены, %	7.4 ± 2.1	15.4 ± 1.8 **	3.66 ± 1.48	8.76 ± 2.66
Число вертикальных стоек	8.1 ± 2.3	12.7 ± 1.9	2.25 ± 1.84	5.56 ± 1.16
Число актов умывания	1.7 ± 0.3	2.6 ± 0.4	1.86 ± 0.58	2.56 ± 0.50
Продолжительность умываний, с	6.5 ± 0.8	8.7 ± 2.3	4.02 ± 1.94	3.59 ± 0.41

$n = 8-11$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой той же линии.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» GDNF в большей мере повлиял на поведение мышей линии ASC: увеличил число заходов ($F_{1, 14} = 19.5$, $p < 0.001$) и время, проведенное в открытых рукавах ($F_{1, 14} = 10.23$, $p < 0.01$), а также число заглядываний вниз ($F_{1, 14} = 15.41$, $p < 0.01$). В то же время под влиянием GDNF сократилось время, проведенное мышами в закрытых рукавах ($F_{1, 14} = 5.90$, $p < 0.05$). Все эти показатели указывают на снижение уровня тревожности мышей ASC под действием GDNF. У мышей линии CBA GDNF увеличил число заходов в закрытые рукава ($F_{1, 19} = 4.50$, $p < 0.05$), но не смог повлиять на другие параметры (таблица 2).

Таблица 2. Влияние GDNF на поведение мышей CBA и ASC в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Линия мышей	CBA		ASC	
	Контроль	GDNF	Контроль	GDNF
Число заходов в открытые рукава	1.5 ± 0.7	1.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	3.4 ± 0.6***
Время в открытых рукавах, с	34.3 ± 15.7	35.1 ± 23.6	6.9 ± 3.8	27.5 ± 5.2**
Число заходов в закрытые рукава	3.7 ± 0.6	6.3 ± 1.1*	3.1 ± 0.7	5.3 ± 1.3
Время в закрытых рукавах, с	213.6 ± 22.2	221.8 ± 20.4	276.2 ± 6.8	246.6 ± 10.1*
Число выглядываний из закрытых рукавов	10.3 ± 1.1	12.5 ± 1.5	9.3 ± 2.0	9.3 ± 1.0
Число заглядываний вниз	5.5 ± 1.6	8.2 ± 1.5	3.3 ± 1.3	11.9 ± 1.8**

$n = 8-11$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой той же линии.

В тесте «свет-темнота» введение GDNF значительно снизило время пребывания в темном отсеке мышей линии ASC ($F_{1,19} = 5.74$, $p < 0.05$) (таблица 3). У мышей линии CBA снижение времени пребывания в темном отсеке было выявлено на уровне тенденции ($p = 0.06$).

Таблица 3. Влияние GDNF на поведение мышей CBA и ASC в тесте «свет-темнота».

Линия мышей	CBA		ASC	
	Контроль	GDNF	Контроль	GDNF
Латентное время захода в темный отсек, с	113.5 ± 22.7	138.3 ± 27.4	36.0 ± 8.2	74.6 ± 16.8
Число заходов в темный отсек	5.9 ± 0.8	4.5 ± 1.1	5.0 ± 0.5	5.1 ± 0.9
Время в темном отсеке, с	138.3 ± 19.8	83.2 ± 21.5	226.0 ± 12.8	160.0 ± 23.5*
Число выглядываний в светлый отсек	5.2 ± 1.5	2.0 ± 0.7	4.5 ± 0.7	6.6 ± 1.5

$n = 10-11$; * $p < 0.05$.

Однократное внутрижелудочковое введение GDNF значительно повлияло на выраженность депрессивноподобного поведения у мышей двух линий. В тесте «подвешивание за хвост» GDNF не оказывал влияния на время неподвижности у мышей линии ASC ($F_{1,14} = 0.80$, $p > 0.05$), однако достоверно увеличивал время неподвижности у мышей CBA ($F_{1,19} = 10.1$, $p < 0.05$, рис. 2). В тесте принудительного плавания GDNF достоверно увеличивал время замирания мышей линии ASC по сравнению с мышами контрольной группы ($F_{1,19} = 5.78$, $p < 0.05$, рис. 3). Таким образом, GDNF не только не облегчил, но, наоборот, усугубил депрессивноподобное поведение мышей обеих линий.

