Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, сельского и лесного хозяйства
(Биологический институт)
Кафедра зоологии позвоночных и экологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
д-р биол. наук, профессор

_____ Н. С. Москвитина

«_____»_____2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ НОВОГО ПОТЕНЦИАЛЬНОГО АНТИДЕПРЕССАНТА 8-ТРИФТОРМЕТИЛ-1,2,3,4,5-БЕНЗОПЕНТАТИЕПИН-6-АМИН ГИДРОХЛОРИДА (ТС-2153) НА ПОВЕДЕНИЕ И СЕРОТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА РЫБ *DANIO RERIO* В СРАВНЕНИИ С ФЛУОКСЕТИНОМ

по основной образовательной программе подготовки магистров
направление подготовки 06.04.01 - Биология

Энглевский Николай Александрович

Научный консультант
зав. сек. генетических коллекций нейропатологий ИЦиГ, д.б.н.
_____ А. В. Куликов
подпись
«5» июня 2017 г.

Научный руководитель ВКР
зав. каф. зоологии позвоночных и экологии БИ НИ ТГУ, д.б.н, проф.
_____Н. С. Москвитина
подпись
«5» июня 2017 г.

Автор работы
студент группы №01124
_____Н. А. Энглевский
подпись

Томск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, СОКРАЩЕНИЙ, ТЕРМИНОВ 3

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 8

1.1. Механизмы депрессии и действия антидепрессантов 8

1.2. ТС-2153 (8-трифторметил-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин гидрохлорид) как новый потенциальный антидепрессант и его действие на поведение и нервную систему 12

1.3. Рыбки *D. rerio* в качестве модели в психофармакологических исследованиях 15

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 19

2.1. Объект и протоколы экспериментов 19

2.2. Тест «новый резервуар». Аппаратное и программное обеспечение для проведения поведенческих исследований *D. rerio.* 20

2.3. Определение уровня биогенных аминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии 21

2.4. Статистика 22

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 23

3.1. Влияние острого введения ТС-2153 и флуокситина на поведение, концентрации 5-HT и 5-HIAA в головном мозге *D. rerio* 23

3.2. Влияние хронического введения ТС-2153 и флуокситина на поведение, концентрации 5-HT и 5-HIAA в головном мозге *D. rerio* 25

ОБСУЖДЕНИЕ 29

ВЫВОДЫ 33

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ: 34

ПРИЛОЖЕНИЕ А 45

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, СОКРАЩЕНИЙ, ТЕРМИНОВ

5-HIAA - 5-гидроксииндолуксусная кислота

5-HT (5-hydroxytryptamine) – 5-гидрокситриптамин / серотонин

5-HT_{1-7} – рецепторы серотонина

5-HTP - 5-гидрокситриптофана

BDNF - нейротрофический фактор мозга

SERT - трансмембранный транспортер серотонина

SSRI - селективный ингибитор обратного захвата 5-HT

TC-2153 – 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин гидрохлорид

TPH2 - триптофангидроксилаза 2

АД – антидепрессант

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДМСО – диметилсульфоксид, биполярныи□ апротонныи□ растворитель

ДР - депрессивные расстройства

MAOA; Maoa – моноаминоксидаза А; ген, кодирующии□ фермент MAOA

ПКА - протеинкиназа А

ТВИН-20 – полисорбат 20

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия - это тяжелое рецидивирующее психическое расстройство. По данным Всемирной Организации Здравоохранения депрессия входит в четверку по значимости заболеваний во всем мире. Считают, что к 2020 году она станет вторым по значимости заболеванием [Belzung et al., 2015]. Периодические приступы депрессии вызывают страдания, снижение качества жизни, трудоспособность, а также многократно увеличивают риск суицида, инсультов и сердечных приступов [Lepine et al., 2011]. Основным средством лечения депрессии являются антидепрессанты. Они занимают лидирующее место по продажам на фармакологическом рынке [Cipriani et al., 2016].

Однако существующие антидепрессанты обладают рядом негативных свойств, которые снижают их терапевтический эффект:

- Продолжительная задержка терапевтического эффекта (у разных препаратов от нескольких недель до нескольких месяцев);
- Устойчивость до 20-40% пациентов к антидепрессантам;
- Разнообразные негативные побочные эффекты (сонливость, тревожность, рвота, судороги и др. [Walker, 2013; Caldarone et al., 2015].

В связи с этим, разработка новых, более эффективных антидепрессантов является одной из ключевых проблем современной психофармакологии [Artigas, 2015; O'Leary et al., 2015]. Основным источником новых антидепрессантов являются природные соединения и их синтетические производные.

Синтезированный в Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова препарат гидрохлорид 8-трифторметил-1,2,3,4,5-пентатиепин-6-амина (ТС-2153) является синтетическим аналогом варацина, который является бициклическим сероорганическим соединением, первоначально обнаруженным в некоторых видах морских асцидий. Однако, в отличие от варацина и его природных аналогов, ТС-2153 характеризуется чрезвычайно низкой острой токсичностью (LD50 > 1000 мг/кг) [Khomenko et al., 2009].

Кроме того, было показано, что ТС-2153 обладает выраженной психотропной активностью при остром и хроническом введении. Так, острое введение ТС-2153 в дозе 10 мг/кг увеличивает исследовательское поведение в тесте hole-board и подавляет вызванные коразолом судороги [Khomenko et al., 2009], а в дозе 1 мг/кг оказывает выраженный обезболивающий эффект у мышей в тестах «горячая площадка» и «уксусные корчи» [Tolstikova et al., 2012]. Острое введение 20 и 40 мг/кг, как и хроническое введение в течение 14 дней 10 мг/кг ТС-2153 снижает выраженность наследственной каталепсии у мышей [Kulikov et al., 2012]. Недавно было показан выраженный антидепрессантный эффект острого введения ТС-2153 у мышей в тесте «принудительное плавание». Выраженность этого эффекта была соизмерима с таковыми клинически эффективных антидепрессантов флуоксетина и имипрамина [Kulikov et al., 2014; Куликова и др., 2015].

Эти антидепрессанты являются ингибиторами трансмембранного транспортера медиатора головного мозга, серотонина (5-HT) и увеличивают концентрацию медиатора в синаптической щели [Blier, El Mansari, 2013]. Было показано взаимодействие между ТС-2153 и 5-HT системой мозга. Хроническое введение ТС-2153 снижает экспрессию генов, кодирующих 5-HT1A рецептор и MAOA в среднем мозге мышей [Куликов и др., 2011]. Острое введение соединения увеличивает уровень 5-HT и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-HIAA) в головном мозге мышей [Kulikova et al., 2015].

Аквариумные рыбки *D. rerio (zebrafish)* широко используются в качестве модели в нейробиологических и психофармакологических исследованиях [Kalueff et al., 2014]. На этих рыбках изучают механизмы стресса, депрессии, тревожности, неврозов, различных форм нормального и патологического поведения. Эмбрионы и взрослые особи *D. rerio* используются для скрининга транквилизаторов, антидепрессантов, психостимуляторов, нейролептиков и других фармакологических средств, направленных на диагностику и лечение различных заболеваний, связанных с ЦНС [Stewart et al., 2014].

«Новый резервуар» (НР) является наиболее распространенным тестом на анксиолитическую активность. Рыбка, помещенная в незнакомый ей новый аквариум, первое время испытывает страх, держится ближе ко дну и редко поднимается к поверхности [Stewart et al., 2012]. Добавлении анксиолитиков таких как, этанол, диазепам, ЛСД, никотин увеличивает время пребывания в верхней половине резервуара [Stewart et al., 2012]. Острое введение больших доз (5 мг/л, в/б) типичного антидепрессанта ингибитора транспортера 5-НТ, флуоксетина [Maximino et al., 2013] или трехкратное помещение рыбок в воду, содержащую флуоксетин в концентрации 10 мг/л [Singer et al., 2016], также увеличивает время пребывания рыбок в верхней половине резервуара. Совершенно отсутствуют данные о влиянии ТС-2153 и его сочетания с флуоксетином на поведение и 5-НТ систему рыб.

Целью магистерской работы стало исследование острого и хронического влияния ТС-2153 на поведение в тесте НР и 5-НТ систему мозга рыб *D. rerio,* а также сравнение эффектов ТС-2153 с таковыми классического антидепрессанта флуоксетина.

Задачами магистерской работы стали**:**

1. Изучить влияние острого и хронического введения ТС-2153 и флуокситина на поведение рыб *D. rerio* в тесте НР.

2. Исследовать влияние острого и хронического введения ТС-2153 и флуокситина на уровень 5-НТ, 5-HIAA в мозге головном *D. rerio.*

Научная новизна:

Впервые выявлен выраженный анксиолитический / антидепрессантный эффект на поведение рыб в тесте НР острого введения малой дозы классического антидепрессанта флуоксетина (0,125 мг/л).

Впервые выявлен анксиолитический / антидепрессантный эффект на поведение рыб в тесте НР хронического введения ТС-2153, соизмеримый с таковым флуоксетина.

ТС-2153, в отличие от флуоксетина, при хроническом воздействии не оказывает негативных побочных эффектов 5-НТ систему мозга рыбок.

Не выявлено взаимодействия ТС-2153 и флуоксетина на поведение и 5-НТ систему рыбок, что свидетельствует о разных механизмах анксиолитического / антидепрессантного эффекта этих соединений.

Автор выражает благодарность за помощь в сборе биологического материала и написании работы: научному консультанту, зав. сек. генетических коллекций нейропатологий ИЦиГ, д.б.н., А.В. Куликову; научному руководителю, зав. каф. зоологии позвоночных и экологии БИ НИ ТГУ, д.б.н, проф., Н.С. Москвитиной. За творческий вклад в магистерскую диссертацию, а также за неоценимую помощь в постановке и отработке биохимических методие автор выражает благодарность научному сотруднику лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ, к.б.н., Е. А. Куликовой. Также автор выражает благодарность за помощь в организации научных, учебных и производственных практик на базе вивария, в процессе прохождения которых выполнялись блоки данной магистерской работы главному научному сотруднику ЦКП «SPF»-вивария, д.б.н., проф., М.П. Мошкину и заведующему ЦКП "SPF-виварий", к.б.н., Е.Л. Завьялову. Кроме того, автор выражает благодарность за организацию финансовой поддержки директора биологического института НИ ТГУ, д.б.н., Д.С. Воробьеву и коллектив Центра Академической Мобильности НИ ТГУ в лице Е.В. Васильевой.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы депрессии и действия антидепрессантов

По данным ВОЗ депрессивные расстройства (ДР) по массовости, социальным и экономическим последствиям входят в четверку наиболее серьезных заболеваний [Kessler et al., 2013; Belzung et al., 2015]. Приступы депрессии вызывают страдания, снижают качество жизни и трудоспособность больного и резко увеличивают риск суицида и сердечных приступов и инсультов [Lepine et al., 2011]. Антидепрессанты (АД) являются основным средством терапии ДР и занимают лидирующее место по продажам на фармакологическом рынке [Cipriani et al., 2016].

Однако существующие АД имеют ряд негативных свойств, резко снижающие их терапевтический эффект: 1) продолжительная от нескольких недель до нескольких месяцев задержка терапевтического эффекта, 2) устойчивость к АД у 20-40% пациентов и 3) разнообразные негативные побочные эффекты, такие как сонливость, тревожность, рвота, снижение порога судорог и т.п. [Walker, 2013; Caldarone et al., 2015]. Поэтому разработка новых и более эффективных АД является одной из ключевых проблем современной психофармакологии [Artigas, 2015; O’Leary et al., 2015].

