

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ЭФФЕКТЫ АНТАГОНИСТОВ 1A И 2A/2C ПОДТИПОВ СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ДЕПРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ c-FOS БЕЛКА В ГИПОТАЛАМУСЕ У ОВАРИОЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

С. В. Барабанова, Ю. О. Федотова, Н. С. Сапронов¹

Цель настоящей работы — оценка влияния хронического введения антагониста 5-HT_{2A/2C}-рецепторов кетансерина (0,1 мг/кг внутривнутрибрюшинно) и антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190 (0,1 мг/кг внутривнутрибрюшинно), введенных изолированно или в комбинации с 17β-эстрадиолом (0,5 мкг на животное, внутримышечно), в течение 14 дней, на депрессивное поведение и характер экспрессии c-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса взрослых овариоэктомированных (ОЭ) крыс-самок. Моделирование депрессии у крыс осуществляли в тесте Порсолта. Экспрессию c-Fos белка определяли с помощью метода иммуногистохимии. Установлено, что 17β-эстрадиол оказывает умеренный антидепрессивный эффект у ОЭ крыс. Хроническое введение кетансерина приводило к выраженному антидепрессивному эффекту у ОЭ крыс. При хроническом введении кетансерина в сочетании с 17β-эстрадиолом ОЭ самкам антидепрессивное действие обоих веществ усиливалось. Антидепрессивный эффект кетансерина у ОЭ крыс коррелировал с уменьшением уровня экспрессии c-Fos белка в паравентрикулярном ядре гипоталамуса. Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии овариальной гормональной системы и серотонинергической системы мозга в механизмах депрессии.

Ключевые слова: кетансерин, NAN-190, овариоэктомия, депрессия, c-Fos, серотониновые рецепторы 1A/2A подтипов, эстрогены

ВВЕДЕНИЕ

Одним из патофизиологических механизмов депрессии является снижение чувствительности, связывающей способности и количества серотониновых рецепторов 1A, 2A и 2C подтипов в головном мозге [13]. С другой стороны, хорошо известно, что эстрогены оказывают многогранное влияние на серотонинергическую систему мозга, а также вовлекаются в механизмы развития аффективных расстройств и депрессии [3, 8]. Отмечено, что в климактерический период, после беременности, при гипозэстрогении и в определенные периоды менструального цикла наблюдается повышенная частота возникновения депрессии и биполярных расстройств [3, 12].

Принято считать, что механизм действия антидепрессантов разных классов связан с их способностью модулировать и нормализовать уровень моноаминергической передачи в головном мозге [6, 13]. Результаты ряда экспериментов свидетельствуют о том, что ха-

рактерные эффекты препаратов, оказывающих антидепрессивный эффект, проявляются не только в изменении поведения животных, но и в индукции экспрессии генов раннего ответа, в частности c-Fos, в различных структурах головного мозга [2]. Анализ экспрессии гена c-Fos — маркера нейрональной активации — широко применяется в исследованиях, изучающих реакцию ЦНС на различные стрессорные воздействия [7, 16]. При применении антидепрессантов в ряде работ исследовали изменение экспрессии c-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса [5, 6]. Известно, что эта гипоталамическая область в наибольшей степени вовлечена в реализацию реакции головного мозга на стресс.

Принимая во внимание тесные взаимоотношения между овариальной гормональной и серотонинергической нейромедиаторной системами, интересно оценить роль серотонинергических рецепторов 1A подтипа (5-HT_{1A}) в депрессивном поведении и экспрессии белка c-Fos в условиях дефицита эстрогенов.

Целью настоящей работы явилась оценка влияния хронического введения антагониста 5-HT_{2A/2C} рецепторов кетансерина и антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190, вводимых в течение 14 дней изолированно или в комбинации с 17β-эстрадиолом, на депрессив-

¹ Отдел общей патологии и патофизиологии (руководитель — акад. РАМН Е. А. Корнева), отдел нейрофармакологии им. С. В. Аничкова (руководитель — член-корр. РАМН Н. С. Сапронов) Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

ное поведение и экспрессию *c-Fos* в гипоталамусе взрослых овариоэктомированных (ОЭ) крыс-самок.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 80 белых половозрелых крысах-самках линии Вистар массой 180 – 200 г, полученных из питомника Рапполово. Животных содержали при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режимов со свободным доступом к еде и воде. Все исследования проводили в первой половине дня (9 – 12 ч).