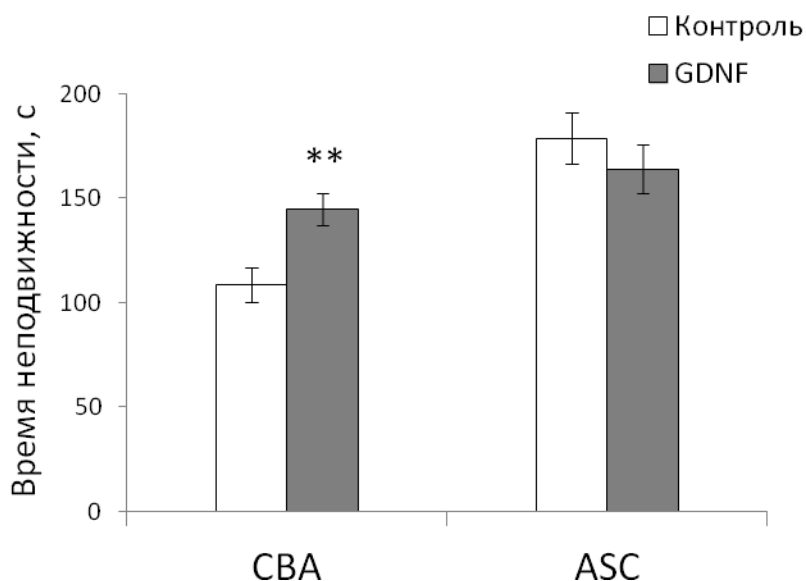


Рис.2. Влияние GDNF на поведение мышей линий CBA и ASC в тесте «подвешивание за хвост».

$n = 8-11$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой этой же линии.

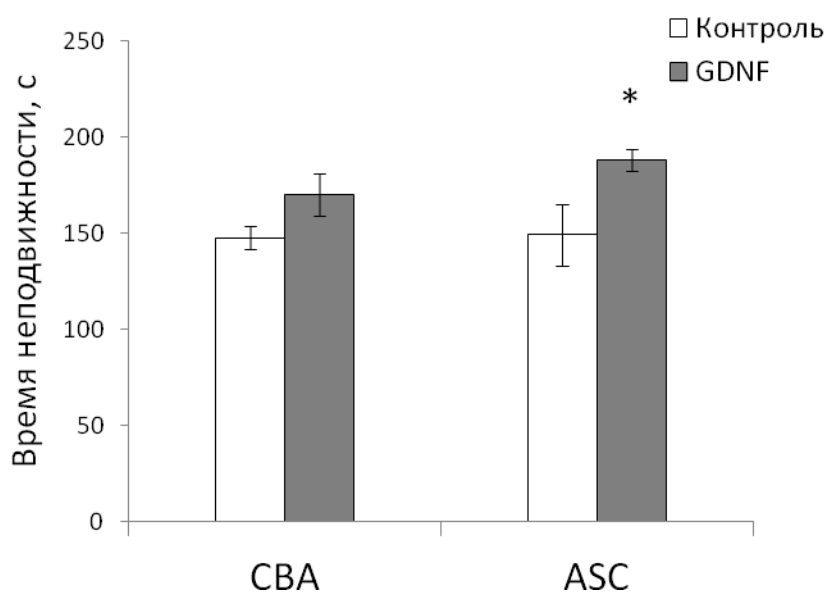


Рис.3. Влияние GDNF на поведение мышей линий CBA и ASC в тесте принудительного плавания.

$n = 10-11$; * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой этой же линии.

