

УДК 577.21; 577.25

УЧАСТИЕ 5-HT_{2A}-РЕЦЕПТОРОВ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ АУТОРЕГУЛЯЦИИ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА

© 2012 г. В. С. Науменко*, А. С. Цыбко, Д. В. Базовкина, Н. К. Попова

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 22.08.2011 г.

Принята к печати 19.09.2011 г.

Серотониновая (5-HT) система мозга вовлечена в механизмы тревожности, депрессии, наркотической зависимости и шизофрении. Серотониновые 5-HT_{2A}-рецепторы участвуют в регуляции вызванных стрессом психопатологий и импульсивного поведения. В работе исследована роль 5-HT_{2A}-рецепторов в ауторегуляции 5-HT системы мозга. Показано, что хроническая активация 5-HT_{2A}-рецепторов селективным агонистом DOI в течение 14 дней приводит к значительному снижению их функциональной активности, определяемой по числу опосредуемых этими рецепторами встряхиваний головы, у мышей линии AKR/J. Хроническое введение DOI не оказывает существенного влияния на экспрессию гена 5-HT_{2A}-рецептора в среднем мозге, гиппокампе и фронтальной коре. В то же время обнаружено, что в среднем мозге мышей, подвергавшихся хронической активации 5-HT_{2A}-рецепторов, существенно увеличивается экспрессия гена, кодирующего ключевой фермент биосинтеза 5-HT – триптофангидроксилазу 2 (ТПГ2). Эти изменения сопровождаются значительным увеличением активности фермента ТПГ2, уровня 5-HT и снижением экспрессии гена серотонинового транспортера (5-НТТ) в среднем мозге мышей опытной группы. Результаты указывают на существование взаимодействия типа “рецептор-ген” в 5-HT-системе мозга и на роль 5-HT_{2A}-рецепторов в ауторегуляции системы.

Ключевые слова: хроническое введение DOI, 5-HT_{2A}-рецептор, серотониновый транспортер, экспрессия гена триптофангидроксилазы 2, активность триптофангидроксилазы 2, уровни 5-HT и 5-ГИУК, мыши.

IMPLICATION OF 5-HT_{2A} RECEPTORS IN THE GENETIC MECHANISMS OF THE BRAIN 5-HT SYSTEM AUTOREGULATION, by V. S. Naumenko*, A. S. Tsybko, D. V. Bazovkina, N. K. Popova (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: naumenko2002@bionet.nsc.ru). Brain serotonin (5-HT) system has been implicated in pathophysiology of anxiety, depression, drug addiction, and schizophrenia. 5-HT_{2A} receptor is involved in the mechanisms of stress-induced psychopathology and impulsive behavior. Here, we investigated the role of 5-HT_{2A} receptor in the autoregulation of the brain 5-HT system. The chronic treatment with agonist of 5-HT_{2A} receptor DOI (1.0 mg/kg, i.p. /14 days) produced considerable decrease of 5-HT_{2A} receptor-mediated “head-twitches” in AKR/J mice indicating desensitization of 5-HT_{2A} receptors. Chronic DOI treatment failed to alter 5-HT_{2A} receptor gene expression in the midbrain, hippocampus and frontal cortex. At the same time, the increase in the expression of the gene encoding key enzyme of 5-HT synthesis, tryptophan hydroxylase 2 (TPH2), the increase in TPH2 activity and 5-HT levels and decreased expression of serotonin transporter (5-HTT) gene was found in the midbrain of DOI-treated mice. The results provide new evidence of receptor-gene cross-talk in the brain 5-HT system and the implication of 5-HT_{2A} receptor in the autoregulation of the brain 5-HT system.

Keywords: chronic DOI treatment, 5-HT_{2A} receptor, 5-HT transporter, tryptophan hydroxylase 2 genes expression, tryptophan hydroxylase 2 activity, 5-HT, 5-HIAA levels, mice.