Животные были разделены на следующие группы: 1 — интактные самки, получавшие физиологический раствор (контроль 1); 2 — интактные самки, получавшие кетансерин (“Sigma”, США, 0,1 мг/кг внутривенно); 3 — интактные самки, получавшие NAN-190 (“Sigma”, США, 0,1 мг/кг внутривенно); 4 — ОЭ самки, получавшие масляный растворитель внутримышечно (контроль 2); 5 — ОЭ самки, получавшие стандартную дозу эстрадиола (“Sigma”, США, 0,5 мкг на животное внутримышечно) ежедневно; 6 — ОЭ самки, получавшие ежедневно кетансерин; 7 — ОЭ самки, получавшие ежедневно кетансерин в комбинации с эстрадиолом в той же дозе, которую вводили ОЭ самкам; 8 — ОЭ самки, получавшие ежедневно NAN-190; 9 — ОЭ самки, получавшие ежедневно NAN-190 в комбинации с эстрадиолом в той же дозе, которую вводили ОЭ самкам. Опыты начинали через 2 нед после овариоэктомии. Все препараты вводили в течение 14 дней.

Для моделирования депрессии использовали самок, находящихся в фазе диэструса, поскольку это физиологическое состояние характеризуется сбалансированностью гормонального фона. Удаление яичников осуществляли согласно общепринятой методике [1]. Эффективность действия экзогенного введения эстрадиола у ОЭ самок, а также определения фаз овариального цикла у интактных крыс оценивали по влагалищным мазкам.

Определение депрессивного поведения. Моделирование депрессии у крыс осуществляли в тесте Порсолта [4]. Суть метода состоит в том, что крыс помещали в сосуд 30 – 40 см в диаметре и глубиной 60 см, заполненный водой с температурой 25 ± 2 °С. Животные, попадая в воду, стараются выбраться из сосуда. Убедившись в тщетности своих попыток, крысы оставляют их и зависают в воде в характерной позе. Показателем выраженности депрессивноподобного состояния по данному тесту являлась длительность неподвижности, которую оценивали визуально. В первый день эксперимента животное помещали в сосуд с водой, где оно плавало в течение 15 мин, после чего животное удаляли, высушивали, а затем помещали в домашние клетки. Через 24 ч проводили тестирование выраженности депрессивноподобного состояния. Животное

снова помещали в сосуд с водой и в течение 5 мин регистрировали время подвижности и неподвижности.

