

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ФЕРМЕНТА СИНТЕЗА СЕРОТОНИНА ПАРАХЛОРФЕНИЛАЛАНИНА НА ДОФАМИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА МЫШЕЙ КАТАЛЕПТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ

© 2024 г. Д. В. Базовкина<sup>1</sup>, \*, Е. Ю. Баженова<sup>1</sup>, А. В. Куликов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

\*E-mail: daryabazovkina@gmail.com

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 12.07.2024 г.

Принята к публикации 13.07.2024 г.

В данной работе были изучены эффекты введения парахлорфенилаланина (ПХФА), ингибитора ключевого фермента синтеза серотонина, на выраженность реакции замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии СВА/Лас с наследственной предрасположенностью к каталепсии. Введение ПХФА (300 мг/кг/день, 3 дня) не повлияло на длительность каталептического замирания. В то же время содержание дофамина снизилось в гипоталамусе, среднем мозге и повысилось в стриатуме и прилежащих ядрах после введения ПХФА. Введение препарата не повлияло на уровни ДОФУК и ГВК, метаболитов дофамина, в исследованных структурах мозга. Кроме этого, было обнаружено ПХФА-индуцированное повышение уровня мРНК гена DRD2-рецептора в среднем мозге и гена катехол-О-метилтрансферазы в гипоталамусе и среднем мозге. При этом не было найдено влияния ПХФА на экспрессию гена DRD1-рецептора и гена фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы в мозге. Таким образом, ингибирование ключевого фермента синтеза 5-НТ оказало значительное влияние на ДА систему мозга мышей линии СВА/Лас, при этом наибольшие изменения были обнаружены в среднем мозге и гипоталамусе.

*Ключевые слова:* триптофангидроксилаза, парахлорфенилаланин, серотонин, дофамин, рецепторы, мозг, каталепсия, мышь

DOI: 10.31857/S1027813324030063, EDN: EQFXXJ

**Принятые сокращения:** 5-НТ – серотонин, ДА – дофамин, 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, ТПГ – триптофангидроксилаза, КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза.

### ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) играет роль ключевого нейромедиатора в ЦНС и функционирует как гормон на периферии. 5-НТ система мозга представляет собой важный фактор нейропластичности в силу своей экспансивности и вовлечения в регуляцию самых разнообразных форм поведения и нейроэндокринных процессов [1, 2]. Развитие таких психопатологий, как шизофрения, депрессия и тревожность, нередко ассоциировано с дефицитом серотонинергической нейротрансмиссии [3]. 5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты – L-триптофана; ключевым ферментом синтеза 5-НТ в мозге является триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2), которая гидроксилирует L-триптофан до 5-гидрокси-триптофана (5-НТР) [4].

Другой важной моноаминергической нейромедиаторной системой является дофаминовая (ДА) система мозга, которая также участвует в регуляции различных физиологических процессов и разнообразных типов поведения [5, 6]. Дофамин играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных и психических расстройств, таких как депрессия, болезни Паркинсона и Альцгеймера [5, 7]. Дофаминовые рецепторы (D1–D5) являются трансмембранными G-белок-связанными клеточными рецепторами. Наибольшее внимание исследователей привлекают рецепторы D1 и D2, которые вовлечены в регуляцию широкого спектра поведенческих реакций [6]. Следует отметить, что 5-НТ и ДА нейромедиаторные системы находятся в тесном взаимодействии, которое, в свою очередь, влияет на регуляцию поведения в норме и патологии [8, 9].

Каталепсия или реакция замирания — это состояние выраженной неподвижности, в чрезмерной форме у пациентов она является синдромом, например, шизофрении, болезни Паркинсона [10, 11]. Каталепсию можно вызвать у мышей, ушипнув животное за загривок. Однако такая индуцированная

щипком каталепсия — очень редкое явление, которое не встречается у мышей наиболее распространенных инбредных линий, таких как BALB/c, C57BL/6J или DBA/2. Ранее нами было обнаружено, что мыши линии CBA/Lac предрасположены к щипковой реакции замирания [12]. Было показано участие 5-НТ системы мозга в регуляции наследственной каталепсии у мышей. Так, мыши линии CBA/Lac отличались повышенной активностью ТПГ-2 и сниженной плотностью 5-НТ<sub>2A</sub> серотониновых рецепторов в стриатуме по сравнению с мышами некаталептических линий [13]. Примечательно, что не было показано существенного вклада ДА системы мозга в регуляцию наследственной каталепсии [14], хотя в литературе хорошо описан феномен галоперидоловой каталепсии, вызываемой фармакологической блокадой дофаминовых рецепторов D<sub>2</sub> [15]. Остается неясным, как дефицит 5-НТ в мозге может повлиять на выраженность щипковой каталепсии и состояние ДА нейромедиаторной системы.