Нейротрансмиттер серотонин (5-HT) вовлечен в регуляцию различных физиологических функций и видов поведения, в том числе сна [1],

терморегуляции [2], пищевого и питьевого поведения [3], каталепсии [4], агрессивного поведения [5] и половой мотивации [6]. Многофункци-

Принятые сокращения: 5-HT – серотонин; 5-HT_{2A}-рецептор – серотониновый рецептор подтипа 2A; 5-HT_{1A}-рецептор – серотониновый рецептор подтипа 1A; DOI ((±)-1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride) – 1-(2,5-диметокси-4-йодофенил)-2-аминопропан гидрохлорид; ДНВА (3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide) – 3,4-дигидроксибензиламингидробромид; rPolII (RNA polymerase II) – ДНК-зависимая РНК-полимераза 2; 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; ТПГ2 – триптофангидроксилаза 2; 5-НТТ – серотониновый транспортер; ОТ – обратная транскрипция; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

* Эл. почта: naumenko2002@bionet.nsc.ru

ональность 5-НТ связана с тем, что имеется большое число рецепторов, опосредующих его влияние на нейроны [7, 8]. Имеются доказательства взаимодействий между различными типами 5-НТ-рецепторов и роли этих взаимодействий в регуляции функции 5-НТ-системы мозга [9]. Из множества рецепторов, опосредующих действие 5-НТ на нейроны, основным кандидатом на роль ауторегулятора 5-НТ-системы мозга является 5-НТ_{1A}-рецептор, осуществляющий регуляцию секреции 5-НТ в синаптическую щель [7, 8]. Роль других 5-НТ-рецепторов в ауторегуляции 5-НТ-системы мозга остается неясной. Наше внимание было сконцентрировано на изучении 5-НТ_{2A}-рецепторов. Известно, что эти рецепторы участвуют в механизмах индуцированных стрессом психопатологий [10] и импульсивного поведения [11]. Имеются также данные о роли 5-НТ_{2A}-рецепторов в механизмах развития шизофрении [12] и болезни Альцгеймера [13]. Хроническое лечение атипичными антипсихотиками, такими как клозапин и ORG 5222, существенно снижает плотность 5-НТ_{2A}-рецепторов во фронтальной коре [14], а их антагонисты эффективны при лечении ряда психических заболеваний [10].

Несмотря на интенсивное изучение роли 5-НТ_{2A}-рецепторов в развитии нарушений поведения, роль этих рецепторов в ауторегуляции 5-НТ-системы мозга остается практически не изученной. Показано лишь, что хроническое введение агониста 5-НТ_{2A}-рецепторов 1-(2,5-диметокси-4-йодофенил)-2-аминопропан гидрохлорида (DOI) приводит к значительному падению их функциональной активности [15], которое сопровождается существенным снижением плотности 5-НТ_{2A}-рецепторов [16]. В то же время, данные о влиянии хронической активации этих рецепторов на экспрессию 5-НТ_{2A}-гена противоречивы. Разными авторами показано, что хроническое введение DOI либо не вызывает каких-либо изменений экспрессии 5-НТ_{2A}-гена [16], либо приводит к снижению его экспрессии [17]. Практически нет данных о том, как влияет хроническая активация 5-НТ_{2A}-рецепторов на метаболизм 5-НТ и на экспрессию генов, кодирующих ключевой фермент биосинтеза 5-НТ — триптофангидроксилазу 2 (ТПГ2), и 5-НТ-транспортер, осуществляющий обратный захват нейротрансмиттера из синаптической щели.

Для изучения роли 5-НТ_{2A}-рецепторов в контроле функции 5-НТ-системы мозга мы исследовали влияние хронического введения агониста 5-НТ_{2A}-рецепторов DOI, во-первых, на функциональную активность 5-НТ_{2A}-рецепторов и экспрессию 5-НТ_{2A}-гена; во-вторых, на экспрессию гена ТПГ2, активность фермента ТПГ2 и уровни 5-НТ и 5-ГИУК; в-третьих, на экспрессию гена 5-

НТТ, контролирующего обратный захват 5-НТ из синаптической щели.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Опыты проводили на взрослых (9–10 недель, вес около 25 г) самцах мышей инбредной линии AKR/J. Выбор линии обусловлен тем, что ранее нами обнаружена высокая функциональная активность 5-НТ_{2A}-рецепторов в мозге мышей этой линии [18]. Мышей содержали в стандартных лабораторных условиях при естественном освещении (16 ч свет и 8 ч темнота) со свободным доступом к пище и воде. Все опыты выполняли, следуя директивам National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23), 1996.

В течение 14 дней мышам вводили агонист 5-НТ_{2A}-рецептора — DOI (“Sigma”, США) [19]. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально в дозе 1 мг/кг (22 мыши в группе). Мыши контрольной группы получали инъекции физиологического раствора (22 мыши в группе). За два дня до опыта животных рассаживали в индивидуальные клетки для предотвращения групповых эффектов. Препарат вводили вплоть до декапитации животных.