В тесте «закапывание шариков» активность контрольных мышей обеих исследуемых линий оказалась невысока (Рис. 4). Клинические исследования указывают на неизменный уровень GDNF в крови пациентов с обсессивно-компульсивным расстройством по сравнению со здоровыми людьми (Fontenelle et al., 2012; Tunca et al., 2015). В нашей работе GDNF не повлиял на число закопанных шариков мышами линии CBA ($F_{1,18} = 0.13$, $p > 0.05$). В

то же время, GDNF резко увеличил выраженность обсессивно-компульсивного поведения мышей линии ASC ($F_{1,18} = 74.862$, $p < 0.001$). Интересно, что эффекты BDNF и GDNF на стереотипное поведение, по-видимому, противоположны. Так, в результате повышенной экспрессии BDNF (Weidner et al., 2014) или его экзогенного введения мышам с моделью пренатального воздействия стресса и алкоголя (Porova et al., 2011) выраженность обсессивно-компульсивного поведения в тесте «закапывание шариков» заметно снижалась.

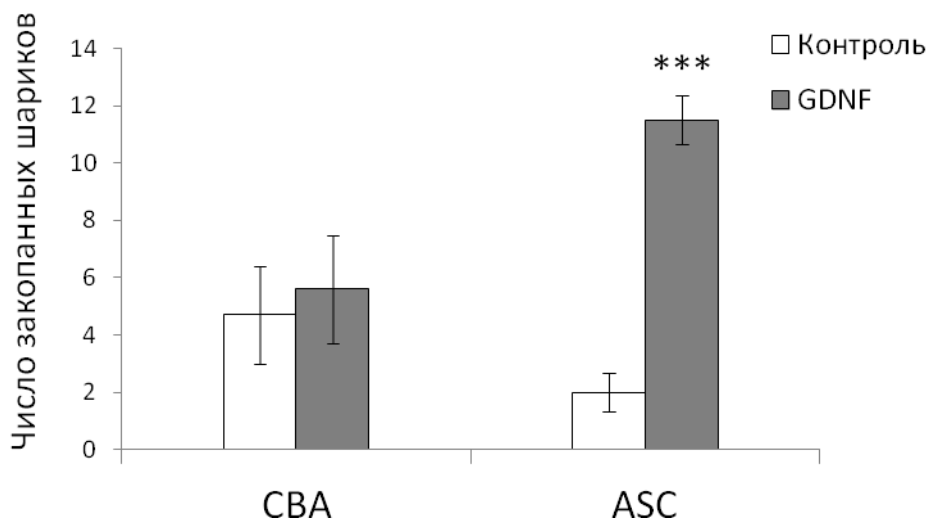


Рис.4. Влияние GDNF на поведение мышей CBA и ASC в тесте «закапывание шариков».

$n = 10$ во всех группах; *** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой той же линии.

Водный лабиринт Морриса широко применяется для изучения пространственной памяти и процесса обучения (Morris, 1984). В наших экспериментах GDNF не повлиял на динамику обучения мышей CBA (Рис. 5А), однако было обнаружено долговременное влияние однократного введения GDNF на показатели обучения мышей ASC. Так, под влиянием GDNF мыши демонстрировали сокращенное время достижения платформы (латентное время) по сравнению с соответствующим контролем ($p < 0.05$) на четвертый день (Рис. 5Б). Сокращение пройденного пути у мышей линии ASC, подвергавшихся введению GDNF, по сравнению с контрольными мышами наблюдалось на уровне тенденции ($p = 0.06$, рис. 5Б). Такое положительное влияние GDNF на динамику обучения согласуется с работами других исследователей (Gerlai et al., 2001; Katsuragi et al., 2005; Pertusa et al., 2008; Revilla et al., 2014).