Целью работы было исследование эффектов ингибирования синтеза 5-НТ на длительность каталептического замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии CBA/Lac с генетической предрасположенностью к каталепсии. Для этого было изучено влияние введения ингибитора фермента синтеза серотонина парахлорфенилаланина на а) поведение в тесте щипковой каталепсии; б) содержание ДА и его метаболитов ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота) и ГВК (гомованилиновая кислота) в структурах мозга; в) уровни мРНК генов, кодирующих ключевые элементы ДА системы, в структурах мозга мышей линии CBA/Lac.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Опыты проводили на взрослых (10–12 недель) самцах мышей линий CBA/Lac (CBA (n=20)). Вес животных составлял 24±0.8 г, мыши содержались в пластиковых клетках размером 40 × 30 × 15 см в стандартных условиях (температура 20–22°C, относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (14 ч света и 10 ч темноты), со свободным доступом к стандартной пище и воде). Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023). Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232).

**Дизайн эксперимента.** Животные были разделены на две группы по 10 особей. Мышам первой группы вводили парахлорфенилаланин (ПХФА, (R)-2-amino-3-phenylpropionic acid) (Merck, Darmstadt, Germany) в дозе 300 мг/кг в течение трех дней. Выбор дозы препарата и времени его действия основывался на наших ранних исследованиях [16] и литературных данных, согласно которым снижение уровня серотонина, вызванное ПХФА, достигает максимума через 3 дня и сохраняется в течение недели [17]. Мышам второй (контрольной) группы вводили физиологический раствор. На третий день (за сутки до тестирования поведения) мышей рассаживали в индивидуальные клетки, чтобы исключить проявление групповых эффектов [18]. На четвертый день эксперимента у мышей оценивали продолжительность каталептического замирания. На пятый день эксперимента животных декапитировали, выделяли на льду гипоталамус, черную субстанцию, средний мозг, область прилежащих ядер и стриатум. Выбор структур был обусловлен тем, что основные пути дофаминовой системы мозга включают вышеназванные отделы [5]. Образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C до дальнейших процедур.

**Тест щипковой каталепсии.** Длительность замирания оценивали по методике, описанной ранее [19]. Каталепсию вызывали щипком загривка в течение 5 с, после чего мышь помещали на две перекладки, расположенные параллельно под углом 45° на расстоянии 5 см одна от другой и на высоте 25 см от поверхности стола. Регистрировали продолжительность замирания — время, в течение которого мышь сохраняла неподвижность. Время теста ограничивали 120 с, после чего животное возвращали в клетку и через 1–2 мин повторяли тестирование. Для каждой мыши проводили 10 тестов. Выраженность каталепсии оценивали по средней длительности замирания (с) трех тестов с наибольшими значениями времени замирания [19].

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** Для выделения общей РНК и ВЭЖХ использовали метод множественного выделения. Для этого структуры гомогенизировали в объеме (гипоталамус, черную субстанцию, область прилежащих ядер — в 150 мкл, стриатум и средний мозг — в 250 мкл) холодного 50 мМ Tris HCl буфера (pH 7.6) на льду, затем аликвоты гомогената использовали для выделения общей РНК (по 100 мкл для гипоталамуса, черной субстанции, области прилежащих ядер и по 200 мкл для стриатума и среднего мозга) и ВЭЖХ (50 мкл). Аликвоту для ВЭЖХ (50 мкл) быстро переносили в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты (HClO<sub>4</sub>). В оставшуюся аликвоту (100 мкл или 200 мкл) быстро добавляли TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, USA), вся процедура занимала меньше минуты.

Методом ВЭЖХ определяли содержание дофамина, ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота) и ГВК (гомованилиновая кислота) в структурах мозга по протоколу, описанному ранее [20]. После добавления аликвоты гомогената ткани мозга (50 мкл) в эппендорф с 150 мкл 0.6 М хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ), пипетировали и центрифугировали 15 минут при  $4^\circ\text{C}$  и 14000 об/мин для осаждения белка. Отбирали супернатант и разбавляли *milliQ* водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при  $-20^\circ\text{C}$  для последующего определения белка методом Бредфорда. Для этого осадок растворяли в 1 мл 0.1М гидроксида натрия ( $\text{NaOH}$ ), концентрацию белка в полученном растворе определяли с помощью реактива Бредфорда в двух повторах для каждого образца. Измерение концентрации белка проводили с помощью спектрофотометра MultiScan GO и программного обеспечения Thermo Scientific SkanIt (Thermo Fisher Inc., США). Двадцать мкл супернатанта вводили в петлю системы ВЭЖХ, которая состояла из следующих компонентов: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE ИТМ; Antec, Нидерланды), проточный элемент из стеклоглерида (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), системный контроллер СВМ-20А, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20А и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.6 мл/мин на колонке C18 (размер частиц 5 мкм,  $L \times ID$  75  $\times$  4.6 мм, Luna, Phenomenex, США), защищенной предколонкой C8 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из 87% буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия (Sigma Aldrich, США), 1.4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты (Chimed, Россия) и 0.05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma Aldrich, США) pH 3.9, и 13% метанола (Chimed, Россия). Для построения калибровочной кривой внешних стандартов использовали серию растворов, содержащих по 0.5 или 1 или 2 нг дофамина, ДОФУК и ГВК (Sigma Aldrich, США). Площадь пиков была оценена при помощи программы LabSolution LG/GC (Shimadzu, США) и калибрована на соответствующий внешний стандарт. Концентрации биогенных аминов выражали в нг/мг белка, как было описано ранее [20].