Иммуногистохимическое выявление c-Fos белка. Не менее чем за 5 дней до начала поведенческого эксперимента животных рассаживали в индивидуальные клетки. Накануне проведения исследования животных в домашних клетках переносили в экспериментальную комнату. Это делалось заранее для того, чтобы экспрессия *c-Fos*, вызванная переменной обстановки, не маскировала экспрессию, обусловленную экспериментальными процедурами. Через 2 ч после окончания проведения теста Порсолта животных наркотизировали и проводили интракардиальную перфузию фосфатным буфером-ФСБ (рН 7,4) и затем фиксирующим раствором (4 % параформальдегид, 0,1 М ФСБ). Головной мозг выделяли и помещали в раствор сахарозы (20 % сахароза, 4 % параформальдегид, 0,1 М ФСБ рН 7,4) на 24 ч. Срезы головного мозга толщиной 20 мкм были приготовлены на микротоме (“Reichert”, Австрия) с использованием замораживающего столика (Миконта 02, Россия). Срезы отмывали в 0,01 М ФСБ (рН 7,4) при температуре 25 ± 2 °С 3 раза по 5 мин от излишка фиксажа и помещали в раствор 3 % H_2O_2 , после чего снова отмывали в ФСБ 3 раза по 5 мин. Затем для предотвращения неспецифического связывания антител срезы инкубировали в растворе, содержащем 1 % БСА, 0,1 М ФСБ и 0,4 % тритон X-100 1 ч. Далее срезы отмывали ФСБ 3 раза по 5 мин и инкубировали с первыми кроличьими антителами к *c-Fos* (Santa Cruz, 1:200, США) (0,1 % БСА; 0,01 М ФСБ; 0,4 % тритон X-100) в течение ночи при комнатной температуре. Затем, после отмывки (3 раза по 5 мин) ФСБ, инкубировали со вторыми антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой (“Sigma”, 1:300, США) (0,01 М ФСБ; 0,4 % тритон) в течение 2 ч и опять промывали 0,01 М ФСБ (2 раза по 5 мин) и 1 раз 0,01 М трис-НСl (рН 7,4). После этого срезы окрашивали в течение 15 мин в растворе 0,02 % диаминобензидина (ДАБ) в трис-буфере (10 мМ трис НСl рН 7,4) с 0,001 % H_2O_2 . Срезы размещали на предметных стеклах. Затем приготавливали постоянные препараты, покрывая их канадским бальзамом и покровными стеклами. Полученные препараты срезов головного мозга анализировали при помощи видео-компьютерной системы Видео-Тест (Иста-Видео-Тест, Россия) с использованием компьютерных карт Brain Maps [15]. Об изменении экспрессии *c-Fos* белка в паравентрикулярном ядре гипоталамуса крыс судили по изменению количества *c-Fos*-позитивных клеток на площади 10000 кв мкм.

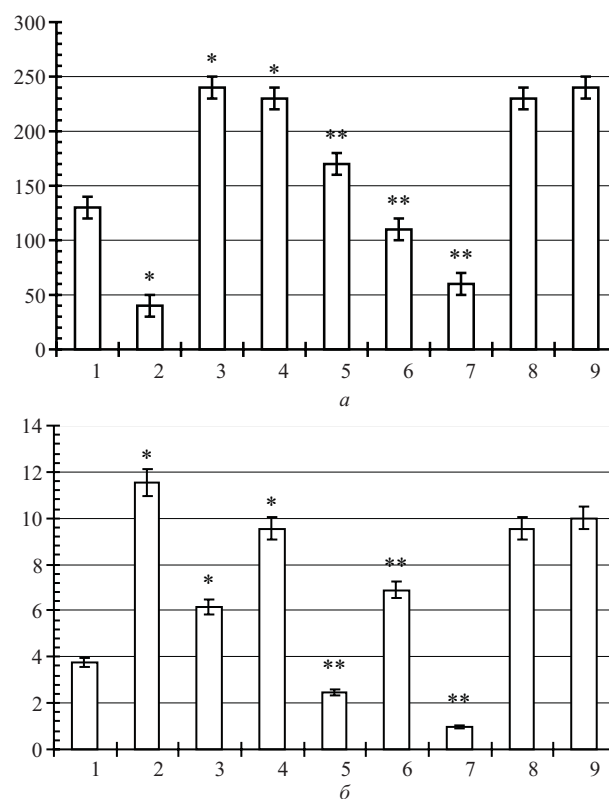
Все процедуры выполняли в соответствии с этическими требованиями, установленными для работы с экспериментальными животными.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью ANOVA-test и t-test при $p < 0,05$ с использованием пакета программ Statistica for Windows 7.0. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте Порсолта установлено, что хроническое введение антагониста 5-HT_{2A/2C} рецепторов кетансерина intactным самкам (группа 2) приводило к достоверному снижению времени неподвижности ($p < 0,05$), тогда как хроническое введение антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190 (группа 3) достоверно увеличивало время неподвижности по сравнению с intactными крысами (контроль 1) (рисунок, а). В условиях дефицита эстрогенов у самок (группа 4) наблюдалось значительное повышение времени неподвижности по сравнению с intactными крысами (контроль 1). На фоне заместительной гормональной терапии 17β-эстрадиолом у ОЭ крыс (группа 5) отмечалось достоверное уменьшение времени неподвижности по сравнению с контрольными ОЭ самками. Хроническое введение кетансерина ОЭ животным (группа 6) вызывало существенное ($p < 0,05$) понижение времени неподвижности по сравнению с контролем 2. Сочетанное введение кетансерина и 17β-эстрадиола ОЭ крысам (группа 7) приводило к усилению антидепрессивного эффекта обоих веществ, что выражалось в еще более резком уменьшении времени неподвижности по сравнению с контролем 2. В то же время в условиях изолированного или комбинированного с 17β-эстрадиолом введения NAN-190 у ОЭ самок (группы 8, 9) не происходило каких-либо достоверных изменений во времени неподвижности по сравнению с контролем 2.