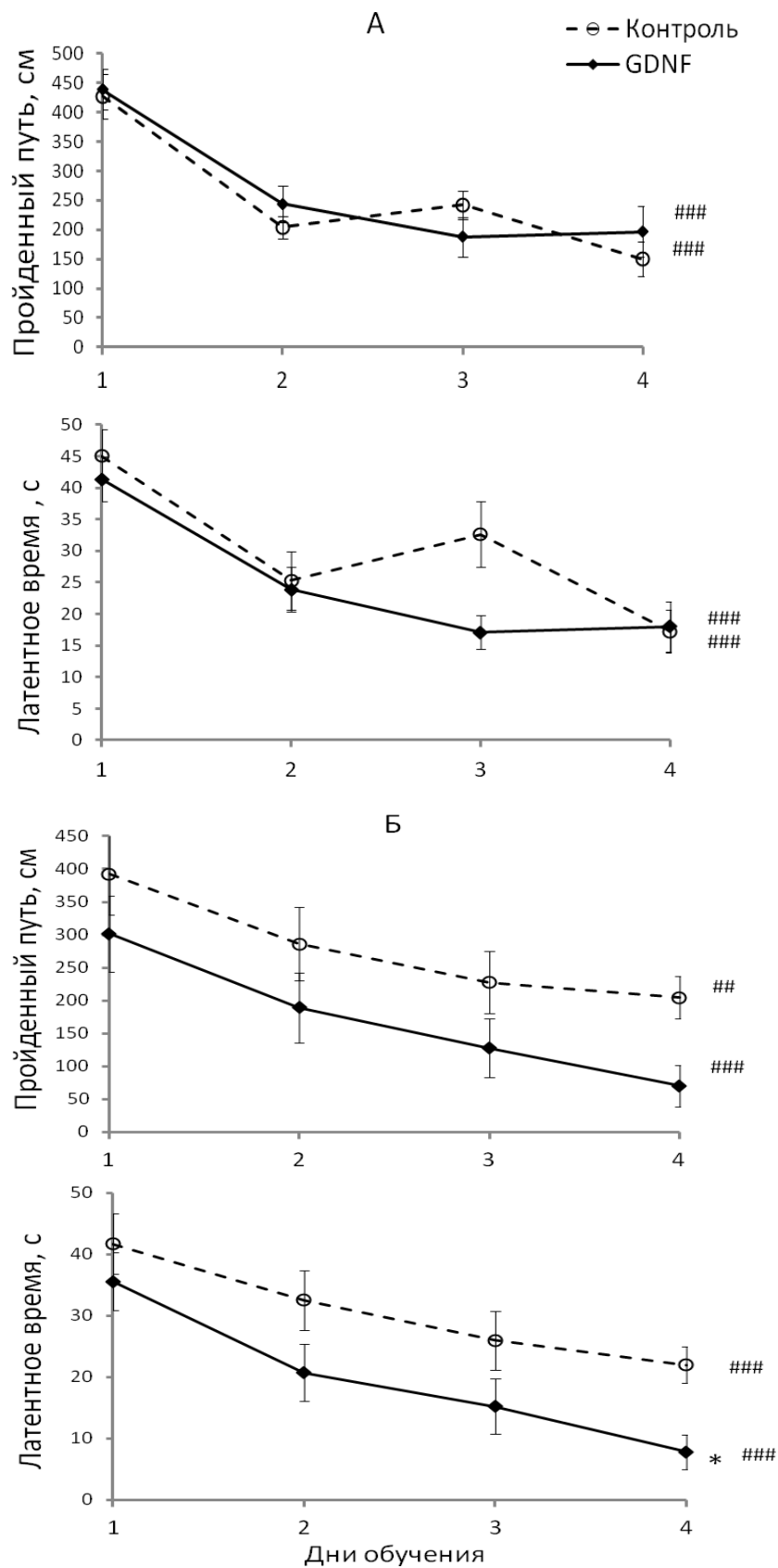


Рис.5. Эффект однократного введения GDNF на поведение мышей CBA (А) и ASC (Б) в тесте Морриса.

$n=8-11$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с 1 днем испытаний для той же группы, * $p < 0.05$ по сравнению с группой «Контроль».

Таким образом, изменения в поведении, обусловленные введением GDNF, наблюдались главным образом у мышей линии ASC (таблица 4). Так, у мышей ASC на фоне GDNF наблюдалось повышение уровня двигательной активности и снижение уровня тревожности. Тогда как GDNF не повлиял на поведение мышей CBA в тесте Морриса и «закапывание шариков», мыши ASC под влиянием GDNF демонстрировали улучшение показателей обучения и усиление выраженности обсессивно-компульсивного поведения. У мышей обеих линий введение GDNF привело к снижению выраженности щипковой каталепсии (однако процент каталептиков GDNF снизил лишь у мышей линии ASC), и к усугублению депрессивноподобного поведения (у мышей CBA в тесте «подвешивание за хвост», у ASC в тесте принудительного плавания).