Функциональную активность 5-НТ_{2A}-рецепторов определяли по числу опосредованных этими рецепторами встряхиваний головой, вызванных острым введением DOI [19–21]. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально мышам экспериментальной и контрольной групп в дозе 1 мг на кг веса. Число встряхиваний головой измеряли в течение 20 мин через 5 мин после введения препарата.

Через два дня после теста мышей декапитировали, на льду выделяли фронтальную кору, гиппокамп и область ядер шва среднего мозга. Ткани замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C.

Определение уровней 5-НТ и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК). Структуры мозга гомогенизировали в 200 мкл экстрагирующего буфера, содержащего 0.4 М перхлорной кислоты и 0.27 мМ Na₂EDTA, после чего центрифугировали 5 мин при 15000 g при +4°C. Отбирали супернатант и фильтровали его через стекловолоконный фильтр GF/B Whatman центрифугированием при 15000 g в течение 3 мин. Пробы хранили при –70°C до процедуры определения уровней 5-НТ и 5-ГИУК.

Уровни 5-НТ и 5-ГИУК измеряли при помощи ВЭЖХ (колонка Nucleosil C8, размер частиц 3 мкм, L × I.D. 100 мм × 4.6 мм, “Sigma-Aldrich”, США) с использованием электрохимического детектора (500 mV, Coulochem III, ESA, Inc., США), ячейки (BASInc, США) и насоса LC-20AD (“Shimadzu Corporation”, Япония). В качестве мобиль-

ной фазы использовали буфер (рН 4.5), содержащий (100 мМ) фосфата калия, 0.1 мМ Na_2EDTA , 1.4 мМ натриевой соли 1-октилсульфоновой кислоты (“Sigma”, США), 8 нг 3,4-дигидроксибензиламингидробромида (ДНВА) в качестве внутреннего стандарта и 4% метанола по объему. Скорость потока – 0.6 мл/мин.

Стандартные растворы ДНВА, 5-НТ и 5-ГИУК (по 26 нг каждого) в течение опыта анализировали повторно. Высоту пиков 5-НТ и 5-ГИУК оценивали при помощи программного обеспечения MutiChrom v.1.5 (“Ampersand Ltd”, Россия), нормировали относительно внутреннего стандарта и калибровали относительно соответствующих внешних стандартов, что позволило определить количество 5-НТ и 5-ГИУК в образце. Результаты нормировали на вес исследуемой структуры мозга (мкг на г ткани).

Для определения активности ТПГ2 структуры мозга гомогенизировали в 500 мкл 50 мМ буфера Трис-НСl (рН 7.6), центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g (+4°C). Аликвоту супернатанта (15 мкл) смешивали с 5 мкл 0.188 мМ (\pm)-6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптериндигидрохлорида (“Sigma”) и 5 мкл 2.5 мМ L-триптофана (“Реахим”, Россия) и инкубировали в течение 7 мин при 36°C. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 0.4 М HClO_4 , и хранили при 0°C до процедуры детекции при помощи ВЭЖХ. В предварительных опытах была выбрана оптимальная концентрация (\pm)-6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптериндигидрохлорида (0.188 мМ) и время инкубации (7 мин), которые обеспечивали линейный рост концентрации 5-гидрокситриптофана. Была также подобрана насыщающая концентрация L-триптофана (2.5 мМ). Кроме того, показано, что отсутствие в реакционной смеси ингибитора ароматических L-аминокислот – 4-гидроксибензилгидразина (“Sigma”) – не оказывает существенного влияния на точность метода в данных условиях.

Уровень 5-гидрокситриптофана определяли, применяя метод ВЭЖХ, подробно описанный выше. В качестве мобильной фазы использовали буфер (рН 3.6), содержащий фосфат калия (100 мМ), Na_2EDTA (0.1 мМ), натриевую соль 1-октилсульфоновой кислоты (1.4 мМ, “Sigma”) и 4% метанола по объему. Скорость потока – 0.6 мл/мин. Стандартные растворы 50 нг 5-гидрокситриптофана и (\pm)-6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптериндигидрохлорида повторно анализировали в течение опыта. Высоту пиков 5-гидрокситриптофана оценивали при помощи программного обеспечения MutiChrom v.1.5 (“Ampersand Ltd”, Россия) и калибровали относительно внешнего стандарта. Активность ТПГ2 выражали в нанограммах 5-гидрокси-триптофана на миллиграмм общего белка на минуту (нг/мг/мин). Концентрацию общего белка оцени-

вали, измеряя поглощение при 280 нм (Eppendorf BioPhotometer plus, “Eppendorf”, Германия).