Иммуногистохимический анализ экспрессии белка c-Fos в головном мозге крыс через 2 ч после проведения теста Порсолта выявил, что хроническое введение кетансерина intactным самкам (группа 2) достоверно понижало число клеток, содержащих c-Fos-белок ($p < 0,05$) в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, тогда как хроническое введение NAN-190 (группа 3) вызывало увеличение количества c-Fos-позитивных клеток по сравнению с контролем 1 (рисунок, б). Овариэктомия (группа 4) приводила к выраженному повышению числа c-Fos-содержащих клеток в паравентрикулярном ядре гипоталамуса по сравнению с intactными крысами (контроль 1). При экзогенном введении 17β-эстрадиола у ОЭ крыс (группа 5) наблюдалось уменьшение количества c-Fos-позитивных клеток в этом же ядре гипоталамуса по сравнению с контрольными ОЭ самками. Хроническое введение кетансерина ОЭ животным (группа 6) вызывало выраженное ($p < 0,05$) понижение количества клеток, содержащих c-Fos белок по сравнению с контролем 2. Сочетанное введение кетансерина и 17β-эстрадиола ОЭ крысам (группа 7) приводило к усилению депримирующего эффекта обоих веществ на экспрессию белка c-Fos в клетках паравентрикулярного ядра гипоталамуса, что выражалось в еще более резком уменьшении их количества по сравнению с контролем 2. В то же время в условиях изолированного или комбини-



Влияние хронического введения NAN-190 или кетансерина на депрессивное поведение в тесте Порсолта (а) и на экспрессию c-Fos белка в гипоталамусе (б) у intactных и овариэктомированных (ОЭ) крыс-самок.

По оси абсцисс — группы животных: 1 — intactные крысы (контроль 1), 2 — intactные крысы + кетансерин, 3 — intactные крысы + NAN-190, 4 — ОЭ крысы (контроль 2), 5 — ОЭ крысы + 17β-эстрадиол, 6 — ОЭ крысы + кетансерин, 7 — ОЭ крысы + кетансерин + 17β-эстрадиол, 8 — ОЭ крысы + NAN-190, 9 — ОЭ крысы + NAN-190 + 17β-эстрадиол. По оси ординат: а — время неподвижности, с; б — количество c-Fos-позитивных клеток на 100 000 мкм². Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению: * — с контролем 1; ** — с контролем 2.

рованного с 17β-эстрадиолом введения NAN-190 у ОЭ самок (группы 8, 9), напротив, происходило еще более сильная индукция экспрессии c-Fos белка в гипоталамусе по сравнению с контролем 2.

Результаты данного исследования показывают, что хроническое введение антагониста 5-HT_{1A} рецепторов оказывает разнонаправленное влияние на проявления депрессивного состояния и экспрессию c-Fos белка в паравентрикулярном ядре гипоталамуса у intactных и ОЭ самок. Так, у intactных крыс введение кетансерина оказывало антидепрессивное действие, тогда как введение NAN-190, напротив, способствовало развитию более глубокого состояния депрессии. Данные литературы свидетельствуют о том, что введение ряда антагонистов 5-HT_{2A/2C} рецепторов у мышей-самцов или крыс-самцов дозозависимо снижает время неподвижности в тесте Порсолта, тогда как введение другого антагониста 5-HT_{1A} рецепторов спироксантрина (1–30 мг/кг внутрь) не влияет на время неподвижности или повышает его [9]. Данные о подобных эффек-