Таблица 4. Влияние GDNF на характеристики поведения мышей линий CBA и ASC

Характеристики поведения	CBA	ASC
Каталепсия	↓	↓
Двигательная активность	↗	↑
Тревожность	↘	↓
Депрессивноподобное поведение	↑	↑
Обсессивно-компульсивное поведение	=	↑
Обучение	=	↑

↓ - ослабление выраженности характеристики поведения, ↑ - усиление выраженности характеристики поведения, = поведение не изменилось, ↘ и ↗ - ослабление и усиление характеристики поведения на уровне тенденции.

Функциональная активность 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} рецепторов в мозге мышей в результате введения GDNF

Введение GDNF не произвело значительных изменений в функциональной активности как 5-HT_{1A} рецепторов, оцениваемой по снижению температуры тела в ответ на активацию рецепторов специфичным агонистом 8-OH-DPAT ($F_{1,14} = 0.89$, $p > 0.05$), так и 5-HT_{2A} рецепторов, оцениваемой по количеству встряхиваний головой в ответ на введение специфичного агониста рецепторов DOI ($F_{1,14} = 0.63$, $p > 0.05$), у мышей ASC. GDNF так же не привел к изменениям функциональной активности 5-HT_{1A}

($F_{1.19} = 0.27$, $p > 0.05$) и 5-HT_{2A} ($F_{1.18} = 1.28$, $p > 0.05$) рецепторов у мышей линии CBA.

Влияние GDNF на экспрессию ключевых генов серотониновой системы в мозге мышей CBA и ASC

Однократное внутрижелудочковое введение GDNF привело к значительным изменениям экспрессии ключевых генов серотониновой системы мозга у мышей линии ASC, но не CBA. У мышей линии ASC под влиянием GDNF уровень мРНК 5-HT_{1A} рецепторов возрос в среднем мозге ($F_{1.14} = 10.95$, $p < 0.05$), но снизился в гиппокампе ($F_{1.12} = 35.19$, $p < 0.001$, рис. 6А). GDNF значительно увеличил экспрессию гена 5-HT_{2A} рецепторов во фронтальной коре ($F_{1.11} = 15.73$, $p < 0.01$, рис. 6Б). Найденное нами снижение экспрессии гена 5-HT_{1A} рецепторов в гиппокампе и усугубление депрессивноподобного поведения мышей ASC согласуется с данными по снижению плотности 5-HT_{1A} рецепторов в лимбических областях мозга у пациентов с депрессивными расстройствами (Drevets et al., 2007; Hirvonen et al., 2008; Savitz et al., 2009; Lothe et al., 2012). Кроме того, повышенная экспрессия гена, кодирующего 5-HT_{1A} рецептор в среднем мозге, согласуется с данными о повышенной плотности 5-HT_{1A} рецепторов в ядрах шва среднего мозга депрессивных больных (Miller et al., 2009; Kaufman et al., 2015). В то же время было показано, что активация 5-HT_{1A} рецепторов в ядрах шва среднего мозга (ауторецепторов) оказывает анксиолитическое влияние на поведение животных (Hogg et al., 1994; Korprowska et al., 2002; Shields, King, 2008). Поэтому, обнаруженная нами повышенная экспрессия гена 5-HT_{1A} рецепторов в среднем мозге может лежать в основе антитревожных эффектов GDNF.

Возрастание уровня мРНК 5-HT_{2A} рецепторов во фронтальной коре может объяснить антикаталептический эффект GDNF, поскольку у мышей ASC снижена экспрессия гена 5-HT_{2A} рецептора во фронтальной коре по сравнению с некаталептической линией AKR (Naumenko et al., 2010).