Экспрессию генов изучали при помощи количественного метода, описанного ранее [22–25], с использованием мРНК ДНК-зависимой РНК-полимеразы (rPolII) в качестве внутреннего стандарта и геномной ДНК мыши известной концентрации – в качестве внешнего стандарта.

Общую РНК выделяли с использованием гуанидинизотиоцианата, фенола и хлороформа, обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (1 ед. на пробу, 37°C, 10 мин) и повторно экстрагировали фенолом и хлороформом [24, 25].

ОТ-ПЦР. Аликвоту (8 мкл) суммарной РНК (1 мкг) смешивали со 180 нг смеси случайных гексануклеотидов и 2.25 мкл стерильного KCl (1 М) и доводили стерильной водой до объема 16 мкл, денатурировали при 94°C в течение 5 мин, после чего отжигали 15 мин при 41°C. Затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), Трис-НСl (рН 8.3, 0.225 мкмоль), dNTP (0.015 мкмоль), ДТТ (0.225 мкмоль) и MnCl_2 (0.03 мкмоль). Смесь в конечном объеме 31 мкл инкубировали 60 мин при 41°C. Синтезированную кДНК хранили при температуре –20°C.

Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (таблица), разработаны нами на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании “Биосан” (Новосибирск). Один мкл кДНК смешивали с 2 мкл для буфера ПЦР, 0.3 мкл MgCl_2 (0.1 М), 1 мкл dNTP (4 мМ), 2.5 мкл смеси прямого и обратного праймеров (2 мкМ каждого), 1 ед. Taq-полимеразы и доводили стерильной водой до конечного объема 20 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Eppendorf Master Cycler (“Eppendorf”, Германия) согласно следующему протоколу: 94°C – 3 мин; (94°C – 10 с, 30 с при соответствующей температуре отжига (таблица), 72°C – 15 с) – 25 циклов (для ТПГ2 в среднем мозге), 26 циклов (для rPolII в среднем мозге), 27 циклов (для rPolII в гиппокампе и фронтальной коре и для 5-НТТ в среднем мозге), 28 циклов (для 5-НТ_{2A}-рецептора во фронтальной коре), 29 циклов (для 5-НТ_{2A}-рецепторов в гиппокампе и среднем мозге); 72°C – 2 мин. Оптимальное число циклов, обеспечивающее экспоненциальную фазу накопления ампликона, было определено в серии предварительных опытов.

Одновременно в тех же условиях проводили амплификацию в серии разведений (5, 10, 20 и 30 нг) геномной ДНК мыши, используемой в качестве внешнего стандарта. Контроль – отсутствие матрицы. ПЦР образцов и стандартов проводили в двух повторах.

Продукты ПЦР разделяли путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле, окрашивали бромидом

стым этидием и фотографировали при помощи цифровой камеры. Интенсивность флуоресценции ПЦР-продуктов образцов и стандартов геномной ДНК измеряли, используя программу Scion Image ("Scion Corporation", www.scioncorp.com). Затем величины калибровали по стандартной кривой (зависимость интенсивности амплификации от концентрации геномной ДНК, полученной при амплификации серии разведений – 5, 10, 20 и 30 нг геномной ДНК мыши), что позволило определить число копий кДНК 5-НТ_{2A}-рецепторов, ТПГ2, 5-НТТ и rPolII в образцах.

Поскольку в предварительных опытах различий по уровню мРНК rPolII между животными экспериментальной и контрольной групп обнаружено не было, интенсивность экспрессии гена 5-НТ_{2A}-рецептора, ТПГ2 и 5-НТТ выражали как отношение числа копий кДНК соответствующего гена к 100 копиям кДНК rPol II.

Статистика. Результаты представляли как среднее \pm SEM и сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительная активация 5-НТ_{2A}-рецепторов привела к существенному уменьшению их функциональной активности, которую определяли по числу встряхиваний головой, вызванных острым введением агониста 5-НТ_{2A}-рецептора DOI ($F_{1,22} = 11.5, p < 0.01$; рис. 1а). В то же время, хроническое введение DOI не повлияло на экспрессию гена 5-НТ_{2A}-рецептора во всех исследованных структурах мозга (рис. 1б).