тах хронического введения антагониста 5-HT_{2A/2C} рецепторов кетансерина или антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190 у интактных крыс-самок, находящихся в диэструсе, получены нами впервые. Согласно экспериментальным и клиническим исследованиям, тотальный или частичный недостаток эстрогенов в организме приводит к развитию ярко выраженного состояния депрессии, при этом заместительное введение эстрадиола облегчает некоторые симптомы проявления этого состояния, однако полностью их не устраняет [3, 12]. В наших условиях опыта также было отмечено развитие депрессивного состояния у ОЭ крыс-самок по сравнению с интактными самками и антидепрессивный эффект 17β-эстрадиола у ОЭ крыс на фоне его хронического введения. Хроническое введение антагониста 5-HT_{2A/2C} рецепторов кетансерина в условиях дефицита эстрогенов оказывало антидепрессивное действие, тогда как комбинированное его введение с 17β-эстрадиолом приводило к усилению антидепрессивного действия обоих веществ. Введение антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190 при овариоэктомии было неэффективным, кроме того, на фоне введения данного препарата позитивный эффект 17β-эстрадиола полностью ингибировался. По-видимому, позитивный эффект кетансерина связан с действием на постсинаптические 5-HT_{2A/2C} рецепторы, что может приводить к повышению их чувствительности и, следовательно, к увеличению серотонинергической передачи. Усиление эффекта кетансерина и 17β-эстрадиола может быть обусловлено модулирующим влиянием гормонального препарата на 5-HT_{2A/2C} рецепторы в мозге, что в конечном итоге вызывает более существенную стимуляцию серотонинергической передачи. Негативный эффект NAN-190 при его комбинированном введении с 17β-эстрадиолом может быть связан как с блокадой 5-HT_{1A} рецепторов, так и с его возможным влиянием на лигандные участки связывания эстрогенового рецептора с гормоном, вследствие чего NAN-190 и 17β-эстрадиол находятся в конкурентных отношениях между собой.

При сопоставлении уровней экспрессии c-Fos в гипоталамусе и выраженности депрессивного поведения обращает на себя внимание наличие корреляции. Так, антидепрессивный эффект кетансерина у интактных крыс коррелирует с уменьшением количества c-Fos-позитивных клеток в паравентрикулярном ядре, т. е. со снижением реакции нейрональных клеток данной структуры на стресс, вызванный тестом Порсолта, в то время как NAN-190 не оказывает подобного действия. У ОЭ крыс на фоне введения кетансерина одного или с 17β-эстрадиолом прослеживается четкая корреляция между снижением экспрессии белка c-Fos, с одной стороны, и антидепрессивным эффектом этого препарата — с другой. Кроме того, усиление антидепрессивного эффекта кетансерина и 17β-эстрадиола у ОЭ крыс совпадает с увеличением действия этих веществ

на уровень экспрессии белка c-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса. Необходимо отметить, что негативный эффект NAN-190 на депрессивное поведение у ОЭ крыс также коррелирует с его стимулирующим влиянием на количество c-Fos-позитивных клеток в гипоталамусе ОЭ крыс. Известно, что стратегия терапии антидепрессантами в условиях нормального гормонального баланса направлена на восстановление нейромедиаторной передачи, увеличение уровня биогенных аминов и стимуляцию функции 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} рецепторов [11, 12, 14]. При дисбалансе эстрогенов для устранения состояния депрессии важно создать условия сбалансированности и скоординированности между функциональной активностью гормональной системы и активностью нейромедиаторных систем. Известно, что овариоэктомия вызывает резкое компенсаторное увеличение экспрессии гена 17β-E₂-рецептора при одновременном падении уровня экспрессии генов 5-HT_{1A}-/5-HT_{2A}-рецепторов [3, 12]. Можно полагать, что выраженный антидепрессивный эффект кетансерина в комбинации с 17β-эстрадиолом при недостатке эстрогенов связан не только с их влиянием на рецепторный и гормональный статус, но и на индукцию гена раннего ответа c-Fos, что весьма важно, поскольку ранние гены также принимают участие в патофизиологических механизмах депрессивноподобного поведения [6].