**Выделение общей РНК.** Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, USA), затем обработана ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о.е./мл) в соответствии с инструкциями производителей. Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре (Nanodrop, США). РНК была разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при  $-70^\circ\text{C}$ .

Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [21, 22].

**Реакция обратной транскрипции.** Реакцию проводили по протоколу, описанному ранее [21, 22]. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана с 8 мкл смеси, содержащей 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ), 5.65 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом и 2.25 мкл стерильного 1М KCl, денатурирована при  $94^\circ\text{C}$  в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Биосан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4 мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М  $\text{MnCl}_2$  (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при  $41^\circ\text{C}$  в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .

**ОТ-ПЦР в реальном времени.** Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [21, 22]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании “Биосан” (Новосибирск, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (R-402, Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche Applied Science, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин  $95^\circ\text{C}$ , 1 цикл; 10 с при  $95^\circ\text{C}$ , 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при  $72^\circ\text{C}$ , 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали в отдельных пробирках (одновременно с образцами кДНК) и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах  $C_t$  (значение порогового цикла) –  $\lg P$  (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480. Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж.}, ^\circ\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Polr2a</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttgcgact-3'	60	194
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaaccctgtcgaatgctctc-3' R 5'-ccagccaaccacacaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccacttcttgacatacattg-3' R 5'-cccattccacagcctctctaag-3'	65	203
<i>Comt</i>	F 5'-gacttctctggcgtatgtgag-3' R 5'-agagtgagtgtgtcatcg-3'	60	199
<i>Th</i>	F 5'-ccgtacaccctggccattgatg-3' R 5'-atgaaggccagggaatgcagg-3'	64	320

каждого исследуемого гена была представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [21, 22].

**Статистика.** Результаты представляли как  $m \pm \text{SEM}$  и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро-Уилка. Достоверными считались различия с  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Поведение.** Однофакторный дисперсионный анализ не выявил эффекта ПХФА на продолжительность каталептического замирания ( $t_{18}=1.39$ ,  $p > 0.05$ ). Среднее время неподвижности составило  $28.1 \pm 6.0$  с для контрольной группы и  $37.6 \pm 3.2$  с для группы ПХФА.

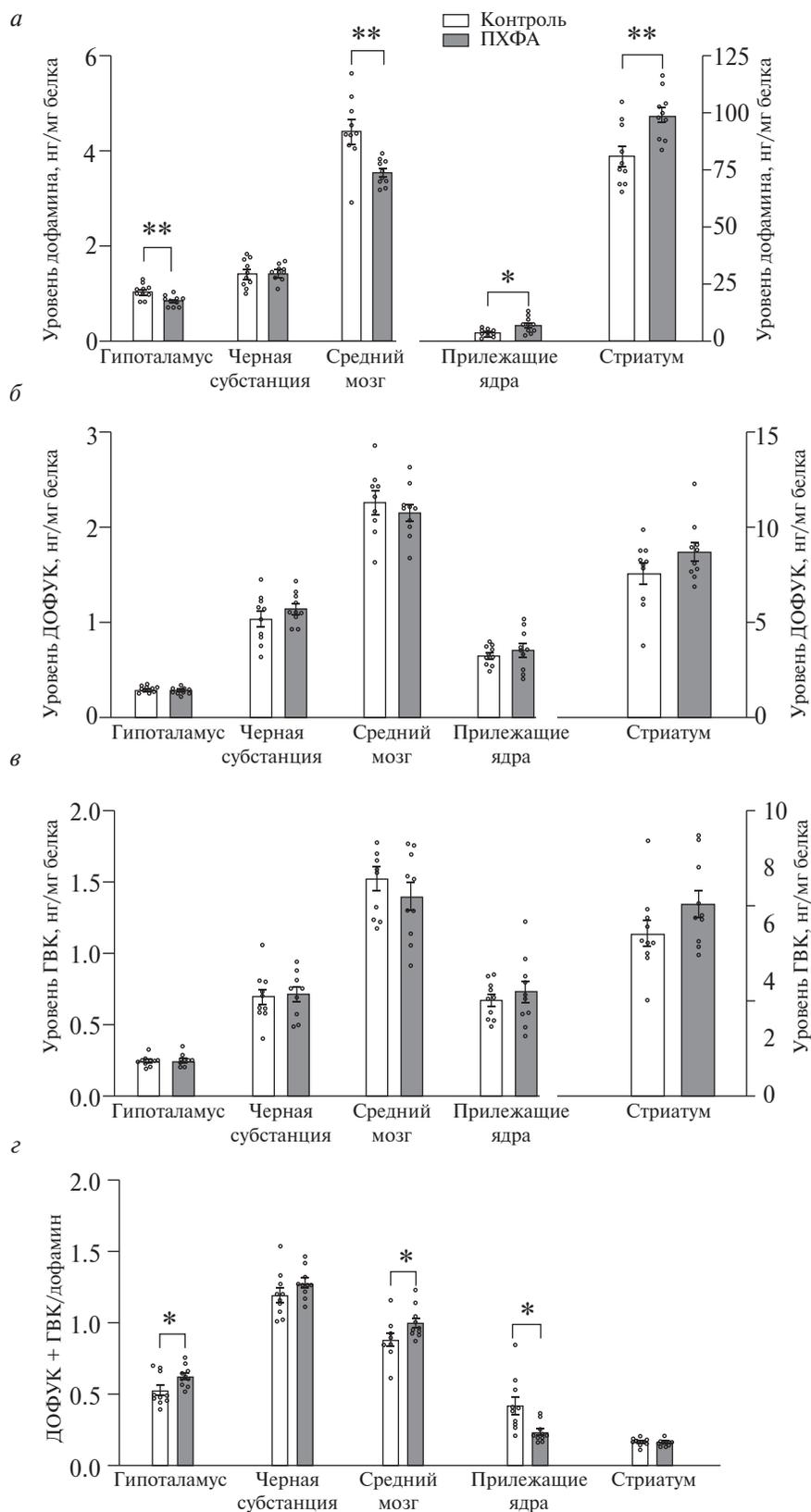
**Содержание серотонина в структурах мозга.** Для подтверждения эффективности ингибирования синтеза 5-НТ путем введения ПХФА были изучены уровни этого нейромедиатора в мозге. Результаты однофакторного дисперсионного анализа представлены в таблице 2. ПХФА привел к значительному падению содержания 5-НТ во всех исследуемых структурах мозга.