Хроническое введение DOI привело к значительным изменениям экспрессии гена ключевого фермента биосинтеза 5-НТ – ТПГ2. Существенное повышение уровня мРНК ТПГ2 было обнаружено в среднем мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI ($F_{1,20} = 5.2, p < 0.05$; рис. 2а). Соответствующие изменения найдены при исследовании активности ТПГ2: активность фермента была выше в среднем мозге мышей, по-

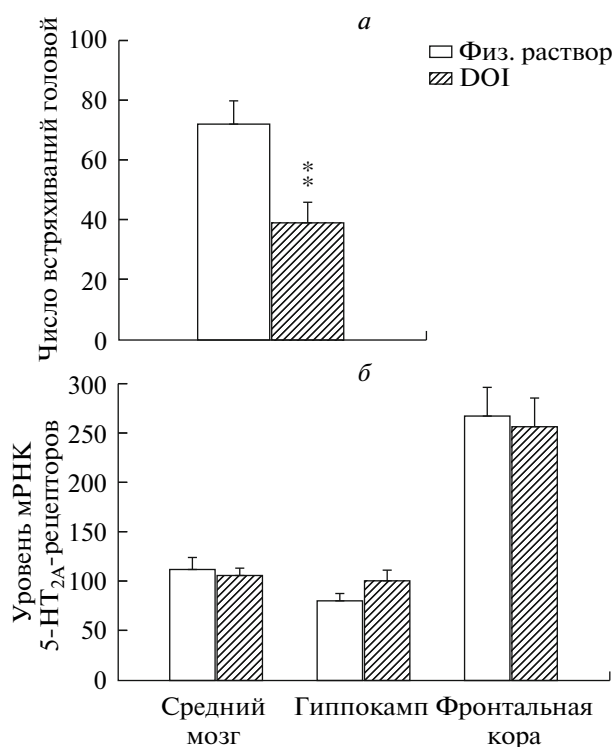


Рис. 1. Влияние хронического введения DOI на функциональную активность 5-НТ_{2A}-рецепторов (а) и экспрессию кодирующего их гена (б). Функциональная активность рецепторов определена по числу опосредуемых ими встряхиваний головой в ответ на введение DOI (1 мг/кг, в/бр.). Экспрессия гена 5-НТ_{2A}-рецептора представлена как число копий кДНК рецептора, отнесенное к 100 копиям кДНК rPolII. Все данные представляли как среднее \pm SEM минимум для 11 животных. ** $p < 0.01$ – по сравнению с мышами контрольной группы.

лучавших инъекции DOI, по сравнению с мышами контрольной группы ($F_{1,19} = 5.6, p < 0.05$; рис. 2б).

Показано также, что хроническое введение DOI приводит к резкому увеличению уровня 5-НТ в среднем мозге ($F_{1,19} = 9.6, p < 0.01$) без существенных изменений в уровне основного мета-

Последовательности и характеристики праймеров

Ген	Последовательность нуклеотидов	Температура отжига, °С	Длина ПЦР-продукта, п.н.
5-НТ _{2A}	F 5'-agaagccacctgtgtgtga-3'	61	169
	R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'		
ТПГ2	F 5'-cattcctcgacacaattccagtcg-3'	61	239
	R 5'-agtctacatccatcccaactgctg-3'		
5-НТТ	F 5'-aagccccaccttgactcctcc-3'	57	198
	R 5'-ctccttctctcctcacatatcc-3'		
rPolII	F 5'-gttctcgggcagcagaatgtag-3'	63	188
	R 5'-tcaatgagaccttctcgtcctcc-3'		