Как было описано выше, GDNF стимулировал обсессивно-компульсивное поведение мышей ASC, оцениваемое в тесте «закапывание шариков». Найденное нами снижение экспрессии гена 5-HT_{1A} рецепторов в гиппокампе находится в согласии с данными об ослаблении 5-HT нервной передачи и клинической эффективности антидепрессантов группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина в лечении обсессивно-компульсивных расстройств (Vermeire et al., 2012; Fineberg et al., 2013; Dold et al., 2015). Также известно, что активаторы 5-HT_{1A} рецепторов снижают закапывание шариков, что указывает на роль этих рецепторов в

обсессивно-компульсивном поведении (Abe et al., 1998; Matsushita et al., 2005; Harasawa et al., 2006).

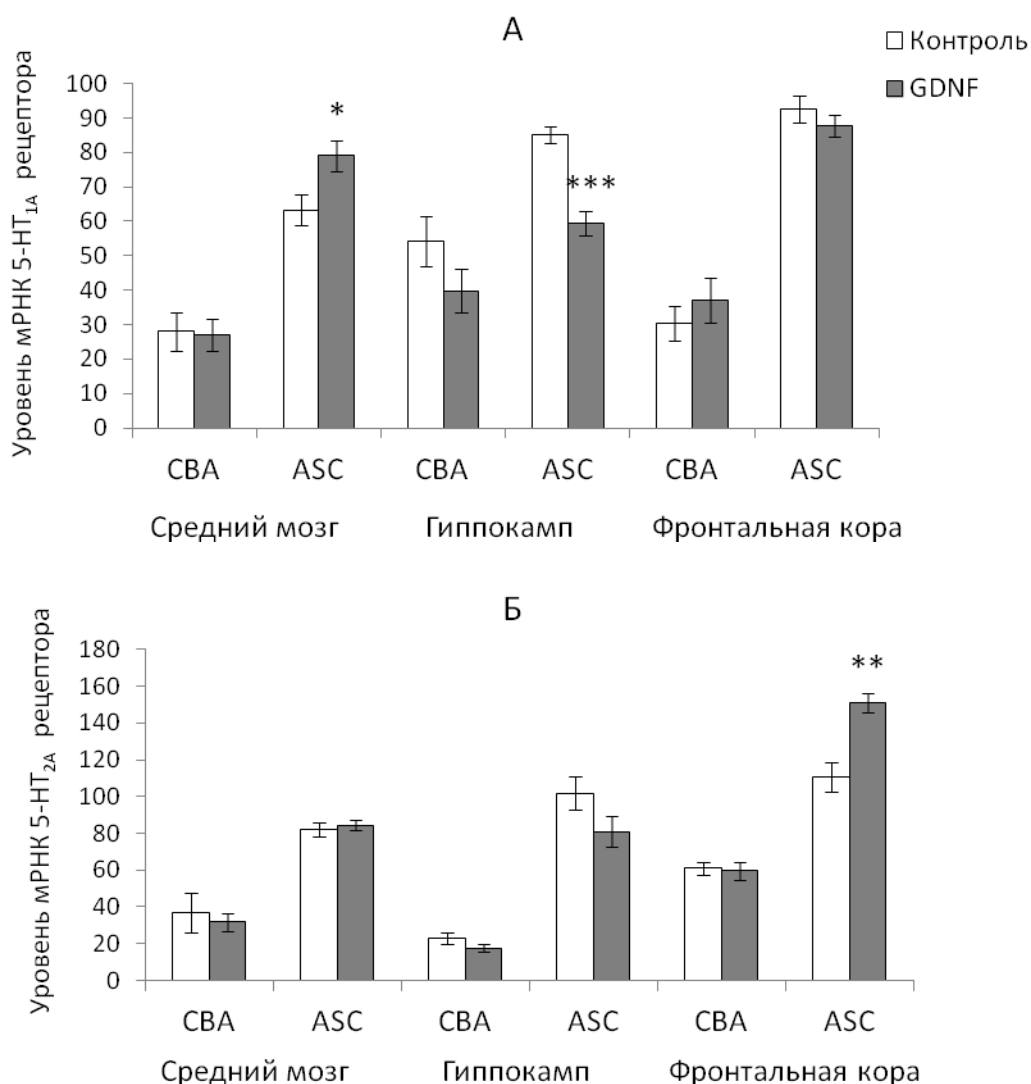


Рис.6. Влияние GDNF на экспрессию 5-HT_{1A} рецепторов (А) и 5-HT_{2A} рецепторов (Б) в мозге мышей CBA и ASC.