Для эффективной разработки АД нового поколения необходимо понимание механизмов депрессии и действия АД. Согласно нейротрофической гипотезе ДР это довольно разнородная группа нейродегенеративных заболеваний связанных с эмоциональной сферой отделов головного мозга, таких как передняя кора, гиппокамп, миндалина [Duman. Voleti, 2012; Duman, Li, 2012; Willner et al., 2013; Mahar et al., 2014; Belzung et al., 2015; Miller et al., 2015].

Серотониновая (5-HT) система мозга является мишенью для клинически эффективных «классических» АД. Поэтому подавляющее большинство исследователей связывают повышенный риск ДР с нарушениями 5-HT системы мозга [Lapin et al., 1969; Maes et al., 2011; Hamon et al., 2013; Walker, 2013; Hale et al., 2013; Oliver, 2015; Haas et al., 2015; Kohler et al., 2016].

5-HT система головного мозга представлена группой нейронов, способных синтезировать 5-HT и использовать его в качестве медиатора. Тела 5-HT нейронов локализованы в области шва среднего мозга и в продолговатом мозгу и посылают аксоны во все области головного и спинного мозга, соответственно [Gaspar et al., 2012]. В головном мозге 5-HT синтезируется из незаменимой аминокислоты L-триптофана в две стадии: на первой стадии фермент триптофангидроксилаза 2 (TPH2) гидроксилирует триптофан до 5-гидрокситриптофана (5-HTP), на второй – фермент декарбоксилаза ароматических аминокислот декарбоксилирует 5-HTP до 5-HT. Первая стадия является ключевой: ингибирование TPH2 п-хлорфенилаланином [Kulikov et al., 2012a] или нокаут гена Tph2 [Mosienko et al., 2015] драматически снижают уровень 5-HT в головном мозгу мыши, а TPH2 является специфическим маркером 5-HT нейронов [Walther et al., 2003].

При возбуждении серотониновых нейронов 5-HT секретируется в межнейронной пространство и, взаимодействуя с 14 типами различных постсинаптических 5-HT рецепторов, участвует в регуляции многочисленных форм поведения [Pytliak et al., 2011]. Секреция 5-HT регулируется по принципу отрицательной обратной связи 5-HT1A пресинаптическими ауторецепторами, локализованными на 5-HT нейронах и их окончаниях: активация данных рецепторов (например, агонистом 8-OH-DPAT) резко снижает секрецию медиатора [Artigas, 2013]. Секретированный 5-HT удаляется из синаптической щели с помощью белка – транспортера (5-HTT), который возвращает секретированный 5-HT назад в пресинаптический нейрон [Spies et al., 2015], где он вновь реутилизируется или дезаминируется ферментом моноаминоксидазой А (MAOA) до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-HIAA) [Shih et al., 2011]. Ингибиторы 5-HTT и MAOA увеличивают концентрацию 5-HT в межклеточном пространстве и являются клинически эффективными (классическими) АД [Hamon et al., 2013].

Согласно нейротрофической гипотезы важнейшей причиной развития ДР является недостаток нейротрофического фактора мозга (BDNF) – белка,

регулирующего нейрогенез и дендрогенез и необходимого для выживания нейронов [Duman et al., 2012; Duman et al., 2012]. Стресс увеличивает секрецию глюкокортикоидов, которые подавляют синтез BDNF, что уменьшает число дендридов и межнейрональных контактов, гибель нейронов и в конечном итоге – дегенерацию коры и гиппокампа и, как следствие, увеличивает риск ДР. Напротив, клинически эффективные АД, такие как трициклические АД, селективные ингибиторы 5-HTT и MAOA, увеличивают концентрацию экстраклеточного 5-HT и стимуляцию 5-HT рецепторов, сопряженных с Gs белками, возможно 5-HT4 [Lucas et al., 2007] или 5-HT6 [Carr et al., 2011], вызывают накопление цАМФ и увеличение экспрессии белка CREB. Последний стимулирует экспрессию BDNF и терапевтический (антидепрессантный) эффект.

Однако существующие АД имеют ряд недостатков, снижающих их клиническую эффективность. В то время как АД увеличиваю уровень 5-HT в течение нескольких минут, их терапевтический эффект проявляется только после нескольких недель или месяцев введения. Эта задержка обусловлена наличием пресинаптических 5-HT1A ауторецепторов [Blier et al., 1994; Artigas, 2013; Попова и др., 2015; Naumenko et al., 2014]. Увеличение экстранейронального 5-HT после приема АД активирует эти рецепторы и снижает секрецию новых порций медиатора. Таким образом, наличие пресинаптических 5-HT1A рецепторов тормозит вызываемое АД увеличение уровня 5-HT в синаптической щели. Однако длительная стимуляция 5-HT1A вызывает их десенситизацию и они уже более не препятствуют вызываемому АД увеличению уровня 5-HT в межклеточном пространстве, что ускоряет терапевтическое действие АД.

Ключевой проблемой психофармакологии является устойчивость к антидепрессантам. В настоящее время механизмы устойчивости к антидепрессантам не ясны, хотя нет недостатка в гипотезах. Не вызывает сомнения влияние генетических факторов на устойчивость. Однако многочисленные попытки выявить эти факторы окончились неудачей.

Полногеномный анализ и подход генов-кандидатов не выявил каких-либо существенных генетических факторов, ассоциированных с устойчивостью к АД [Laje et al., 2011; Uher et al., 2010; Porcelli et al., 2011a; 2011b; Harrison, 2015; Fabbri et al., 2014; Noordam et al., 2016].

Недавно была показана ключевая роль взаимодействия 5-HTT и TPH2 в механизме устойчивости к селективным ингибиторам обратного захвата 5-HT (SSRI). Хроническое введение SSRI пароксетина и флуоксетина резко снижает уровень 5-HT в мозге до 1% от нормы у мышей линии Tph2KI с наследственно сниженной активностью TPH2, тогда как у мышей с высокой активностью фермента падение уровня медиатора менее значимо [Siesser et al., 2013]. SSRI нарушает нормальную рециркуляцию 5-HT и опустошает нейрональный пул медиатора. Высокая активность TPH2 восстанавливает этот пул, в то время как, низкая активность фермента не способна восстановить пул и приводит к резкому снижению уровня 5-HT. Таким образом, SSRI не будут оказывать необходимого терапевтического действия или, даже, ухудшать состояние у пациентов с наследственно низкой активностью TPH2.

Негативные побочные эффекты АД связывают с гиперактивацией 5-HT2A рецепторов, которые сопряжены с Gq белками. Эти рецепторы являются мишенями для галлюциногенов типа LSD25, DOI и им подобных. Их активация вызывает нарушение моторики, тремор, рвоту, потливость, нарушения моторики и в ряде случаев галлюцинации [Canal et al., 2012; Hanks et al., 2013; Mestre et al., 2013; Halberstadt, 2015].

Таким образом, возникает неразрешимое противоречие. С одной стороны, необходимым (начальным) этапом в механизме терапевтического эффекта клинически эффективных классических АД является увеличение концентрации 5-HT в синаптическом пространстве за счет подавления его обратного захвата или ферментативного разрушения. С другой стороны, это увеличение является причиной задержки терапевтического эффекта через активацию пресинаптических 5-HT1A рецепторов и негативных побочных эффектов через активацию постсинаптических 5-HT2A рецепторов. Более того, наследственное

снижение активности ключевого фермента синтеза 5-HT, TPH2, является вероятной причиной устойчивости к SSRI. Эта неизбежная дуальная зависимость терапевтических и негативных эффектов классических АД от эндогенного 5-HT стимулирует поиск АД нового поколения, действующих через другие медиаторные системы, например через глутаматную систему, активирующих 5-HT систему или действующих прямо на процессы нейрогенеза и дендрогенеза [Artigas, 2015]. Потенциальными источниками АД нового типа, отличающихся от классических АД по механизму действия, являются природные соединения или их синтетические аналоги. Современные антидепрессанты приводят к ремиссии только в 40-60% [Подкорытов и др., 2002]. Некоторые ученые утверждают, что антидепрессанты эффективны в основном при тяжелых формах депрессии, и практически не эффективны при легких и средних формах [Fournier et al., 2010].

В связи с этим, в настоящее время стоит острая необходимость в поиске новых, более эффективных антидепрессантов, позволяющих повысить эффективность лечения депрессии и снизить побочные эффекты. Наиболее перспективным направлением в поиске антидепрессантов являются исследования природных биологически активных соединении и их синтетических аналогов.

1.2. ТС-2153 (8-трифторметил-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин гидрохлорид) как новый потенциальный антидепрессант и его действие на поведение и нервную систему

Это соединение является синтетическим аналогом варацина – продукта некоторых видов асцидий. Оно было впервые синтезировано 2009 г. в ФГБУН НИОХ СО РАН [Khomenko et al., 2009]. В отличие от варацина и его природных аналогов, ТС-2153 характеризуется низкой острой токсичностью [Khomenko et al., 2009]. Было показано, что это соединение обладает выраженной психотропной активностью при остром и хроническом введении. Так, острое введение ТС-2153 в дозе 10 мг/кг увеличивает исследовательское

поведение в тесте hole-board и подавляет вызванные коразолом судороги (Khomenko et al., 2009), а в дозе 1 мг/кг оказывает выраженный обезболивающий эффект в тестах «горячая площадка» и «уксусные корчи» [Tolstikova et al., 2012]. Острое введение 20 и 40 мг/кг, как и хроническое введение в течение 14 дней 10 мг/кг ТС-2153 снижает выраженность наследственной каталепсии у мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) [Kulikov et al., 2012b], созданной в ФГБУН ФИЦ ИЦиГ СО РАН как модель депрессии [Базовкина и др., 2005; Kondaurova et al., 2006].

Важно отметить, что каталепсия у мышей линии ASC чувствительна к хроническому, но не острому введению антидепрессантов: хроническое введение антидепрессантов имипрамина [Тихонова и др., 2006] и флуоксетина [Тихонова и др., 2009a] резко снижает выраженность каталепсии у мышей ASC. Однократное введение 300 нг BDNF в боковой желудочек мозга снижает интенсивность каталепсии у мышей ASC и это антикаталептическое действие сохраняется в течение 1.5 мес [Тихонова и др., 2009b; Tikhonova et al., 2012; Naumenko et al., 2012].

Более того, хроническое введение в течение 14 дней 10 мг/кг ТС-2153 увеличивает уровень мРНК гена BDNF [Kulikov et al., 2012b] и снижает уровень мРНК генов, кодирующих 5-HT1A и MAOA в среднем мозге, где расположены тела 5-HT нейронов [Куликов и др., 2011] у мышей ASC. Иными словами, эти эффекты хронического воздействия ТС-2153 напоминают действие классических антидепрессантов. Поэтому, было предположено, что ТС-2153 будет оказывать антидепрессантное действие.