**Метаболизм дофамина в структурах мозга.** Уровень ДА снизился в гипоталамусе ( $t_{18}=3.36$ ,  $p < 0.01$ ) и среднем мозге ( $t_{18} = 3.66$ ,  $p < 0.01$ ) и повысился в стриатуме ( $t_{18} = 3.33$ ,  $p < 0.01$ ) и прилежащих ядрах ( $t_{18} = 2.83$ ,  $p < 0.05$ ) после трехдневного введения ПХФА. В то же время препарат не повлиял на содержание ДА в черной субстанции ( $t_{18} = 0.18$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 1а). Введение ПХФА не оказало эффекта на уровни метаболита ДОФУК в гипоталамусе ( $t_{18} = 1.31$ ,  $p > 0.05$ ), черной субстанции ( $t_{18} = 1.14$ ,  $p > 0.05$ ), среднем мозге ( $t_{18} = 0.84$ ,  $p > 0.05$ ), прилежащих ядрах ( $t_{18} = 0.70$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатуме ( $t_{18} = 1.52$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 1б). Также

**Таблица 2.** Влияние введения параклорфенилаланина (ПХФА) на содержание серотонина в структурах мозга мышей линии СВА

Структура	Контроль	ПХФА	t, p
Гипоталамус	$3.71 \pm 0.13$	$1.53 \pm 0.06$	$t_{18} = 15.28$ , $p < 0.001$
Черная субстанция	$8.21 \pm 0.47$	$3.43 \pm 0.14$	$t_{18} = 9.84$ , $p < 0.001$
Средний мозг	$18.14 \pm 0.71$	$8.57 \pm 0.32$	$t_{18} = 12.29$ , $p < 0.001$
Прилежащие ядра	$2.23 \pm 0.11$	$1.09 \pm 0.04$	$t_{18} = 10.19$ , $p < 0.001$
Стриатум	$2.91 \pm 0.25$	$1.89 \pm 0.18$	$t_{18} = 3.27$ , $p < 0.01$