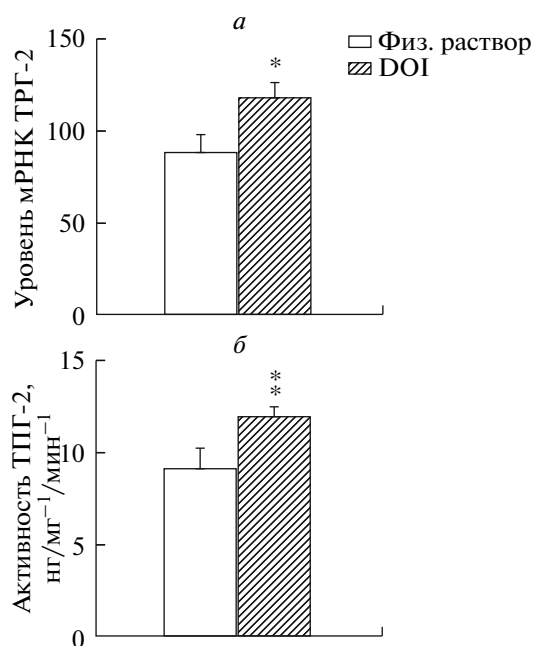


Рис. 2. Экспрессия гена, кодирующего ТРГ2 (а), и активность ТРГ2 (б) в среднем мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI, и мышей контрольной группы. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК гена ТРГ2, отнесенное к 100 копиям кДНК гРнР. Активность фермента представлена в нг 5-гидрокситриптофана на мг общего белка в минуту. Все данные представляли как среднее \pm SEM для 10 животных минимум. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ — по сравнению с мышами контрольной группой.

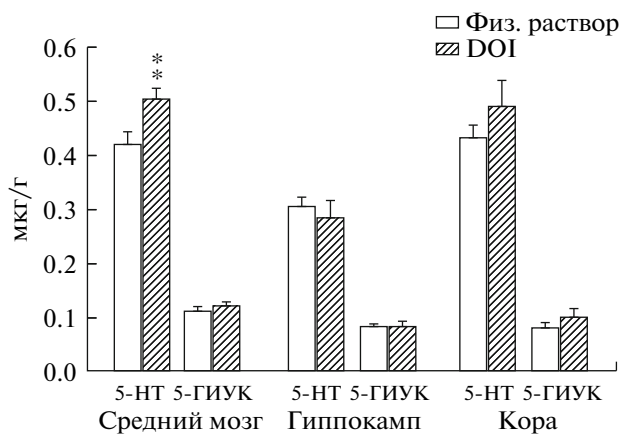


Рис. 3. Уровни 5-НТ и его основного метаболита 5-ГИУК в мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI, и мышей контрольной группы. Уровень моноамина и его метаболита представлен в мкг на г веса образца ткани. Все обозначения — как на рис. 2; ** $p < 0.01$ — по сравнению с мышами контрольной группой.

болита 5-НТ — 5-ГИУК ($F_{1,19} = 0.11$, $p > 0.05$). Достоверных изменений в уровне 5-НТ и 5-ГИУК в гиппокампе и фронтальной коре обнаружено не было (рис. 3).

В то же время, значительное снижение экспрессии гена, кодирующего 5-НТ транспортер, обнаружено в среднем мозге мышей, которые подвергались хроническому введению DOI, по сравнению с мышами контрольной группы ($F_{1,19} = 6.8$, $p < 0.05$; рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы показали, что хроническое введение агониста 5-НТ_{2A}-рецептора DOI приводит к снижению функциональной активности 5-НТ_{2A}-рецепторов. Эти результаты хорошо соотносятся с данными других исследователей об эффекте хронического введения агонистов 5-НТ_{2A}-рецепторов [14, 26]. В то же время, хроническое введение DOI не оказывает значительного влияния на экспрессию гена, кодирующего 5-НТ_{2A}-рецепторы, во всех исследованных структурах мозга, что совпадает с данными Анжи (Anji) и соавт. [16].

Нами обнаружено, что хроническое введение DOI приводит к существенному увеличению экспрессии гена ключевого фермента биосинтеза 5-НТ в мозге — ТРГ2, которое сопровождается увеличением активности фермента ТРГ2 в среднем мозге. Известно, что ТРГ2 и экспрессия гена ТРГ2 являются биологическими маркерами функциональной активности 5-НТ-системы мозга [27]. Необходимо отметить, что увеличение уровня мРНК ТРГ2, активности ТРГ2 и уровня 5-НТ обнаружено только в среднем мозге — структуре, где локализуется основная масса тел 5-НТ нейронов, синтезирующих ТРГ2 и 5-НТ.

Повышение экспрессии гена ТРГ2 и активности фермента ТРГ2, наряду с повышенным уровнем 5-НТ и неизменным уровнем 5-ГИУК, свидетельствует об увеличении синтеза 5-НТ без существенных изменений его катаболизма в мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI. В отличие от ТРГ2, экспрессия гена 5-НТТ была значительно снижена в среднем мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI. Такой противоположный фармакологический эффект на два ключевых гена 5-НТ-системы мозга обнаружен впервые. В связи с тем, что 5-НТТ, как известно, осуществляет обратный захват 5-НТ из синаптической щели, выявленные противоположные изменения в экспрессии генов ТРГ2 и 5-НТТ указывают на синергическую активацию 5-НТ-системы и, следовательно, на увеличение уровня 5-НТ в синаптической щели.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о вовлечении 5-НТ_{2A}-рецепторов в ауторегуляцию 5-НТ-системы мозга и указывают на существование гетерологических взаимодействий типа «рецептор—ген» между 5-НТ_{2A}-рецепторами и генами ТРГ2 и 5-НТТ.