Тест «принудительное плавание» является самым распространенным тестом на антидепрессантную активность: 90% клинически эффективных АД при остром введении снижают время депрессивно-подобного замирания у мышей и крыс в этом тесте [Willner, 1990]. Влияние острого введения 20 мг/кг ТС-2153 на поведение мышей каталептических линий CBA, AKR.CBA-D13Mit76 и устойчивой к каталепсии линии AKR в тестах «принудительное плавание», «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» было

сравнено с действием такой же дозы классических АД, имипрамина и флуоксетина [Kulikov et al., 2014; Куликова и др., 2015]. Было показано, что ТС-2153 также эффективно снижает время неподвижности в тесте «принудительное плавание», как и классические АД, но в отличие от имипрамина и флуоксетина ТС-2153 не оказывает побочных седативного и анксиогенного эффектов [Kulikov et al., 2014; Куликова и др., 2015]. Недавно было показано, что острое введение 20 и 40 мг/кгТС-2153 увеличивает уровень 5-HT, 5-HIAA, дофамина и гомованилиновой кислоты в гиплталамусе мышей линии C57BL/6 [Kulikova et al., 2015]. Таким образом, ТС-2153 обладает выраженным антидепрессантным действием, сходным с таковым классических АД, но без негативного побочного эффекта. 5-HT система мозга вовлечена в механизм действия ТС-2153.

В 2014 г. коллектив исследователей Йельского (Yale) университета (США), возглавляемый Paul Lombroso показали, что ТС-2153 является ингибитором фермента striatal enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) [Xu et al., 2014]. Этот фермент отщепляет фосфатные группы от остатков тирозина, которые были присоединены тирозиновыми киназами, в молекулах различных белков [Lombroso et al., 1991; 1993]. Иными словами, STEP подавляет эффект тирозиновых фосфатаз. Белок STEP кодируется геном Ptpn5 и экспрессируется исключительно в ЦНС в виде двух альтернативных сплайсинговых форм STEP61 и STEP46. Обе эти формы экспрессируются в стриатуме и центральных ядрах миндалины, тогда как STEP61 еще и в гиппокампе, коре и латеральной миндалине. STEP участвует в трансдукции сигналов с рецепторов медиаторов и трофических факторов их субстратами являются киназы MAPK семейства, ERK1/2, а также белки, участвующие в трансдукции сигнала с глутаматных рецепторов, такие как Fyn, Pyk2, N2B субъединицы NMDA рецептора и GluR2 рецептор [Goebel-Goody et al., 2012]. STEP играет важную роль в механизме нейрональной пластичности и памяти [Kamceva et al., 2016]. Нокаут гена Ptpn5 усиливает когнитивные способности мышей. Несмотря на то, что мыши с нокаутом гена Ptpn5 и мыши дикого типа одинаково хорошо обучаются и

запоминают положение платформы в водном лабиринте Морриса, первые демонстрируют большую пластичность памяти и скорее переучиваются при перемещении платформы в другой сектор.

Гиперактивация STEP связана с развитием ряда патологий нервной системы и поведения, таких как болезни Альцгеймера и шизофрения, тогда как недостаток активности фермента связан с болезнью Хантингтона, а также при ишемии и инсульте [Goebel-Goody et al., 2012]. Было показано, что TC-2153 восстанавливает когнитивный дефицит у мышей 3xTg-AD, которые являются распространенной моделью болезни Альцгеймера, и вызванный введением мышам ингибитора NMDA рецепторов – фенилциклидина [Xu et al., 2014; 2016b].

Имеются доказательства, что BDNF и STEP находятся в антогонистических отношениях. BDNF снижает STEP61 концентрацию в культуре первичных нейронов коры in vitro [Saavedra et al., 2016]. В то же время, снижение уровня BDNF у Bdnf+/- мышей увеличивает уровень STEP61. Стимуляция trkB рецепторов снижает уровень STEP61 у этих мышей [Xu et al., 2016a]. С другой стороны, ингибирование STEP с помощью TC-2153 увеличивает уровень BDNF в мозге мышей [Xu et al., 2016a].

1.3. Рыбки *D. rerio* в качестве модели в психофармакологических исследованиях

Danio rerio - вид пресноводных лучепёрых рыб семейства карповых. Это аквариумная рыбка размером до 4,5 сантиметров с длинным телом, основной тон серебристый с ярко-синими полосами (Рисунок 1). В дикой природе они населяет реки и ручьи Пакистана, Индии, Бангладеш, Непала, Мьянмы и Бутана [Решетников и др., 1989].

Рисунок 1 - Внешний вид аквариумной рыбки *D. rerio*.

В настоящее время многие крупные университеты и исследовательские центры по всему миру используют *D. rerio* в качестве модельных организмов. Национальные институты здоровья США недавно построили самый большой центр в мире по работе с *D. rerio*, в котором размещены 19 тысяч аквариумов и более 100 тысяч экземпляров рыбок.

Интерес к *D. rerio* в последние годы резко возрос в связи с высокой физиологической и генетической гомологией с человеком, легкости генетических манипуляций и схожестью морфологии центральной нервной системы морфология. Геном *D. Rerio* полностью расшифрован в Институте Сенгера (Великобритания).

Количество экспериментальных работ с использованием рыб *D. Rerio* постоянно увеличивается. На рисунке 2 представлены данные по количеству публикаций, индексированных в системе «Scopus» по ключевому словосочетанию «Danio rerio».

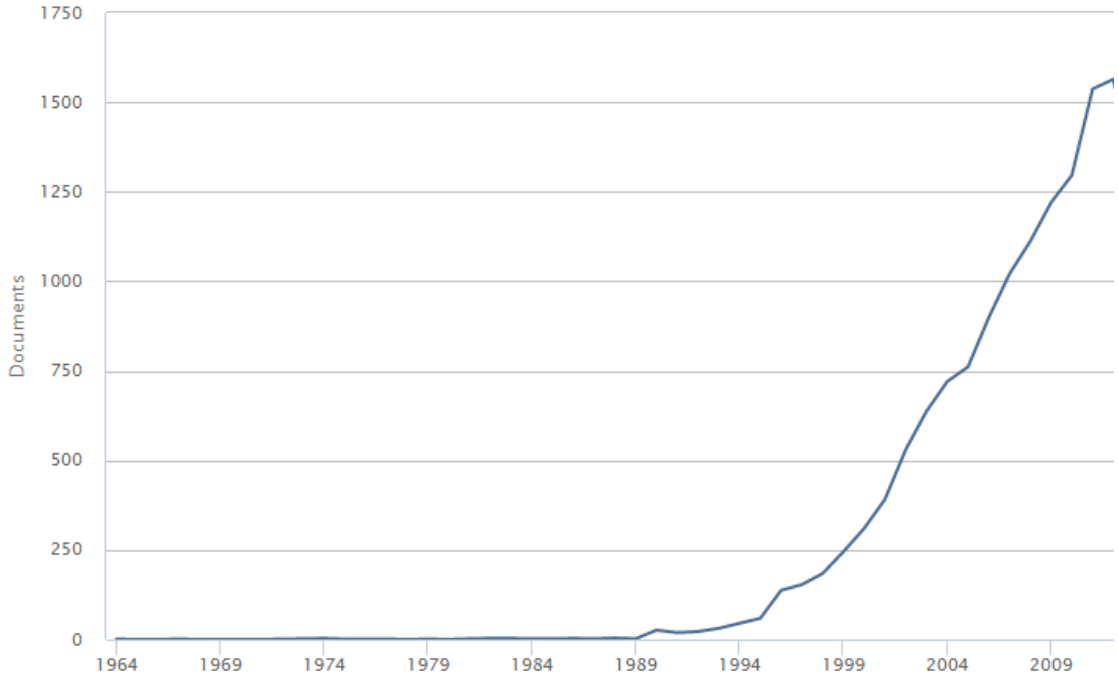


Рисунок 2 - Число публикаций в системе «Scopus» с использованием словосочетания «Danio rerio».

Лидером по количеству публикаций с использованием ключевой фразы «Danio rerio» являются Соединенные штаты Америки, Германия, Китай и Великобритания (Рисунок 3). В России с 1964-го по 2016-й год включительно опубликовано всего 70 публикаций с использованием этой ключевой фразы.

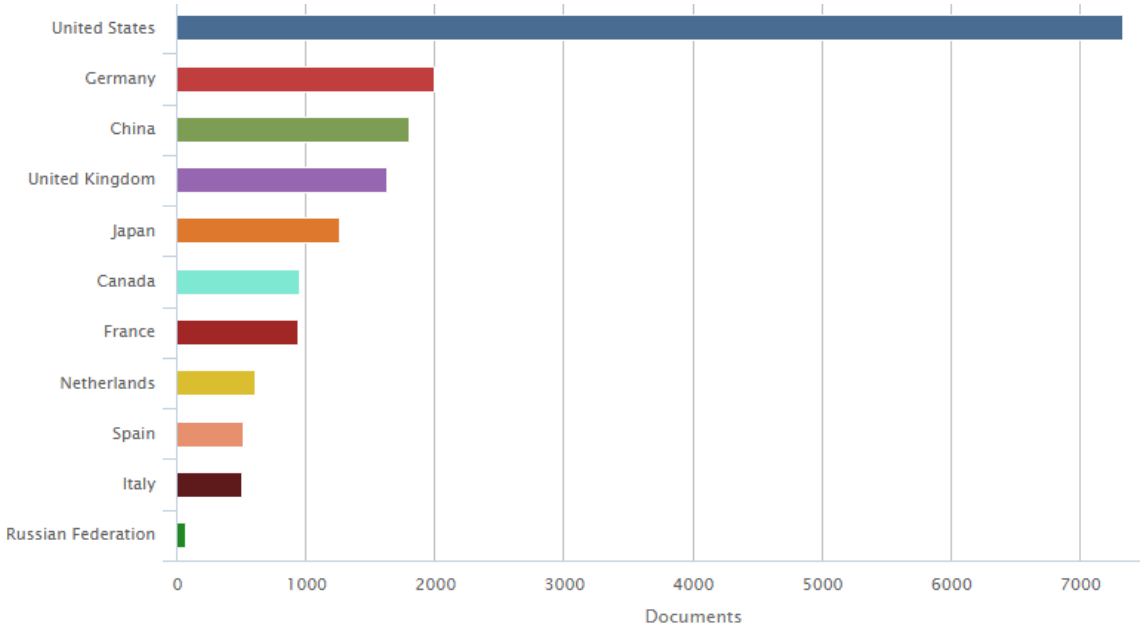
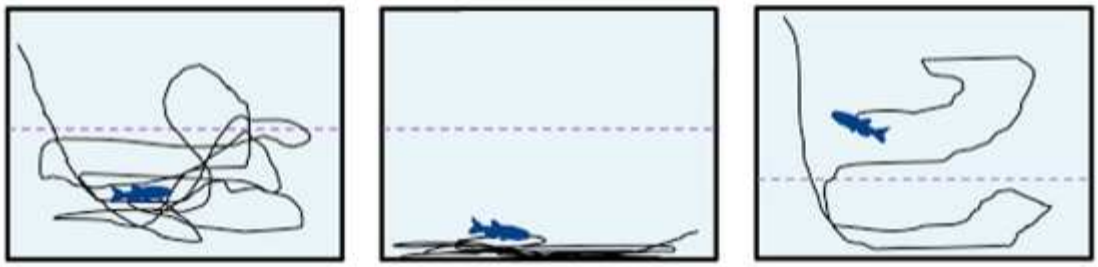


Рисунок 3 - Страны-лидеры по количеству публикаций с использованием словосочетания «Danio rerio».

D. rerio в настоящее время становится популярным модельным организмом в фармакогенетике и нейрофармакологии. Личинки и взрослые особи *D. rerio* показывают высокую чувствительность к различным фармакологическим препаратам [Cachat et al., 2010; Stewart et al,. 2011; 2014; Kalueff et al., 2014].