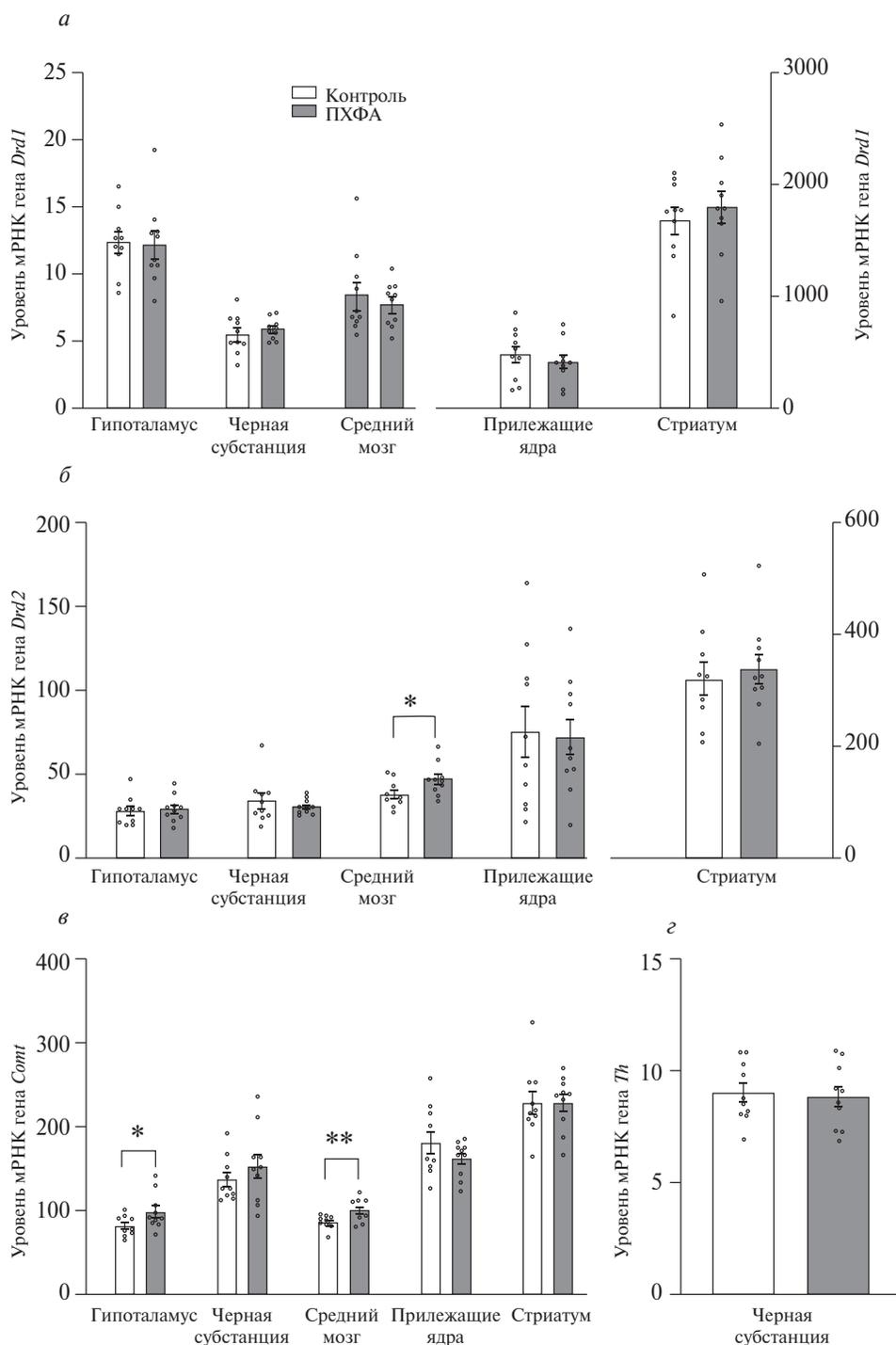
Концентрация серотонина (нг/мг белка) представлена как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, N = 10 мышей в группе



**Рис. 1.** Влияние введения параклорфенилаланина (300 мг/кг, 3 дня) на уровни дофамина (а), его метаболитов ДОФУК (б), НВА (в) и индекс метаболизма дофамина (ДОФУК+ГВК/дофамин) (г) в структурах мозга мышей линии СВА. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .  $N = 10$  животных в группе.

препарат не оказал влияния на уровни метаболита ГVK в гипоталамусе ( $t_{18} = 0.48, p > 0.05$ ), черной субстанции ( $t_{18} = 0.32, p > 0.05$ ), среднем мозге

( $t_{18} = 1.09, p > 0.05$ ), прилежащих ядрах ( $t_{18} = 0.79, p > 0.05$ ) и стриатуме ( $t_{18} = 1.55, p > 0.05$ ) (рис. 1б). Индекс метаболизма дофамина, определяемый как



**Рис. 2.** Влияние введения парахлорфенилаланина (300 мг/кг, 3 дня) на экспрессию генов дофаминовых рецепторов *Drd1* (а), *Drd2* (б), гена катехол-О-метилтрансферазы *Comt* (фермента метаболизма дофамина) (в) и гена тирозин-гидроксилазы *Th* (фермента синтеза дофамина) (г) в структурах мозга мышей линии СВА. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *Polr2a*.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . N = 10 животных в группе.

отношение ДОФУК+ГВК/дофамин, был выше для гипоталамуса ( $t_{18} = 2.29$ ,  $p < 0.05$ ), среднего мозга ( $t_{18} = 2.19$ ,  $p < 0.05$ ) и ниже для области прилежащих ядер ( $t_{18} = 2.80$ ,  $p < 0.05$ ) у мышей, получавших ПХФА по сравнению с контролем. В то же время этот показатель статистически не различался у обеих групп для черной субстанции ( $t_{18} = 1.07$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатума ( $t_{18} = 0.69$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 1з).