$n = 6-8$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы.

Мы показали, что GDNF повысил экспрессию гена ТПГ-2 в среднем мозге мышей линии ASC ($F_{1,14} = 9.49$, $p < 0.01$, рис. 7). При этом способность GDNF усиливать депрессивноподобное поведение мышей ASC согласуется с данными о повышении экспрессии гена ТПГ-2 (Bach-Mizrachi et al., 2006) и количества этого фермента (Boldrini et al., 2005) в ядрах шва среднего мозга больных, страдающих депрессивными заболеваниями. Напротив, антидепрессанты из группы СИОЗС, хронические вводимые крысам, стимулировали сокращение количества ТПГ-иммунореактивных клеток в ядрах шва среднего мозга (MacGillivray et al., 2010). Однако ранее было показано (Naumenko et al., 2012), что BDNF облегчал депрессивноподобное

поведение мышей ASC и при этом повышал экспрессию гена ТПГ-2. По-видимому, повышение экспрессии гена, кодирующего ТПГ-2, не является общим механизмом действия двух нейротрофических факторов на выраженность депрессивноподобного поведения, а есть компенсаторный механизм, например, в ответ на повышение экспрессии гена, кодирующего 5-HT_{1A} рецептор в среднем мозге, приводящее к снижению уровня серотонина в синаптической щели.

Несмотря на то, что 5-НТ транспортер является первичной мишенью большинства классических антидепрессантов, ни GDNF, ни BDNF не оказали влияния на экспрессию гена 5-НТ транспортера в среднем мозге исследуемых мышей.

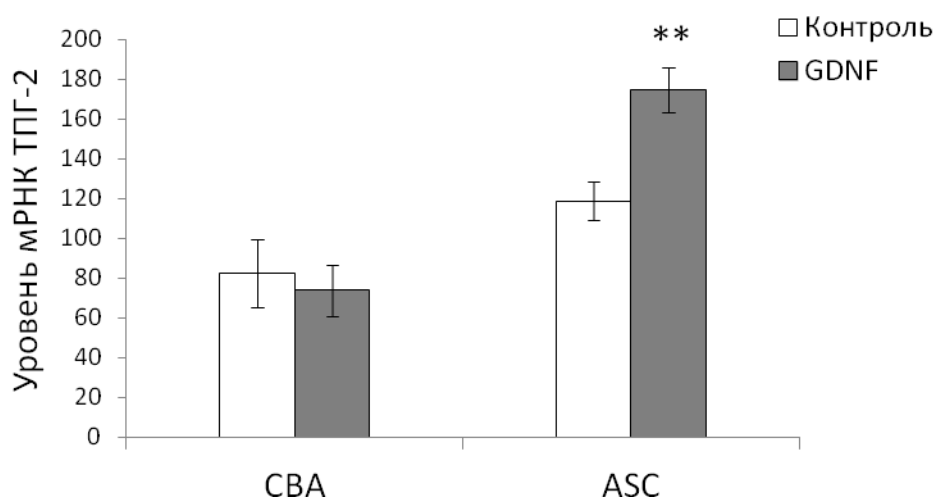


Рис.7. Влияние GDNF на экспрессию ТПГ-2 в среднем мозге мышей линии CBA и ASC.

*n = 6-8; ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой той же линии.*

Заключение

Однократное введение GDNF оказало влияние на поведение и серотониновую систему мозга мышей. При этом каталептическая «депрессивная» линия мышей ASC была более чувствительна к действию GDNF, чем каталептическая «недепрессивная» CBA, таким образом, влияние GDNF на поведение существенно зависит от генотипа.