Одним из основных поведенческих тестов у *D. rerio* является тест «новый резервуар» (НР). С его помощью исследуют действие анксиолитиков – соединений снижающих тревогу [Nguyen et al., 2014; Stewart et al., 2014]. Рыбка, помещенная в незнакомый ей новый аквариум, первое время испытывает страх, держится ближе ко дну и редко поднимается к поверхности [Stewart et al., 2012]. Добавлении анксиолитиков, таких как этанол, диазепам, ЛСД, никотин увеличивает время пребывания в верхней половине резервуара [Stewart et al., 2012] (рисунок 4). Содержание рыбок в течение двух недель в воде с 0.1 мг/л типичного антидепрессанта ингибитора транспортера 5-НТ, флуоксетина, а также острое введение больших доз (5 мг/л, в/б) флуоксетина [Maximino et al., 2013] или трехкратное помещение рыбок в воду, содержащую флуоксетин в концентрации 10 мг/л [Singer et al., 2016], также увеличивает время пребывания рыбок в верхней половине резервуара. В то же время, не имеется информации об остром или хроническом эффектах ТС-2153 на повеление рыбок в тесте НР.



а) б) в)

Рисунок 4 - Поведенческие реакции *D. rerio* в контроле (а), при проявлении тревожности (б) и действии анксиолитиков (в).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект и протоколы экспериментов

Опыты проводили на 56 взрослых (возраст 3 мес.) вуалевых *D. rerio* линии NTL обоего пола, разводимых в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). За 10 дней до эксперимента они содержались в общем 120 л. аквариуме, наполненном фильтрованной водой при температуре 25о С и освещении 12 часов свет:12 часов темнота. Рыбок кормили 2 раза в сутки сухим кормом Tetramin Tropical Flakes (Tetra, США) и 2 раза в неделю мороженым мотылем (Chironomus plumosus).

В остром эксперименте рыбок помещали на 3 ч. индивидуальные 0.5 л контейнеры, в которые добавляли растворитель (0.5% ДМСО и 0.5% Твин 20) (n=12), флуоксетин (0.25 мг/л + растворитель) (n=6), ТС-2153 (0.25 мг/л + растворитель) (n=6), или смесь флуоксетина (0.25 мг/л), ТС-2153 (0.25 мг/л) в растворителе (n=6).

В хроническом эксперименте рыбок каждой из четырех экспериментальных групп содержали в отдельных аквариумах на 4 л по 8 особей, в которые был добавлен растворитель (0.5% ДМСО и 0.5% Твин 20) (n=8), 0.125 мг/л ТС-2153 в растворителе (n=8), 0,125 мг/л флуоксетин в растворителе (n=8) или смесь флуоксетина (0.125 мг/л), ТС-2153 (0.125 мг/л) в растворителе (n=8). Воду непрерывно аэрировали и меняли ежедневно. Непосредственно за 3 ч до тестирования рыбок изолировали в стаканы на 0,5 л, содержащие эти соединения в тех же концентрациях или растворитель. Через 3 ч. рыбок тестировали в НР, затем помещали в ледяную воду для эвтаназии, выделяли целиком головной мозг, замораживали его жидким азотом и хранили при -80²С до определения концентрации 5-HT и 5-HIAA.

2.2. Тест «новый резервуар». Аппаратное и программное обеспечение для проведения поведенческих исследований *D. rerio.*

Поведение тестировали между 11.00 и 13.00 часами местного времени в стеклянную кювету 240 х 150 х 70 мм. До начала теста в кювету наливали 1 л фильтрованной воды, затем в нее выливали содержимое контейнера вместе с рыбкой и кювету помещали в в специальный держатель и освещали двумя светодиодными лампами 5 вТ каждая, расположенными на расстоянии 40 см сверху и 10 см за кюветой и отделенной от нее матовым экраном (Рис.6). Такое освещение позволяло получить необходимый контраст с фоном, необходимый для автоматической трассировки движений рыбки. изображение рыбки. Положение рыбки регистрировали в течение 5 мин с частотой 30 кадров/сек веб-камерой, расположенной в 49 см перед передней стенкой кюветы и соединенной с компьютером через USB порт. Изображения с камеры автоматически обрабатывались программой EthoStudio [Kulikov et al., 2008]. Определяли стандартные для данного теста показатели, такие как время, проведенное в нижней половине резервуара (%), пройденный путь (см) и величина исследованной площади резервуара (%) [Cachat et al., 2010]. Последний параметр оценивали как отношение площади пространства, посещаемого рыбкой и общей площади кюветы. Эти параметры вычислялись автоматически. После тестирования рыбку вылавливали и усыпляли в холодной воде.

Рисунок 5 - Аппаратное обеспечение для проведения теста «новый резервуар».

2.3. Определение уровня биогенных аминов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Головной мозг вынимали из кельвинатора и гомогенизировали в 120 мкл 0.6 М HClO4. Аликвоту 100 мкл гомогената переносили в чистую пробирку на 1.5 мл и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин и 4 С. Супернатант количественно переносили в чистую пробирку, разбавляли стерильной водой вдвое и аликвоту 20 мкл разбавленного супернатанта вводили в хроматограф.

Система для определения уровня моноаминов и их метаболитов состояла из колонки Luna C18(2) (размер частиц 5мкм, L × I.D. 75 ×4.6 mm, Penomenex, USA) с электрохимическим детектором (750 mV, DECADE II™ Electrochemical

Detector; Antec, The Netherlands) и стеклоуглеродной ячейкой (VT-03 ячейка 3mm GC sb;Antec, The Netherlands), контролера CBM-20A, насоса LC-20AD, проточного дегазатора DGU-20A5R и устройства автоматической подачи проб SIL-20A (Shimadzu Corporation, Japan). Литр мобильной фазы содержал 13.06 г KH2PO4, 200 мкл 0.5 M Na2EDTA, 300 мг 1-октансульфоната натрия (Sigma, USA) и метанол (13% объема; Вектор, Россия), pH = 3.2.

В качестве стандартов использовали смесь, содержащую 1 нг 5-HT и 5-HIAA (Sigma, США).

Белок в осадке после центрифугирования определяли по Бредфорду. К осадку белка приливали 1мл 0.1M NaOH, растворяли его при 37ºC и небольшом встряхивании (1000rpm). Реактив Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, Inc.) разводили в соотношении 1:4 miliQ H2O согласно инструкции производителя. Для определения концентрации белка в пробах к 195мкл готового реактива добавляли 5мкл пробы, встряхивали, центрифугировали и через 10 минут измеряли концентрацию белка на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Германия) с заранее заданной калибровочной кривой.

Концентрацию 5-HT и 5-HIAA в мозге выражали в нг/мг белка.

2.4. Статистика

Данные представляли как среднее ± SEM и анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (факторы флуоксетин и TC-2153) с последующим апостериорным сравнением по Фишеру.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние острого введения ТС-2153 и флуокситина на поведение, концентрации 5-HT и 5-HIAA в головном мозге *D. rerio*

Выявлено влияние острого введения флуоксетина ($F_{1,20} = 9.97$, $p<0.01$), но не ТС-2153 ($F_{1,20} = 2.06$, $p>0.05$) и их взаимодействия ($F_{1,20} < 1$) на время, проведенное в нижней половине резервуара. Рыбки, которым вводили один флуоксетин ($p<0.05$) или флуоксетин совместно с ТС-2153 ($p<0.001$) меньше времени проводили в нижней половине резервуара по сравнению с контролем (Рисунок 6).

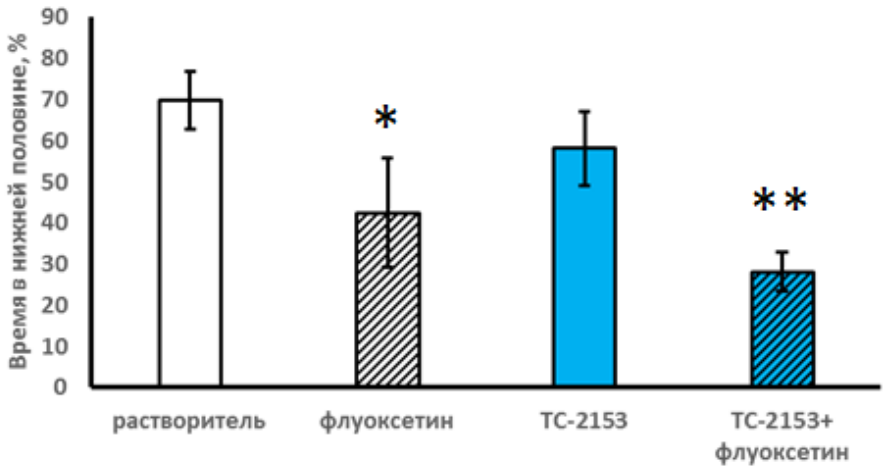


Рисунок 6 - Влияние острого введения ТС-2153 и флуокситина на время в нижней половине резервуара.

Примечание: *$p<0.05$, **$p<0.01$ по сравнению с растворителем.

В то же время, не выявлено влияния флуоксетина (площадь $F_{1,20} = 2.61$, $p>0.05$, путь $F_{1,20} = 2.56$, $p>0.05$), ТС-2153 (площадь $F_{1,20} < 1$, путь $F_{1,20} < 1$) или их взаимодействия (площадь $F_{1,20} < 1$, путь $F_{1,20} < 1$) на величину исследованной площади и пройденный путь (Рисунки 7-8).

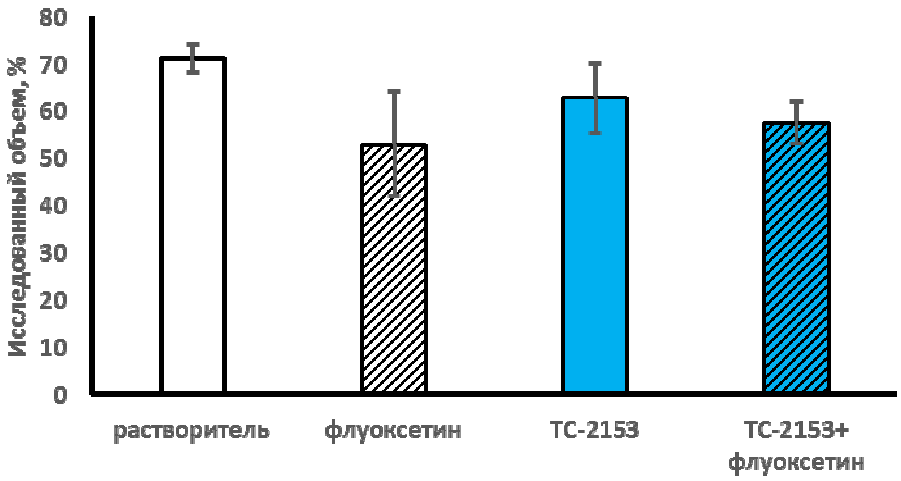


Рисунок 7 - Влияние острого введения ТС-2153 и флуокситина на величину исследованной площади.