**Экспрессия генов в структурах мозга.** Введение ПХФА не оказало действия на уровни мРНК гена *Drd1*, кодирующего дофаминовый рецептор D1, в гипоталамусе ( $t_{18} = 0.08$ ,  $p > 0.05$ ), черной субстанции ( $t_{18} = 0.67$ ,  $p > 0.05$ ), среднем мозге ( $t_{18} = 0.61$ ,  $p > 0.05$ ), прилежащих ядрах ( $t_{18} = 0.48$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатуме ( $t_{18} = 0.65$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2а). Также препарат не повлиял на уровни мРНК гена *Drd2*, кодирующего дофаминовый рецептор D2, в гипоталамусе ( $t_{18} = 0.33$ ,  $p > 0.05$ ), черной субстанции ( $t_{18} = 0.77$ ,  $p > 0.05$ ), прилежащих ядрах ( $t_{18} = 0.18$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатуме ( $t_{18} = 0.45$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2а). Однако введение ПХФА привело к повышению экспрессии гена *Drd2* в среднем мозге ( $t_{18} = 2.22$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 2б). Уровни мРНК гена *Comt*, кодирующего фермент деградации дофамина КОМТ, увеличились в гипоталамусе ( $t_{18} = 2.27$ ,  $p < 0.05$ ) и среднем мозге ( $t_{18} = 2.93$ ,  $p < 0.01$ ) под действием ПХФА. В то же время препарат не оказал эффекта на экспрессию этого гена в черной субстанции ( $t_{18} = 0.97$ ,  $p > 0.05$ ), прилежащих ядрах ( $t_{18} = 1.33$ ,  $p > 0.05$ ) и стриатуме ( $t_{18} = 0.04$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2в). Кроме этого, уровни мРНК гена *Th*, кодирующего фермент синтеза дофамина тирозингидроксилазу, в черной субстанции не различались между группами мышей ( $t_{18} = 0.31$ ,  $p > 0.05$ ) (рис. 2г).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было проведено комплексное исследование эффектов ингибирования синтеза серотонина на время каталептического замирания и дофаминовую систему мозга у мышей линии СВА. Что касается подавления синтеза 5-НТ в ЦНС, то согласно одним данным, оно приводит к усилению ДА нейротрансмиссии в мозге крыс [23], но другие авторы сообщают об отсутствии влияния ингибирования центрального 5-НТ на метаболизм ДА в структурах мозга мышей линий BALB/c и C57BL/6J [24]. В нашей работе содержание ДА снизилось в гипоталамусе, среднем мозге и повысилось в стриатуме и прилежащих ядрах у мышей СВА после введения ПХФА, при этом препарат не повлиял на уровни метаболитов дофамина ДОФУК и ГВК ни в одной из исследованных структурах мозга. Эти результаты в совокупности с данными литературы могут свидетельствовать о значительном влиянии генотипа на 5-НТ/ДА взаимодействие в ЦНС.

ДА нейроны вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) среднего мозга посылают проекции к области прилежащих ядер по мезолимбическому пути [25]. Серотониновые рецепторы 5-НТ2А и 5-НТ2С вентральной области покрышки представляют особый интерес, поскольку их фармакологическая активация, соответственно, стимулирует и подавляет активность ДА нейронов в этом отделе и высвобождение ДА в прилежащем ядре [26, 27]. Таким образом, изменения ДА системы в мозге мышей СВА после введения ПХФА могут быть связаны с активацией 5-НТ2А-рецепторов (по компенсаторному механизму в ответ на подавление центрального 5-НТ), а также стимулирующим действием 5-НТ2А-рецепторов на ДА нейроны в VTA, что приводит к снижению содержания ДА в среднем мозге и его высвобождению в области прилежащих ядер. Однако эта гипотеза требует дополнительного экспериментального подтверждения. В то же время, это предположение согласуется с данными о том, что СИОЗС (ингибиторы обратного захвата 5-НТ), которые повышают внеклеточные уровни 5-НТ в VTA, могут вызвать небольшое снижение возбудимости ДА нейронов в этом отделе мозга [28]. Известно, что ауторецепторы D2 в VTA тонически ингибируют высвобождение дофамина в этой структуре [29], что согласуется с результатами настоящей работы, демонстрирующими повышение экспрессии рецепторов D2 и снижение ДА в среднем мозге мышей СВА, получавших ПХФА.

Известно, что ДА нейроны чёрной субстанции посылают аксоны в стриатум, образуя нигростриарный дофаминергический путь [25]. В нашей работе введение ПХФА привело к росту уровня ДА в стриатуме, не оказав при этом влияния на содержание этого нейромедиатора и его метаболитов в черной субстанции. Есть данные, демонстрирующие возможность синтеза ДА недофаминергическими нейронами в стриатуме у мышей, как в норме, так и при нарушениях иннервации этой структуры. Считается, что такой синтез ДА недофаминергическими нейронами является важным механизмом нейропластичности, способствующим компенсации дефицита ДА при дегенерации нигростриатных ДА нейронов [30]. Можно предположить, что в нашей работе значительное увеличение ДА в стриатуме, индуцированное ингибированием центрального 5-НТ и наблюдаемое при отсутствии изменений ДА иннервации в черной субстанции, обусловлено синтезом ДА недофаминергическими нейронами. Однако для подтверждения этой гипотезы требуется дополнительное исследование.

Гипоталамус является частью ДА тубероинфундибулярного пути, отвечающего за регуляцию гормональной секреции [5], причем синтез ДА происходит в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса [31]. В нашей работе введение ПХФА привело

к падению содержания дофамина и повышению экспрессии гена *Comt* (фермента деградации ДА) в гипоталамусе. Этот результат согласуется с данными литературы о том, что введение ПХФА приводит к дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [32, 33].