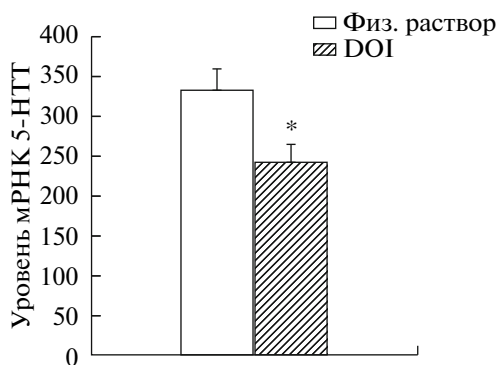


Рис. 4. Экспрессия гена, кодирующего серотониновый транспортер, в среднем мозге мышей, подвергавшихся хроническому введению DOI, и мышей контрольной группы. Экспрессия гена представлена как число копий кДНК 5-НТТ гена, отнесенное на 100 копий кДНК rPolII. Все обозначения – как на рис. 1; * $p < 0.05$ – по сравнению с мышами контрольной группы.

Результаты данной работы указывают на то, что хроническое введение DOI приводит к увеличению функциональной активности 5-НТ-системы мозга: во-первых, увеличивается экспрессия гена ТПГ2 и активность ТПГ2, представляющего основной маркер функциональной активности 5-НТ-системы мозга; во-вторых, увеличивается уровень 5-НТ; и, в-третьих, снижается экспрессия гена 5-НТТ.

Необходимо подчеркнуть, что ассоциация между снижением функциональной активности 5-НТ-рецептора и изменением уровня экспрессии ключевых генов системы была обнаружена нами при хронической стимуляции 5-НТ_{1A}-рецепторов [9]. Показано, что хроническая активация 5-НТ_{1A}-рецепторов приводит к падению их чувствительности, к снижению экспрессии 5-НТ_{1A}-гена, снижению экспрессии гена 5-НТ_{2A}-рецепторов во фронтальной коре и экспрессии ТПГ2 в среднем мозге.

Рассматривая совокупность этих данных можно заключить, что хроническая стимуляция некоторых 5-НТ-рецепторов вызывает, наряду со снижением их чувствительности, специфические изменения в экспрессии генов, кодирующих ключевые элементы 5-НТ-системы мозга. Мы предполагаем, что уменьшение функциональной активности некоторых типов 5-НТ-рецепторов, вызванное снижением их плотности [28], является ключевым сигналом, запускающим компенсаторные механизмы 5-НТ-системы мозга.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00079); гранта Президента Российской Федерации для кандидатов наук (МК-199.2010.4); Программы Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” (№ 6.9); гранта