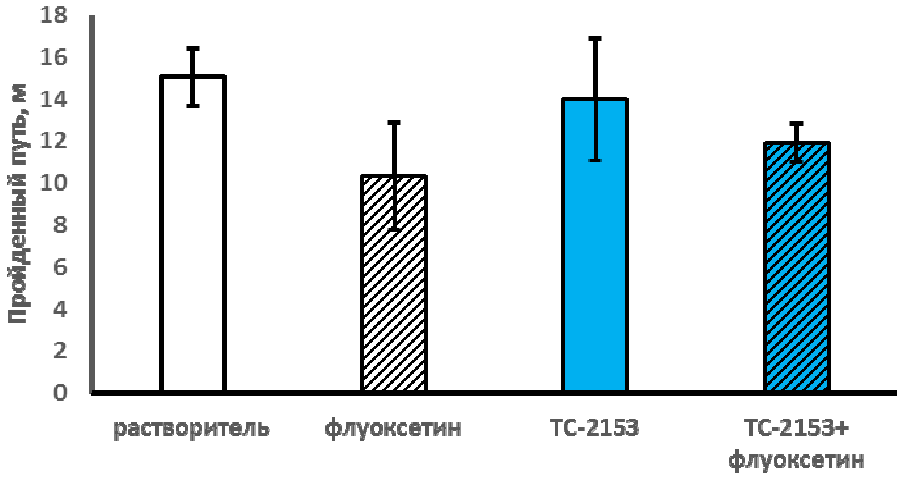


Рисунок 8 - Влияние острого введения ТС-2153 и флуокситина на пройденный путь.

Не обнаружено влияние флуоксетина (5-HT $F_{1,20} < 1$, 5-HIAA $F_{1,20} = 2.95$, $p>0.05$), ТС-2153 (5-HT $F_{1,20} = 1.91$, $p>0.05$, 5-HIAA $F_{1,20} = 2.64$, $p>0.05$) или их взаимодействия (5-HT $F_{1,20} < 1$, $p>0.05$, 5-HIAA $F_{1,20} < 1$) на концентрации 5-HT и 5-HIAA в мозге рыбок (Рисунки 9-10).

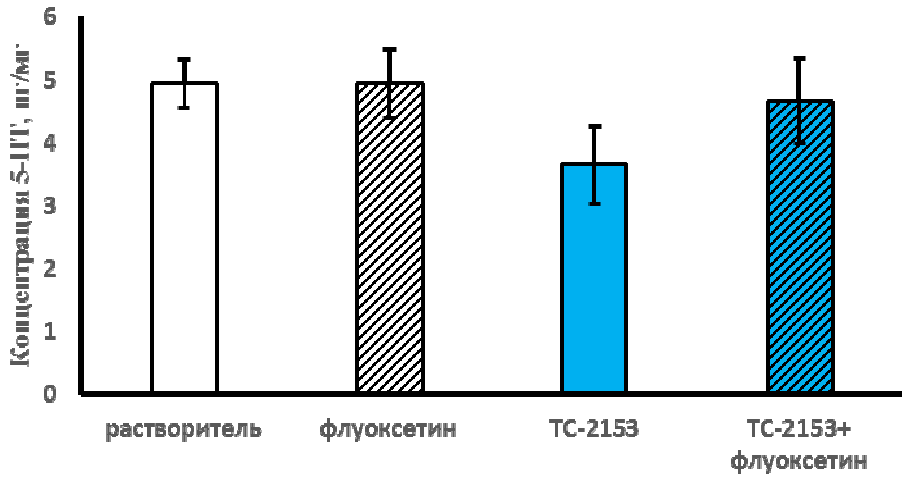


Рисунок 9 - Влияние острого введения TC-2153 и флуокситина на концентрацию 5-HT в головном мозге *D. rerio.*

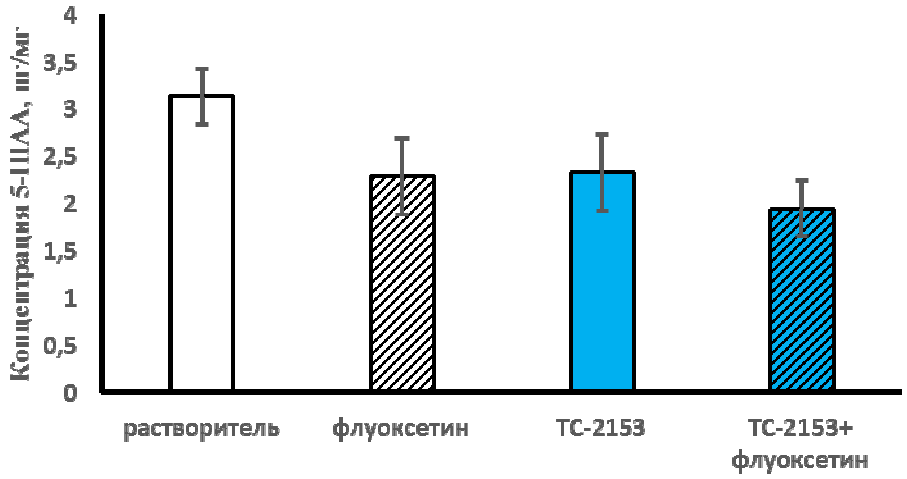


Рисунок 10 - Влияние острого введения TC-2153 и флуокситина на концентрацию 5-HIAA в головном мозге *D. rerio.*

3.2. Влияние хронического введения TC-2153 и флуокситина на поведение, концентрации 5-HT и 5-HIAA в головном мозге *D. rerio*

Выявлено влияние хронического введения флуоксетина ($F_{1,28} = 98.7$, $p<0.00001$), TC-2153 ($F_{1,28} = 4.4$, $p<0.05$), и их взаимодействия ($F_{1,28} = 1.49$. $p>0.05$) на время, проведенное в нижней половине резервуара. Рыбки, которым вводили флуоксетин ($p<0.00001$), TC-2153 ($p<0.05$) или оба соединения

(p<0.00001) существенно меньше времени проводили в нижней половине резервуара по сравнению с контролем (Рисунок 11).

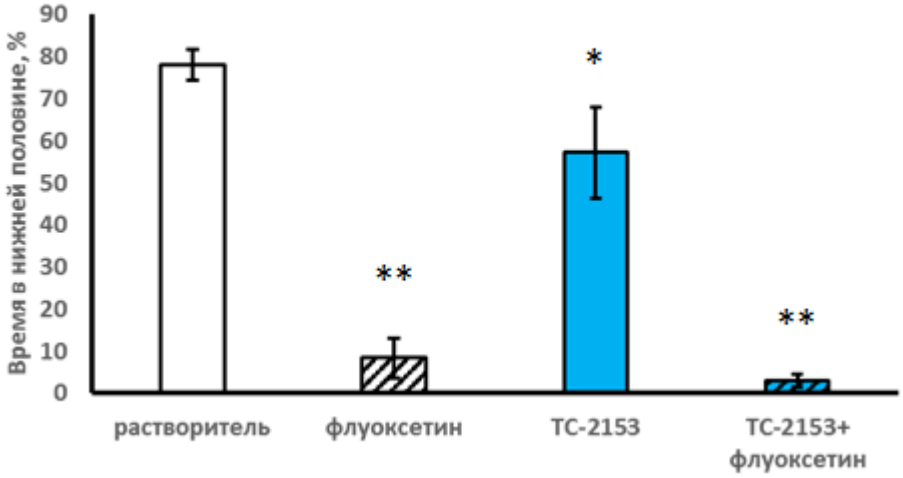


Рисунок 11 - Влияние хронического введения ТС-2153 и флуокситина на время в нижней половине резервуара.

Примечание: *p<0.05, **p<0.00001 по сравнению с растворителем.

Обнаружено влияние флуоксетина ($F_{1,28} = 40.7$, $p<0.00001$), но не ТС-2153 ($F_{1,28} = 3.0$, $p>0.05$) или их взаимодействия ($F_{1,20} < 1$) на исследованную площадь. Хроническое содержание в растворе флуоксетина ($p<0.0001$) или смеси флуоксетина с ТС-2153 ($p<0.00004$) резко уменьшает размер исследованной части резервуара (Рисунок 12).

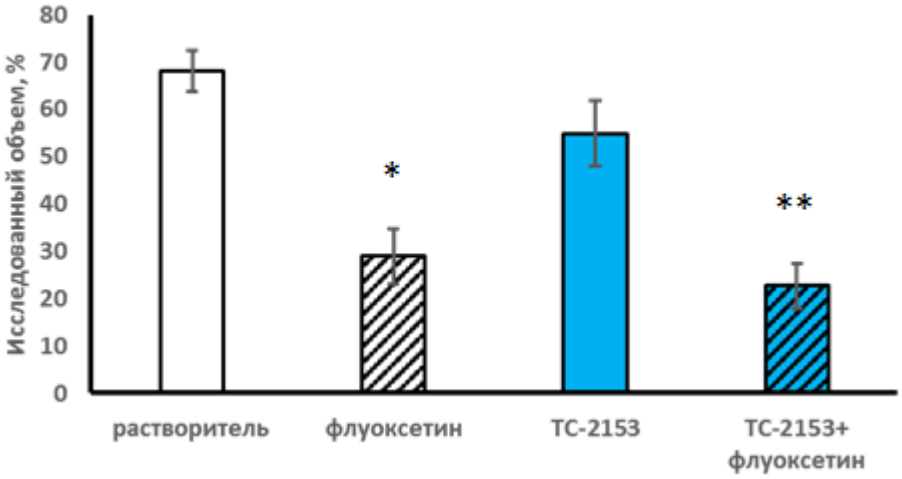


Рисунок 12 - Влияние хронического введения ТС-2153 и флуокситина на величину исследованной площади.

Примечание: *p<0.0001, **p<0.00004 по сравнению с растворителем.

Выявлено влияние ТС-2153 ($F_{1,28}$ = 5.2, p<0.05), но не флуоксетина ($F_{1,28}$ = 1.,5, p>0.05) или взаимодействия ($F_{1,28}$ = 1.7, p>0.05) на величину пройденного пути. Хроническое содержание в растворе флуоксетина уменьшало величину пройденного пути, но не достоверно (p>0.05), тогда как ТС-2153 (p<0.05) или смеси флуоксетина с ТС-2153 (p<0.05) вызывали достоверное снижение двигательной активности (Рисунок 13).

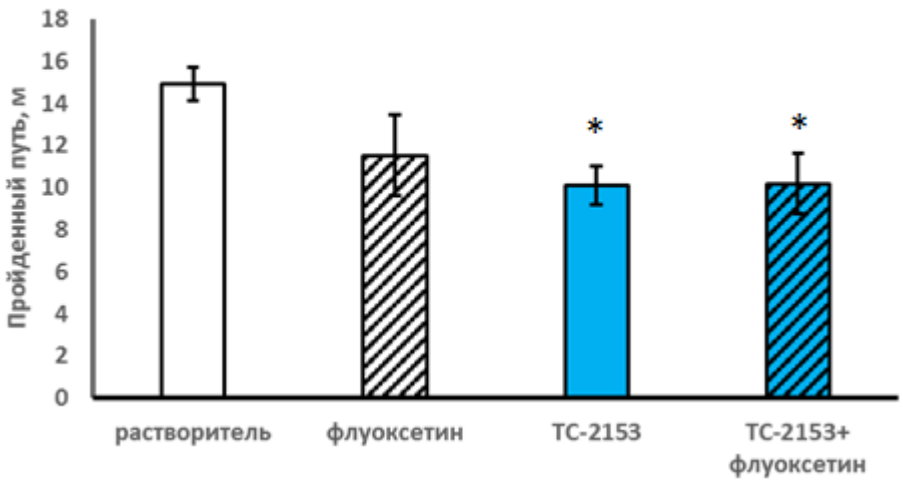


Рисунок 13 - Влияние хронического введения ТС-2153 и флуокситина на пройденный путь.
Примечание: *p<0.05 по сравнению с растворителем.