Ранее было показано участие 5-НТ системы мозга в регуляции наследственной каталепсии. С одной стороны, мыши линии СВА демонстрировали повышенную активность ключевого фермента синтеза 5-НТ ТППГ-2 в стриатуме, по сравнению с мышами других некаталептических инбредных линий [13], поэтому введение ТППГ2 могло бы привести к снижению времени замирания. С другой стороны, острое введение агонистов 5-НТ1А- и 5-НТ2А-рецепторов подавляло выраженность каталепсии у мышей линий СВА [34, 35], а длительное введение ингибиторов обратного захвата 5-НТ приводило к снижению длительности замирания у мышей каталептической линии ASC, родственной линии СВА [36]. Эти факты позволяют предполагать скорее прокаталептический эффект ПХФА. Однако в нашей работе трехдневное введение ПХФА, обусловившее значительное снижение уровня 5-НТ во всех исследованных структурах мозга, не оказало действия на длительность каталептического замирания.

Известно, что каталепсия, вызванная введением галоперидола, развивается вследствие дефицита дофаминергической иннервации, обусловленной блокадой D2-рецепторов нигростриарного пути [37]. В нашей работе мы обнаружили, что введение ПХФА приводит к повышению уровня ДА в стриатуме. Вероятно, индуцированный ПХФА рост уровня ДА в стриатуме может “компенсировать” возможное прокаталептическое влияние ингибирования ТППГ-2. Это предположение, конечно же, требует дополнительного экспериментального подтверждения.

Также следует отметить, что в развитие каталептического замирания могут быть вовлечены другие медиаторные системы. Так, у лабораторных грызунов каталепсию можно вызвать введением, например, морфина или его производных [38], 9-тетрагидроканнабинола [39], холиномиметиков или агонистов ГАМК-А и ГАМК-Б рецепторов [40]. В литературе есть данные, демонстрирующие влияние введения ПХФА на эндоканнабиноидную систему и ГАМК в ЦНС [41, 42]. Следовательно, эти системы могут также участвовать в регуляции каталептического замирания у мышей, получавших ПХФА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ингибирование ключевого фермента синтеза 5-НТ оказало значительное влияние на ДА систему мозга мышей линии СВА/Lac, как на уровне метаболизма нейромедиатора, так

и экспрессии ключевых генов ДА системы мозга. При этом наибольшие изменения были обнаружены в среднем мозге, структуре, где происходит основной синтез 5-НТ, и гипоталамусе, структуре, вовлеченной в регуляцию гормональной секреции. Результаты демонстрируют, что линия СВА/Lac является перспективной моделью для изучения взаимодействия 5-НТ и ДА нейромедиаторных систем.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00078). Разведение инбредной линии мышей СВА/Lac было выполнено за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

*Вклад авторов.* Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – концепция и руководство работой; Д.В. Базовкина, Е.Ю. Баженова – проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина – написание текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kulikova E.A., Kulikov A.V.* // Expert. Opin. Ther. Targets. 2019. V. 23. P. 655–667.
2. *Toufexis D., Rivarola M.A., Lara H., Viau V.* // J. Neuroendocrinol. 2014. V. 26. P. 573–86.
3. *Kulikov A.V., Gainetdinov R.R., Ponimaskin E., Kalueff A., Naumenko V.S., Popova N.K.* // Expert opinion on therapeutic targets. 2018. V. 22. P. 319–330.
4. *Walther D.J., Bader M.* // Biochem. Pharmacol. 2003. V.66. P. 1673–1680.
5. *Baskerville T.A., Douglas A.J.* // CNS Neurosci. Ther. 2010. V. 16. P. e92–123.
6. *Beaulieu J.M., Espinoza S., Gainetdinov R.R.* // Br. J. Pharmacol. 2015. V. 172. P. 1–23.
7. *Grace A.A.* // Nat. Rev. Neurosci. 2016. V. 17. P. 524–532.
8. *Dellu-Hagedorn F., Fitoussi A., De Deurwaerdère P.* // J. Neurosci. Methods. 2017. V. 280. P. 54–63.