“Интеграция” Сибирского отделения Российской академии наук (№ 18).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jouvet M. 1969. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*. **163**, 32–41.
- Popova N.K., Konusova A.V. 1985. Brain and peripheral effects of serotonin on thermoregulation. *Biogenic Amines*. **3**, 125–134.
- Jacobs B.L., Fornal C.A. 1995. Serotonin and behavior. A general hypothesis. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Eds Bloom F.E., Kupfer D.J. N.Y.: Raven Press, pp. 461–469.
- Kulikov A.V., Kozlachkova E., Popova N.K. 1989. Genetic control of catalepsy in mice. *Genetika*. **25**, 1402–1408.
- Berman M.E., Tracy J.I., Coccaro E.F. 1997. The serotonin hypothesis of aggression revisited. *Clin. Psychol. Rev.* **17**, 651–665.
- Amstislavskaya T.G., Popova N.K. 2006. Serotonergic receptor subtypes in male mouse and rat sexual arousal. In: *Advances in Psychology Research*. Ed. Columbus A. N.Y.: Nova Science Publishers, pp. 139–160.
- Barnes N.M., Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol.* **38**, 1083–1152.
- Saudou F., Hen R. 1994. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular and functional diversity. *Adv. Pharmacol.* **30**, 327–380.
- Popova N.K., Naumenko V.S., Cybko A.S., Bazovkina D.V. 2010. Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT(1A) agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior. *Neuroscience*. **169**, 229–235.
- Stein D.J., Hemmings S., Moolman-Smook H., Aude-naert K. 2007. 5-HT_{2A}: its role in frontally mediated executive function and related psychopathology. *CNS Spectr.* **12**, 512–516.
- Nomura M., Nomura Y. 2006. Psychological, neuroimaging, and biochemical studies on functional association between impulsive behavior and the 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1086**, 134–143.
- Rasmussen H., Erritzoe D., Andersen R., et al. 2010. Decreased frontal serotonin_{2A} receptor binding in antipsychotic-naive patients with first-episode schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*. **67**, 9–16.
- Rocchi A., Micheli D., Ceravolo R., Manca M.L., Tognoni G., Siciliano G., Murri L. 2003. Serotonergic polymorphisms (5-HTTLPR and 5-HT_{2A}): association studies with psychosis in Alzheimer disease. *Genet. Test.* **7**, 309–314.
- Kuoppamaki M., Palvimaki E.P., Hietala J., Syvalahti E. 1995. Differential regulation of rat 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors after chronic treatment with clozapine, chlorpromazine and three putative atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacol.* **13**, 139–150.
- Darmani N.A., Martin B.R., Glennon R.A. 1992. Behavioral evidence for differential adaptation of the serotonergic system after acute and chronic treatment

- with (+/-)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) or ketanserin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**, 692–698.
16. Anji A., Kumari M., Sullivan Hanley N.R., Bryan G.L., Hensler J.G. 2000. Regulation of 5-HT_{2A} receptor mRNA levels and binding sites in rat frontal cortex by the agonist DOI and the antagonist mianserin. *Neuropharmacol.* **39**, 1996–2005.
 17. Ross J.D., Herin D.V., Frankel P.S., Thomas M.L., Cunningham K.A. 2006. Chronic treatment with a serotonin(2) receptor (5-HT₂R) agonist modulates the behavioral and cellular response to (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine [(+)-MDMA]. *Drug. Alcohol. Depend.* **81**, 117–127.
 18. Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Zubkov E.A., Kulikov A.V. 2010. The role of 5-HT_{2A} receptor and 5-HT_{2A}/5-HT_{1A} receptor interaction in the suppression of catalepsy. *Genes Brain. Behav.* **9**, 519–524.
 19. Green A.R., Heal D.J. 1985. The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models. In: *Neuropharmacology of serotonin*. Ed. Green A.R. Oxford: Oxford University, pp. 326–365.
 20. Fantegrossi W.E., Simoneau J., Cohen M.S., Zimmerman S.M., Henson C.M., Rice K.C., Woods J.H. 2010. Interaction of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in R(-)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-elicited head twitch behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 728–734.
 21. Klein A.B., Santini M.A., Aznar S., Knudsen G.M., Rios M. 2010. Changes in 5-HT_{2A}-mediated behavior and 5-HT_{2A}- and 5-HT_{1A} receptor binding and expression in conditional brain-derived neurotrophic factor knock-out mice. *Neuroscience*. **169**, 1007–1016.
 22. Kulikov A.V., Naumenko V.S. 2007. Problems of mRNA quantification in the brain using RT-PCR. In: *New Messenger RNA Research Communications*. Ed. Kwang L.B. N.Y.: Nova Science Publishers Inc, pp. 53–68.
 23. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. 2005. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J. Neurosci. Methods*. **141**, 97–101.
 24. Науменко В.С., Куликов А.В. 2006. Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге. *Молекуляр. биология*. **40**, 37–44.
 25. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. 2008. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J. Neurosci. Methods*. **170**, 197–203.
 26. Smith R.L., Barrett R.J., Sanders-Bush E. 1999. Mechanism of tolerance development to 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine in rats: down-regulation of the 5-HT_{2A}, but not 5-HT_{2C}, receptor. *Psychopharmacology (Berl)*. **144**, 248–254.
 27. Popova N.K., Kulikov A.V. 2010. Targeting tryptophan hydroxylase 2 in affective disorder. *Expert. Opin. Ther. Targets*. **14**, 1259–1271.
 28. Serretti A., Artioli P., De Ronchi D. 2004. The 5-HT_{2C} receptor as a target for mood disorders. *Expert. Opin. Ther. Targets*. **8**, 15–23.