Обнаружено влияние флуоксетина ($F_{1,18}$ = 18,7, p<0.001), но не ТС-2153 ($F_{1,18}$< 1) или их взаимодействия ($F_{1,18}$< 1) на концентрации 5-НТ в мозге рыбок. Хроническое содержание рыбок в растворе флуоксетина (p<0.001) или в смеси флуоксетина с ТС-2153 (p<0.001) резко снижало уровень биогенного амина в мозге (Рисунок 14).

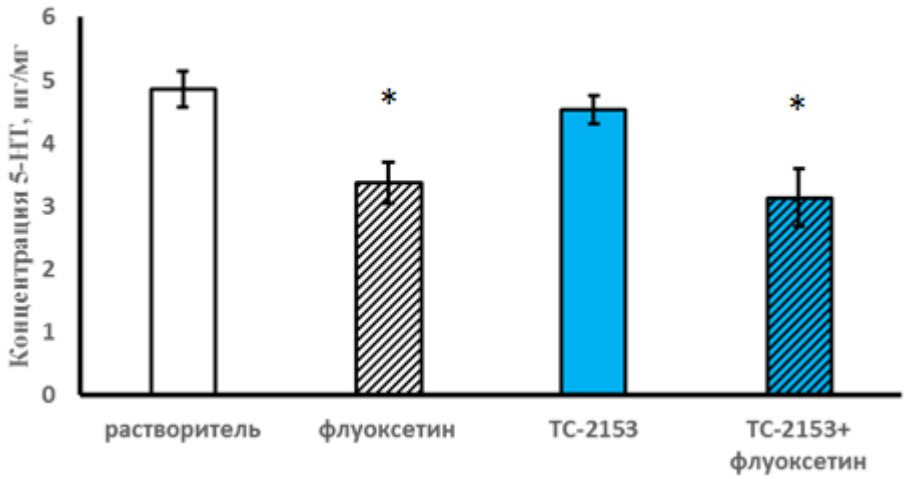


Рисунок 14 - Влияние хронического введения TC-2153 и флуокситина на концентрацию 5-HT в головном мозге D. Rerio.

Примечание: *p<0.001 по сравнению с растворителем.

В то же время хроническое введение флуоксетина ($F_{1,18} < 1$), TC-2153 ($F_{1,18} < 1$) или смеси этих соединений ($F_{1,18} = 2.1$, $p > 0.05$) не влияло на уровень 5-HIAA в мозге рыбок (Рисунок 15).

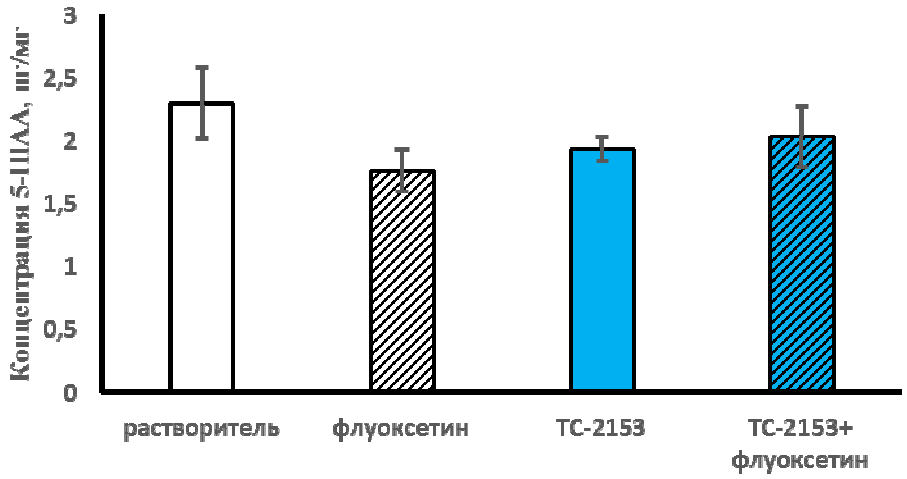


Рисунок 15 - Влияние хронического введения TC-2153 и флуокситина на концентрацию 5-HIAA в головном мозге *D. rerio.*

ОБСУЖДЕНИЕ

У лабораторных грызунов, мышей и крыс, антидепрессантную активность соединений оценивают, главным образом, по их способности уменьшать время неподвижности в тесте «принудительное плавание» Этот тест является специфическим для антидепрессантов, поскольку известные анксиолитики не влияют на время неподвижности [Cryan, Mombereau, 2004]. У рыбок не описано подобного селективного теста на антидепрессантную активность. Время пребывание у дна в тесте новый резервуар рассматривается как показатель анксиолитической активности, поскольку демонстрация хищника или ферромоны страха усиливают, а анксиолитики, напротив, уменьшают время пребывания у дна [Stewart et al., 2012]. В то же время классический антидепрессант, флуоксетин при хроническом [Egan et al., 2009; Stewart et al., 2011], повторном [Singer et al., 2016] или остром [Maximino et al., 2013] воздействии также увеличивает пребывание рыбок в верхней половине резервуара. Поэтому, этот показатель, по-видимому, можно применять для оценки как анксиолитической, так и антидепрессантной активностей.

Если при хроническом воздействии флуоксетин увеличивает время в верхней половине резервуара в концентрации 0.1 мг/л [Egan et al., 2009; Stewart et al., 2011], то для достижения подобного эффекта при остром введении необходимо значительно увеличить дозу флуоксетина. Было показано, что однократное в/б введение 5 мг/кг [Maximino et al., 2013] или трехкратное помещение на 3 мин в раствор 10 мг/л [Singer et al., 2016] флуоксетина существенно снижает пребывание *D. rerio* у дна в тесте НР.

В данной работе мы впервые показали, что увеличение времени нахождения в верхней половине резервуара (равносильно его уменьшению в нижней половине) можно получить при значительно более низкой концентрации антидепрессанта, а именно при содержании рыбок в течение 3 часов в растворе 0.125 мг/л флуоксетина. При этом мы не наблюдали, какого-либо негативного побочного эффекта антидепрессанта на исследовательскую

(величина исследованной площади) двигательную (пройденный путь) активности.

В то же время экспозиция рыбок в течение 3 часов в растворе 0.125 мг/л ТС-2153, по-видимому, не достаточна для изменения их поведения в тесте НР.

Острое введение малых доз (0.125 мг/л) исследуемых соединений или их смеси не повлияло на содержание 5-НТ и его метаболита 5-HIAA в головном мозге рыбок. Это хорошо согласуется с отсутствием эффекта острого введения значительно большей дозы этих соединений на уровень биогенных аминов и их метаболитов в большинстве структур мозга мышей, за исключением гипоталамуса [Kulikova et al., 2015].

Содержание рыбок в течение 14 дней в растворе флуоксетина (0.125 мг/л) значительно снижало время в нижней и увеличивало время в верхней половине резервуара. Этот анксиолитический / антидепрессантнгый эффект хорошо согласуется с результатами других авторов [Egan et al., 2009; Stewart et al., 2011]. Длительное воздействие флуоксетина оказывает негативное действие, а именно снижает исследовательскую активность и, хотя и недостоверно, двигательную активность. Рыбки не исследуют весь объем резервуара, а пребывают у его поверхности.

При этом, у рыб, длительное время содержащихся в растворе флуоксетина, резко снижен уровень 5-НТ. Это наблюдается как у рыб с хроническим введением флуоксетина, так и с хроническим введением смеси флуоксетина и ТС-2153. Хотя этот результат получен на рыбках впервые, он ожидаем. Известно, что хроническое введение флуоксетина снижает уровень 5-НТ в головном мозге мышей [Siesser et al., 2013]. Механизм этого снижения очевиден. Длительная блокада транспортера серотонина флуоксетином приводит к истощению тканевого пула медиатора. При этом активности триптофангидроксилазы 2 недостаточно, чтобы восполнить убыль 5-НТ.

Самым значимым и оригинальным результатом работы является то, что экспозиция рыбок в 14 дней в растворе 0.125 мг/л ТС-2153 также как и флуоксетина увеличивает время пребывания в верхней половине резервуара, но

уменьшает двигательную активность. Однако в отличие от флуоксетина TC-2153 не влиял на исследовательскую активность. Рыбки обследовали весь объем резервуара. Более того, в противоположность флуоксетину, хроническое введение TC-2153 не влияло на уровень и метаболизм 5-HT в головном мозге.

Важно отметить, что не выявлено взаимодействия TC-2153 с флуоксетином ни на уровне поведения, ни на уровне 5-HT системы. В работе было показано, что TC-2153 и флуоксетин при совместном воздействии не взаимодействуют, а их эффекты складываются. Этот факт свидетельствует о том, что антидепрессантный / анксиолитический эффект этих соединений в тесте НР осуществляется через разные механизмы. Известно, что эффект флуоксетина опосредуется через увеличение уровня 5-HT в синаптической щели, стимуляции 5-HT рецепторов, сопряженных с Gs белком, активацию аденилатциклазы, увеличение уровня цАМФ и активацию цАМФ-зависимой протеинкиназы А (ПКА) [Duman, Voletti, 2012]. Известно, что ПКА ингибирует PTPN5 и тем самым усиливать активность транскрипционных факторов [Kulikova et al., в печати]. В то же время, TC-2153 ингибирует STEP [Xu et al., 2014] и тоже активирует эти транскрипционные факторы.

В заключении можно сделать вывод, что механизмы действия флуоксетина и TC-2153 на поведения рыб различны: анксиолитическое действие флуоксетина опосредуется через 5-HT систему, тогда как анксиолитический эффект TC-2153 не связан с изменением уровня моноаминов в мозге. Более того, большинство недостатков существующих антидепрессантов, таких как задержка их терапевтического эффекта, устойчивость и негативные побочные эффекты также обусловлены их воздействием на 5-HT систему. Поэтому, TC-2153, который способен оказывать анксиолитическое / антидепрессантное действие без нарушения функции 5-HT системы, несомненно, имеет значительное преимущество по сравнению с классическими антидепрессантами.

Мы показали, что *D. rerio* могут успешно использоваться для изучения механизма действия TC-2153 и роли STEP в механизмах патологий. Это

позволит значительно облегчить и удешевить преклиническое исследование данного соединения, что имеет весомый экономический выход.

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние острого и хронического введения ТС-2153 и флуокситина на поведение рыб *D. rerio* в тесте НР. Показано, что острое введение флуоксетина увеличивает время нахождения в верхней половине резервуара, не влияя при этом на величину исследованной площади и пройденный путь. Показано, что хроническое введение ТС-2153 и флуокситина увеличивает время нахождения в верхней половине резервуара, однако длительное воздействие флуоксетина снижает, а ТС-2153 не влияет исследовательскую активность.

2. Исследовано влияние острого и хронического введения ТС-2153 и флуокситина на уровень 5-НТ, 5-HIAA в мозге головном *D. rerio*. Показано, что острое введение ТС-2153 и флуокситина не влияет на содержание 5-НТ и его метаболита 5-HIAA в головном мозге рыбок. Также показано, что хроническое введение флуоксетина резко снижает уровень 5-НТ, в то время хроническое введение ТС-2153 не влияло на уровень и метаболизм 5-НТ в головном мозге.

Кроме всего прочего показано, что антидепрессантный / анксиолитический эффект ТС-2153 и флуокситина в тесте НР осуществляется через разные механизмы, т.к. не выявлено взаимодействия ТС-2153 с флуоксетином ни на уровне поведения, ни на уровне 5-НТ системы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Базовкина Д. В., Куликов А. В., Кондаурова Е. М., Попова Н. К. Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей // Генетика. – 2005. – №41. – С. 1222–1228.