9. *Esposito E., Di Matteo V., Di Giovanni G.* // Prog. Brain Res. 2008. V. 172. P. 3–6.
10. *Daniels J.* // J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 2009. V. 21. P. 371–380.
11. *Cattarinussi G., Gugliotta A.A., Hirjak D., Wolf R.C., Sambataro F.* // Schizophr. Res. 2024. V. 263. P. 194–207.
12. *Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K.* // Genes Brain Behav. 2008. V. 7. P. 506–512.
13. *Popova N.K., Kulikov A.V.* // Am. J. Med. Genet. 1995. V. 60. P. 214–220.
14. *Скринская Ю.А., Попова Н.К., Никулина Е.М., Куликов А.В.* // Журн. высш. нерв. деят-сти. 1997. Т. 47. № 6. С. 1032–1039.
15. *Waku I., Magalhães M.S., Alves C.O., de Oliveira A.R.* // Eur. J. Neurosci. 2021. V. 53. P. 3743–3767.
16. *Куликова Е.А., Фурсенко Д.В., Баженова Е.Ю., Куликов А.В.* // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 2. С. 313–320.
17. *Koe B.K., Weisman A.J.* // Pharmacol. Exp. Ther. 1966. V. 154. P. 499–516.
18. *Науменко Е.В., Попова Н.К., Старыгин А.Г.* // Журнал общей биологии. 1971. Т. 32. С. 731–736.
19. *Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Maslova G.B., Popova N.K.* // Behav. Genet. 1993. V. 23. № 4. P. 379–384.
20. *Bazovkina D., Naumenko V., Bazhenova E., Kondaurova E.* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Т. 22. № 21.
21. *Науменко В.С., Куликов А.В.* // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 1. С. 37–44.
22. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kulikov A.V., Kostina E.V.* // Journal of Neuroscience Methods. 2008. Т. 170. № 2. С. 197–203.
23. *Samanin R., Garattini S.* // Life Sci. 1975. V. 17. P. 1201–1209.
24. *Наркевич В.Б., Литвинова С.А., Роговский В.С., Цорин И.Б., Кудрин В.С.* // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 59–66.
25. *Klein M.O., Battagello D.S., Cardoso A.R., Hauser D.N., Bittencourt J.C., Correa R.G.* // Cellular and molecular neurobiology. 2019. V. 39. P. 31–59.
26. *Di Giovanni G., Di Matteo V., Pierucci M., Benigno A., Esposito E.* // Curr. Med. Chem. 2006. V. 13. P. 3069–3081.
27. *Porras G., Di Matteo V., Fracasso C., Lucas G., De Deurwaerdere P., Caccia S., Esposito E., Spampinato U.* // Neuropsychopharmacology. 2002. V. 26. P. 311–324.
28. *Di Mascio M., Di Giovanni G., Di Matteo V., Prisco S., Esposito E.* // Brain Research Bulletin. 1998. V. 46. P. 547–554.
29. *Chen N.N., Pan W.H.* // J. Neurochem. 2000. V. 74. P. 2576–2582.
30. *Блохин В.Е., Пронина Т.С., Угрюмов М.В.* // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 1. С. 39–45.
31. *Gudelsky G.A.* // Psychoneuroendocrinology. 1981. V. 6. P. 3–16.
32. *Shi H.Y., Lu Y., Li Y.X., Tian F.Z.* // China Med. Her. 2018. V. 15. P. 33–36.
33. *Si Y., Wang L., Lan J., Li H., Guo T., Chen X., Dong C., Ouyang Z., Chen S.Q.* // Pharm. Biol. 2020. V. 58. P. 915–924.
34. *Базовкина Д.В., Теренина Е.Е., Куликов А.В.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 8. С. 190–193.
35. *Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Zubkov E.A., Kulikov A.V.* // Genes Brain Behavior. 2010. Т. 9. № 5. С. 519–524.
36. *Tikhonova M.A., Alperina E.L., Tolstikova T.G., Bazovkina D.V., Di V.Y., Idova G.V., Kulikov A.V., Popova N.K.* // Neurosci Behav Physiol. 2010. V. 40. P. 521–527.
37. *Waku I., Magalhães M.S., Alves C.O., de Oliveira A.R.* // The European journal of neuroscience. 2021. V. 53. P. 3743–3767.
38. *Tuerke K.J., Beninger R.J., Paquette J.J., Olmstead M.C.* // Behav Pharmacol. 2011. V. 22. P. 558–563.
39. *Moore C.F., Weerts E.M.* // Psychopharmacology (Berl). 2022. V. 239. P. 1397–1408.
40. *Klemm W.R.* // Prog Neurobiol. 1989. V. 32. P. 403–422.
41. *Li X., He C., Shen M., Wang M., Zhou J., Chen D., Zhang T., Pu Y.* // J Ethnopharmacol. 2024. V. 319. P. 117331.
42. *Liu Y.M., Li J.C., Gu Y.F., Qiu R.H., Huang J.Y., Xue R., Li S., Zhang Y., Zhang K., Zhang Y.Z.* // Neurochem Res. 2024. V. 49. P. 1150–1165.

## Effect of Parachlorophenylalanine, an Inhibitor of the Serotonin Synthesis Enzyme, on the Brain Dopamine System of Cataleptic Mice

D. V. Bazovkina<sup>1</sup>, E. Yu. Bazhenova<sup>1</sup>, and A. V. Kulikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

This study examined the effects of administration of parachlorophenylalanine (PCPA), an inhibitor of the key enzyme serotonin synthesis, on the freezing immobility and dopamine brain system in CBA/Lac mice with a hereditary predisposition to catalepsy. Administration of PCPA (300 mg/kg/day, 3 days) did not affect the duration of cataleptic freezing. Whereas, dopamine content decreased in the hypothalamus and midbrain and increased in the striatum and nucleus accumbens of mice after PCPA treatment. The administration of the drug did not affect the levels of DOPAC and HVA (dopamine metabolites) in the all studied brain structures. In addition, a PCPA-induced increase in the mRNA level of DRD2 receptor gene in the midbrain and *Comt* (catechol-O-methyltransferase) gene in the hypothalamus and midbrain were found. However, no effect of PCPA on the expression of DRD1 receptor gene and Th (tyrosine hydroxylase, key enzyme dopamine synthesis) gene in the brain was found. Thus, inhibition of the key enzyme of 5-HT synthesis had a significant effect on the brain DA system of CBA/Lac mice, with the greatest changes being found in the midbrain and hypothalamus.

*Keywords: tryptophanhydroxylase, parachlorophenylalanine, serotonin, dopamine, receptors, brain, catalepsy, mouse*