Нами обнаружены поведенческие эффекты GDNF, как корректирующие патологическое поведение мышей ASC, такие как увеличение уровня двигательной активности, снижение уровня тревожности, сокращение выраженности каталепсии и улучшение способностей к обучению, так и усугубляющие – увеличение выраженности депрессивноподобного поведения и стимулирование обсессивно-компульсивного поведения. Полагаем, что изменения в поведении, внесенные этим нейротрофическим фактором, могут опосредоваться взаимодействием между GDNF и 5-НТ системой мозга

мышей, поскольку мы наблюдали изменения в экспрессии ключевых генов 5-НТ системы. Молекулярные механизмы, с помощью которых осуществляется взаимовлияние GDNF и 5-НТ системы мозга остаются под вопросом. Также требуются дальнейшие исследования взаимодействия GDNF с другими нейромедиаторными системами, ответственными за реализацию нормального и патологического поведения.

ВЫВОДЫ

1. Однократное внутривентрикулярное введение GDNF оказывает выраженное генотипзависимое влияние на экспрессию ключевых генов серотониновой системы мозга и поведение. Мыши каталептической «депрессивной» линии ASC более чувствительны к GDNF, чем мыши каталептической «недепрессивной» линии CBA.
2. У мышей обеих линий под влиянием GDNF снижается выраженность генетически детерминированной каталепсии, но возрастает выраженность депрессивноподобного поведения.
3. У мышей линии ASC GDNF повышает двигательную активность, снижает показатели тревожности, стимулирует обсессивно-компульсивное поведение, улучшает показатели обучения в водном лабиринте Морриса.
4. Под влиянием GDNF у мышей линии ASC, но не CBA, возрастает экспрессия гена основного маркера активности серотониновой системы триптофангидроксилазы-2 в среднем мозге; повышаются уровни мРНК 5-НТ_{1A} рецептора в среднем мозге и мРНК 5-НТ_{2A} рецептора во фронтальной коре; значительно снижается уровень мРНК 5-НТ_{1A} рецептора в гиппокампе.

Список основных работ по теме диссертации в реферируемых журналах из списка ВАК

1. Семёнова, А.А., Базовкина Д.В., Цыбко А.С., Науменко В.С., Попова Н.К. Влияние GDNF на поведение мышей линии ASC с высокой наследственной предрасположенностью к каталепсии // Журн. Высш. Нервн. Деят. – 2013. – Т. 63. – № 4. – С. 495-501.
2. Naumenko, V.S., Bazovkina D.V., Semenova A.A., Tsybko A.S., P'chibaeva T.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders // J. Neurosci. Res. – 2013. – Vol. 91. – N 12. – P. 1628-1638.

3. Naumenko, V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Il'chibaeva T.V., Khotskin N.V., **Semenova A.A.**, Popova N.K. Effect of GDNF on depressive-like behavior, spatial learning and key genes of the brain dopamine system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains // *Behav. Brain Res.* – 2014. – Vol. 274. – P. 1-9.

Тезисы, опубликованные в сборниках конференций

1. **Семёнова, А.А.**, Ильчибаева Т.В. Поведенческие эффекты глия-производного нейротрофического фактора // 50-ая юбилейная Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс». – 2012. – Новосибирск.
2. **Семёнова, А.А.**, Базовкина Д.В., Ильчибаева Т.В., Попова Н.К. Влияние нейротрофического фактора GDNF на поведение мышей ASC и экспрессию генов серотониновой системы // 7 сибирский съезд физиологов. – 2012. – Красноярск.
3. Ильчибаева, Т.В., Цыбко А.С., **Семёнова А.А.**, Науменко В.С. Эффект центрального введения глия-производного нейротрофического фактора на экспрессию генов серотониновой системы мозга // II Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «Биология будущего: традиции и новации». – 2012. – Екатеринбург.
4. Tsybko, A.S., Naumenko V.S., Il'chibaeva T.V., **Semenova A.A.** Effect of central administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the expression of key genes of the brain serotonin system // International Summer School “Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies”. – 2012. – Zvenigorod.