2. Куликов А. В., Тихонова М. А., Куликова Е. А., Хоменко Т. М., Корчагина Д. В., Волчо К. П., Салахутдинов Н. Ф., Попова Н. К. Влияние нового потенциального 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 // Мол Биол. – 2011. – №45. – С. 282–288.

3. Куликова Е. А., Тихонова М. А., Волчо К. П., Хоменко Т. М., Салахутдинов Н. Ф., Куликов А. В., Попова Н. К. Сравнение поведенческих эффектов флуоксетина, имипрамина и нового психотропного препарата ТС–2153 у мышей, различающихся по наследственной предрасположенности к каталепсии // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2015. – №65. – С. 105–112.

4. Подкорытов В. С., Чайка Ю. Ю. Депрессия и резистентность // Журнал психиатрии и медицинской психологии. – 2002. – №1. – С. 118–124.

5. Попова Н. К., Понимаскин Е. Г., Науменко В. С. Взаимодействие 5–HT1A– и 5–HT7–рецепторов: роль в авторегуляции серотониновой системы мозга и в механизме действия антидепрессантов // Росс. Физиол. Журнал им И.М. Сеченова. – 2015. – №101. – С. 1270–1278.

6. Решетников Ю. С., Котляр А. Н., Расс Т. С., Шатуновский М. И. Пятиязычный словарь названий животных. Рыбы. Латинский, русский, английский, немецкий, французский. / под общей редакцией акад. В. Е. Соколова. – М.: Рус. яз., – 1989. – С. 137.

7. Тихонова М. А., Лебедева В. В., Куликов А.В., Базовкина Д. В, Попова Н. К. Эффект имипрамина на поведение и 5–HT1A–серотониновые

рецепторы мозга у мышей с генетической предрасположенностью к реакции замирания // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2006. – №141. – С. 53–55.

8. Тихонова М. А., Альперина Е. Л., Толстикова Т. Г., Базовкина Д. В., Ди В. Ю., Идова Г. В., Куликов А. В., Попова Н. К. Влияние хронического введения флуоксетина на каталепсию и иммунный ответ мышей с генетической предрасположенностью к реакции замирания: роль серотониновых рецепторов 1А и 2А типов и генов tph2 и SERT // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2009a. – №59. – С. 237–244.

9. Тихонова М. А., Куликов А. В., Науменко В. С., Морозова М. В., Базовкина Д. В., Попова Н. К. Внутримозговое введение нейротрофического фактора BDNF снижает выраженность каталептического замирания у мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2009b. – №147. – С. 649–652.

10. Aoki I., Wu Y., Silva A., Lynch R., Koretsky A. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese–enhanced MRI // Neuroimage. – 2004. – N3. – P. 1046–1059.

11. Artigas F. Developments in the field of antidepressants, where do we go now? // Eur. Neuropsychopharmacol. – 2015. – N25. – P. 657–670.

12. Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects // Pharmacol, Ther. – 2013. – N137. – P. 119–31.

13. Baiamonte M., Parker M., Vinson G., Brennan C. Sustained Effects of Developmental Exposure to Ethanol on Zebrafish Anxiety–Like Behaviour // PLoS One. – 2016. (в печати).

14. Belzung C., Willner P., Philippot P. Depression: from psychopathology to pathophysiology // Curr. Opin. Neurobiol. – 2015. – N30. – P. 24–30.

15. Blier P., El Mansari M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2013. – N368, 20120536.

16. Blier P., de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression // Trends Pharmacol Sci. – 1994. – N15. – P. 220–226.

17. Cachat J. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish // Behav. Brain

Res. – 2010. – N208. – P. 371–376.

18. Caldarone B., Zachariou V., King S. Rodent models of treatment–resistant depression. // Eur J Pharmacol. – 2015. – N753. – P. 51–65.

19. Canal C., Morgan D. Head–twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5–dimethoxy–4–iodoamphetamine: a comprehensive history, a re–evaluation of mechanisms, and its utility as a model // Drug Test Anal. – 2012. – N4. – P. 556–576.

20. Carr G., Lucki I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies // Psychopharmacology (Berl). – 2011. – N213. – P. 265–287.

21. Cipriani A., Zhou X., Del Giovane C. et al. Comparative efficacy and tolerability of antidepressants for major depressive disorder in children and adolescents: anetwork meta–analysis // – Lancet. – 2016. – N388. – P. 881–890.

22. Cryan J., Kelly P., Chaperon F., Gentsch C., Mombereau C., Lingenhoehl K., Froestl W., Bettler B., Kaupmann K., Spooren W. Behavioral characterization of the novel GABAB receptor–positive modulator GS39783 (N,N'–dicyclopentyl–2–methylsulfanyl–5–nitro–pyrimidine–4,6–diamine): anxiolytic–like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines // J Pharmacol Exp Ther. – 2004. – N310(3). – P. 952–963.

23. Duman R., Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists // Phil Trans R Soc B. – 2012. – N367. – P. 2475–2484.

24. Duman R., Voleti B. Signaling pathways underlying the pathopysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid–acting agents // Trends Neurosci. – 2012. – N35. – P. 47–56.

25. Egan R., Bergner C., Hart P., Cachat J., Canavello P., Elegante M., Elkhayat S., Bartels B., Tien A., Tien D., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z., Kalueff A. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish // Behav Brain Res. – 2009. – N205(1). – P. 38–44.

26. Fournier J., DeRubeis R., Hollon S. Antidepressant Drug Effects and Depression Severity: A Patient–Level Meta–analysis // The Journal of American Medical Association. – 2010. – N1. – P. 47–53.

27. Fulcher N., Tran S., Shams S., Chatterjee D., Gerlai R. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression // Zebrafish. – 2017. – N14. – P.23–24.

28. Gaspar P., Lillesaar C. Probing the diversity of serotonin neurons. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2012. – N367. – P. 2382–2394.

29. Goebel–Goody S., Baum M., Paspalas C., Fernandez S., Carty N., Kurup P., Lombroso P. Therapeutic implications for striatal–enriched protein tyrosinephosphatase (STEP) in neuropsychiatric disorders // Pharmacol Rev. – 2012. – N64. – P. 65–87.

30. Haase J., Brown E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression - a central role for the serotonin transporter? // Pharmacol Ther. – 2015. – N147. – P. 1–11.

31. Halberstadt A. Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens // Behav Brain Res. – 2015. – N277. – P. 99–120.

32. Hale M., Raison C., Lowry C. Integrative physiology of depression and antidepressant drug action: implications for serotonergic mechanisms of action and novel therapeutic strategies for treatment of depression // Pharmacol Ther. – 2013. – N1377 – P. 108–118.

33. Hamon M., Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2013. – N45. – P. 54–63.

34. Hanks J., González–Maeso J. Animal models of serotonergic psychedelics // ACS Chem Neurosci. – 2013. – N4. – P. 33–42.

35. Harrison P. The current and potential impact of genetics and genomics on neuropsychopharmacology // Eur Neuropsychopharmacol. – 2015. – N25. – P. 671–681.

36. Fabbri C., Porcelli S., Seretti A. From pharmacogenetics to pharmacogenomics: The way towards the personalization of antidepressant treatment // Psychiatry. – 2014. – N59. – P. 62–75.

37. Kalichak F., Idalencio R., Rosa J., de Oliveira T., Koakoski G., Gusso D., de Abreu M., Giacomini A., Barcellos H., Fagundes M., Piato A., Barcellos L. Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish // Environ Toxicol Pharmacol. – 2016. – N41. – P. 89–94.

38. Kamceva M., Benedict J., Nairn A.C., Lombroso P.J. Role of Striatal–Enriched Tyrosine Phosphatase in Neuronal Function // Neural Plast. – 2016. – 8136925.

39. Kalueff A., Stewart A., Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders // Trends Pharmacol Sci. – 2014. – N2. – P. 63–75.

40. Kalueff A., Wheaton M., Murphy D. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression // Behav Brain Res. – 2007. – N179. – P. 1–18.

41. Khomenko T. M., Tolstikova T. G., Bolkunov A. V., Dolgikh M. P., Pavlova A. V., Korchagina D. V., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. 8–(Trifluoromethyl)–1,2,3,4,5–benzopentathiepin–6–amine: novel aminobenzopentathiepine having in vivo anticonvulsant and anxiolytic activities // Lett Drug Design Discovery. – 2009. – N6. – P. 464–467.

42. Kessler R., Bromet E. The epidemiology of depression across cultures // Annu Rev Public Health. – 2013. – N34. – P. 119–138.

43. Köhler S., Cierpinsky K., Kronenberg, G., Adli M. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants // J Psychopharmacol.– 2016. – N30. – P. 13–22.

44. Kondaurova E. M., Bazovkina D. V., Kulikov A. V., Popova N. K. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked tothe 5–HT serotonin receptor gene in mice // Genes Brain Behav. – 2006. – N5. – P. 596–601.

45. Kulikov A. V., Osipova D. V., Naumenko V. S., Terenina E., Mormede P., Popova N. K. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism // Behav Brain Res. –2012a. – N233. – P. 113–119.

46. Kulikov A. V., Tikhonova M. A., Kulikova E. A., Volcho K. P., Khomenko T. M., Salakhutdinov N. F., Popova N. K. 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 thehippocampus in mice // Psychopharmacology (Berl). – 2012b. – N221. – P. 469–478.

47. Kulikov A. V., Tikhonova M. A., Kulikova E. A., Volcho K. P., Khomenko T. M., Salakhutdinov N. F., Popova N. K. Antidepressant activity of 8–(trifluoromethyl)–1,2,3,4,5–benzopentathiepin– 6–amine hydrochloride (TC–2153): Comparison with classical antidepressants // Lett Drug Design Discovery. – 2014. – N11. – P. 169–173

48. Kulikova E. A.,Bazhenova E. Y., Popova N. K., Khomenko T. M., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F., Kulikov A. V. Effect of Acute Administration of 8–(Trifluoromethyl)–1,2,3,4,5–benzopentathiepin–6–amine Hydrochloride (TC–2153) on Biogenic Amines Metabolism in Mouse Brain // Lett Drug Design Discovery. – 2015. – N12. –P. 833 – 836.

49. Laje G., McMahon F. Genome–wide association studies of antidepressant outcome: a brief review // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2011. – N35.– P. 1553–1557.

50. Lapin I., Oxenkrug G. Intensification of the central serotoninergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect // Lancet. – 1969. – N1. – P. 132–136.

51. Lepine J, Briley M. The increasing burden of depression // Neuropsychiatr Dis Treat. – 2011. – N7. – P. 3–7.

52. Li L., Bonneton F., Tohme M., Bernard L., Chen X., Laudet V. In Vivo Screening Using Transgenic Zebrafish Embryos Reveals New Effects of HDAC

Inhibitors Trichostatin A and Valproic Acid on Organogenesis // PLoS One. – 2016. (в печати).

53. Lombroso P., Murdoch G., Lerner M. Molecular characterization of aprotein–tyrosine–phosphatase enriched in striatum // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1991. – N88. – P. 7242–7246.

54. Lombroso P., Naegele J., Sharma E., Lerner M. A protein tyrosine phosphataseexpressed within dopaminoceptive neurons of the basal ganglia and relatedstructures // J Neurosci. – 1993. – N13. – P. 3064–3074.

55. Lucas G., Rymar V., Du J., Mnie–Filali O., Bisgaard C., Manta S. Serotonin(4) (5–HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action // Neuron. – 2007. – N55. – P. 712–725.

56. Maes M., Leonard B., Myint A., Kubera M., Verkerk R. The new '5–HT' hypothesis of depression: cell–mediated immune activation induces indoleamine 2,3–dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2011. – N35. – P. 702–721.

57. Mahar I., Bambico F., Mechawar N., Nobrega J. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects // Neurosci Biobehav Rev. – 2014. – N38. – P. 173–192.

58. Maximino C., Puty B., Benzecry R., Araújo J., Lima M., de Jesus Oliveira Batista E., Renata de Matos Oliveira K., Crespo–Lopez M., Herculano A.. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para–chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models // Neuropharmacology. – 2013. – N71. – P. 83–97.

59. Mestre T., Zurowski M., Fox S. 5–Hydroxytryptamine 2A receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders // Expert Opin Investig Drugs. – 2013. – N22, P. 411–421.

60. Miller B., Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety // Curr Opin Neurobiol. – 2015. – N30. – P. 51–58.

61. Mosienko V., Beis D., Pasqualetti M., Waider J., Matthes S., Qadri F., Bader M., Alenina N. Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis // Behav Brain Res. – 2015. – N277. – P. 78–88.

62. Naumenko V. S., Kondaurova E. M., Bazovkina D. V., Tsybko A. S., Tikhonova M. A., Kulikov A. V., Popova N. K. Effect of brain–derived neurotrophic factor on behavior and keymembers of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioraldisorders mouse strains // Neuroscience. – 2012. – N214. – P. 59–67.

63. Naumenko V. S., Popova N. K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponimaskin E. G. Interplay between serotonin 5–HT1A and 5–HT7 receptors in depressive disorders // CNS Neurosci Therap. – 2014. – N20. – P. 582–590.

64. Nguyen M., Stewart A., Kalueff A. Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish // Progress in Neuro–Psychopharmacology & Biological Psychiatry. – 2014. – N55. – P. 26–39.

65. Noordam R., Avery C., Visse L., Stricker B. Identifying genetic lociaffecting antidepressant drug response in depression using drug–gene interaction models // Pharmacogenomics. – 2016. – N17. – P. 1029–1040.

66. O'Leary O., Dinan T., Cryan J. Faster, better, stronger: towards new antidepressant therapeutic strategies // Eur J Pharmacol. – 2015. – N753. P. 32–50.

67. Olivier B. Serotonin: a never–ending story // Eur J Pharmacol. – 2015. – N753. P. 2–18.

68. Pei S, Liu L, Zhong Z, Wang H, Lin S, Shang J. Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine // Sci Rep. – 2016 (в печати).

69. Porcelli S., Drago A., Fabbri C., Gibiino S., Calati R., Serretti A. Pharmacogenetics of antidepressant response // J Psychiatry Neurosci. – 2011a. – N36. – P. 87–113.

70. Porcelli S., Fabbri C., Drago A., Gibiino S., De Ronchi D., Serretti A., 2011b. Genetics and antidepressant: Where we are // Clinical Neuropsychiatry. – 2011b. – N8. – P. 99–150.

71. Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felšöci M. Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications // Physiol Res. – 2011. – N60. – P. 15–25.

72. Saavedra A., Puigdellívol M., Tyebji S., Kurup P. Xu J., Ginés S., Alberch J., Lombroso P.J., Pérez–Navarro E. BDNF Induces Striatal–Enriched Protein Tyrosine Phosphatase 61 Degradation Through the Proteasome // Mol Neurobiol. – 2016. – N53. – P. 4261–4273.

73. Shih J., Wu J., Chen K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes // J. Neural Transm. – 2011. – N118. – P. 979 –986.

74. Siesser W., Sachs B., Ramsey A., Sotnikova T., Beaulieu J., Zhang X., Caron M., Gainetdinov R. Chronic SSRI treatment exacerbates serotonin deficiency in humanized Tph2 mutant mice // ACS Chem Neurosci. – 2013. – N4. – P. 84–88.

75. Singer M., Oreschak K., Rhinehart Z., Robison B. Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish // PeerJ. – 2016. – N4. – e2352.

76. Spies M., Knudsen G., Lanzenberger R., Kasper S. The serotonin transporter in psychiatric disorders: insights from PET imaging // Lancet Psychiatry. – 2015. – N2. – P. 743–755.

77. Stewart A. et al. Zebrafish models to study drug abuse–related phenotypes // Rev. Neurosci. – 2011. – N 22. – P. 95–105.

78. Stewart A., Kalueff A. The behavioral effects of acute Delta–tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish // Brain Res. – 2014. – N1543. – P.109–19.

79. Stewart A., Kalueff A.. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research // Curr Neuropharmacol. – 2012. – N10(3). P. 263–271.

80. Tikhonova M. A., Kulikov A. V., Bazovkina D. V., Morozova M. V., Naumenko V. S., Popova N. K. Antidepressant–Like Effects of central BDNF

administration in mice of antidepressant sensitive catalepsy (ASC) strain // Chin J Physiol. – 2012. – N55. – N284–293.

81. Tolstikova T. G., Pavlova A. V., Morozova E. A., Khomenko T. M., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F. The analgesic activity of 8–(trifluoromethyl)–1,2,3,4,5–benzopentathiepine–6–amine and its hydrochloride // Lett Drug Design Discovery. – 2012. – N9. P. 513–516.

82. Uher R., Perroud N., Ng M., Hauser J., Henigsberg N., Maier W., Mors O., Placentino, A., Rietschel M., Souery D., Zagar T., Czerski P., Jerman B., Larsen E., Schulze T., Zobel A., Cohen–Woods S., Pirlo K., Butler A., Muglia P., Barnes M., Lathrop M., Farmer A., Breen G., Aitchison K., Craig I., Lewis C., McGuffin P. Genome–wide pharmacogenetics of antidepressant response in the GENDEP project // Am J Psychiatry. – 2010. – N167. – P. 555–564.

83. Walker F. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti–inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? // Neuropharmacology. – 2013. – N67. – P. 304–317.

84. Walther D., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // Biochem Pharmacol. – 2003. – N66. – P. 1673–1680.

85. Willner P., Scheel–Krüger J., Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action // Neurosci Biobehav Rev. – 2013. – N37. – P. 2331–1371.

86. Willner P. Animal models of depression: an overview // Pharmacol Ther. – 1990. – N45. – P. 425–455.

87. Xu J., Kurup P., Azkona G., Baguley T., Saavedra A., Nairn A., Ellman J., Pérez–Navarro E., Lombroso P. Down–regulation of BDNF in cell and animal models increases striatal–enriched protein tyrosine phosphatase 61 (STEP61) levels. // J Neurochem. – 2016a. – N136. – P. 285–294.

88. Xu J., Kurup P., Baguley T.D., Foscue E., Ellman J., Nairn A., Lombroso P. Inhibition of the tyrosine phosphatase STEP61 restores BDNF

expression and reverses motor and cognitive deficits in phencyclidine–treated mice // Cell Mol Life Sci. – 2016b. – N73. – P. 1503–1514.

89. Xu J., Chatterjee M., Baguley T., Brouillette J., Kurup P., Ghosh D., Kanyo J., Zhang Y., Seyb K., Ononenyi C., Foscue E., Anderson G., Gresack J., Cuny G., Glicksman M., Greengard P., Lam T., Tautz L., Nairn A., Ellman J., Lombroso P. Inhibitor of the tyrosine phosphatase STEP reverses cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease // PLoS Biol. – 2014. – N12. – e1001923.

90. Zimmermann F., Gaspary K., Leite C., De Paula Cognato G., Bonan C. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in *zebrafish* (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis // Neurotoxicol Teratol. – 2015. – N52 – P. 36–41.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Пример протокола проведения эксперимента по исследованию влияния фармакологических препаратов на поведение рыб

Эксперимент №12 – исследование острого влияния препарата ТС-2153 в дозировке 0,125 мг/кг на поведение рыб *D. rerio.*

Дата: 22.07.2016

3 группы по 8 животных:

1. H20
2. Растворитель (ДМСО + ТВИН)
3. ТС-2153 (концентрация 0,125мг/кг)

Итого – 18 животных.

Предварительная подготовка:

А) Подготовить емкости с раствором вышеописанных веществ по 500 мл. (18 шт).

Б) Подготовить 36 литров чистой воды для проведения исследования OpenField.

В) Подготовить термос с жидким азотом.

Г) Подготовить штатив с пробирками для забора головного мозга (24 шт).

Д) Подготовить инструменты для забора головного мозга.

Е) Подготовить лед для проведения эвтаназии.

Проведение эксперимента

А) Помещаем рыб с интервалом 15 минут в подготовленные растворы. Подписываем время помещения рыбы на каждом стаканчике и оставляем на 3 часа.

Б) Запускаем согласно очередности рассадки рыб на OpenField (вместе с теми 0,5 литра раствора, в котором они сидели). Время тестирования – 5 минут.

В) Во время тестирования подготавливаем 1 литр воды для следующей рыбки. Вода отстоянная, но не из аквариума.

Г) Воду меняем после каждой рыбы, независимо от раствора (чтобы не спровоцировать накопление гормона страха). Споласкиваем кювету.

Д) После тестирования рыб умерщвляем и забираем мозг для биохимических исследований. Мозг помещаем в пробирки и фиксируем в жидком азоте.

Нумерация контейнеров:

1,4,7,10,13,16 – Н20

2,5,8,11,14,17 – Растворитель (ДМСО + ТВИН)

3,6,9,12,15,18 – ТС-2153 (концентрация 0,125 мг/кг)

Временной лист:

Раствор	N п/п	Время посадки	Время на таймере	Помещение в кювету	Старт экс-та	Примечание
Н20	1					
Раст-ль	2					
ТС-0,25	3					
Н20	4					
Раст-ль	5					
ТС-0,25	6					
Н20	7					
Раст-ль	8					
ТС-0,25	9					
Н20	10					
Раст-ль	11					
ТС-0,25	12					
Н20	13					
Раст-ль	14					
ТС-0,25	15					
Н20	16					
Раст-ль	17					
ТС-0,25	18					

Exactus Like (/index.php)

(/index.php/ru/) (/index.php/en/)

Поиск заимствований в научных текстах[β]

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран... **Выбрать файл...**

Укажите год публикации: 2017

Выберите коллекции

- Все
- Рефераты
- Авторефераты
- Иностранные конференции
- PubMed
- Википедия
- Российские конференции
- Иностранные журналы
- Российские журналы
- Энциклопедии
- Англоязычная википедия

Анализировать

Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст (http://text.rucont.ru/like)

Год публикации: 2017.

Оценка оригинальности документа - 98.8%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 1.2%

Просмотр заимствований в документе

Время выполнения: 23 с.

Документы из базы

Источники заимствования	В списке литературы	Источники Заимствования
1. ВЛИЯНИЕ ПСИХОТРОПНОГО ПРЕПАРАТА ТС-2153 НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА МЫШЕЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К НЕЙРОПАТОЛОГИИ. (http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/179657) Авторы: Куликова Елизавета Александровна. Год публикации: 2014. Тип публикации: автореферат диссертации. http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/179657 (http://vak2.ed.gov.ru/idcUploadAutoref/renderFile/179657) Показать заимствования (3)	—	1.2%

Дополнительно

Значимые оригинальные фрагменты

Библиографические ссылки

Искать в Интернете

© 2015 2017 Институт системного анализа Российской академии наук (http://www.isa.ru/index.php?lang=ru)