Таким образом, результаты эксперимента указывают на то, что при действии изучаемых серотонинергических веществ в условиях дефицита эстрогенов экспрессия гена раннего ответа c-Fos указывает на вовлечение 5-HT_{1A}-/5-HT_{2A/2C}-рецепторов, тесно связанных с механизмами депрессии. Полученные данные позволяют также прийти к заключению, что для лечения эмоциональных расстройств при гормональном дисбалансе целесообразно сочетанное использование нейромедиаторного и гормонального препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Хроническое введение антагониста 5-HT_{2A/2C} рецепторов кетансерина оказывает антидепрессивный эффект у овариоэктомированных (ОЭ) крыс.
2. Хроническое введение кетансерина усиливает антидепрессивный эффект 17β-эстрадиола у ОЭ самок.
3. Антидепрессивный эффект кетансерина у ОЭ крыс коррелирует с уменьшением уровня экспрессии c-Fos в паравентрикулярном ядре гипоталамуса.
4. Хроническое введение антагониста 5-HT_{1A} рецепторов NAN-190 изолированно или в комбинации с 17β-эстрадиолом не оказывает антидепрессивного эффекта у ОЭ крыс.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 04-04-49025.

ЛИТЕРАТУРА

1. Я. Д. Киршенблат, *Практикум по эндокринологии*, Высшая школа, Москва (1969), сс. 55 – 57.
2. A. Badiani, M. M. Gates, H. E. W. Day, et al., *J. Neurosci.*, **18**, 10579 – 10593 (1998).
3. C. L. Bethea, N. Z. Lu, C. Gundlan, et al., *Front. Neuroendocrinol.*, **23**, 41 – 100 (2002).
4. M. Bourin, D. Pharm, E. Mocaer, et al., *Rev. Psychiatr. Neurosci.*, **29**, 126 – 133 (2004).
5. M. A. De Medeiros, R. L. Carlos, and M. L. Eugenio, *Neuropsychopharmacol.*, **30**, 1246 – 1256 (2005).
6. G. E. Duncan, D. J. Knapp, K. B. Johnson, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 1076 – 1089 (1996).
7. L. Kaczmarek, J. A. Siedlecki, and W. Danysz, *Brain Res.*, **427**, 183 – 186 (1988).
8. J. Liu, Y. Chen, C. A. Kozak, et al., *Genomics*, **11**, 231 – 234 (1991).
9. G. P. Luscombe, K. F. Martin, L. J. Hutchins, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 669 – 677 (1993).
10. H. Manji, W. C. Drevets, and D. S. Charney, *Nat. Med.*, **7**, 541 – 547 (2001).
11. B. S. McEwen, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 205 – 216 (1999).
12. B. S. McEwen and S. E. Alves, *Endocrine Rew.*, **20**, 279 – 307 (2000).
13. J. P. Olie, J. Costa E Silva, and J. P. Macher, *Neuroplasticity: a new approach to the pathophysiology of depression*, Science Press, London UK, (2004), 75 p.
14. L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, et al., *Science*, **301**, 805 – 809 (2003).
15. L. W. Swanson, *Brain Maps: Computer Graphics Files*, Elsevier, Science, Amsterdam (1992).
16. X. Zhang, P. E. Andren, and P. Svenningsson, *Brain Res.*, **1095**, 207 – 210 (2006).

Поступила 28.11.06

EFFECTS OF ANTAGONISTS OF 5-HT_{1A} AND 5-HT_{2A/2C} SUBTYPES OF SEROTONIN RECEPTORS ON THE DEPRESSIVE BEHAVIOR AND EXPRESSION OF C-FOS PROTEIN IN HYPOTHALAMUS OF OVARIECTOMIZED RATS

S. V. Barabanova, Yu. O. Fedotova, and N. S. Saprnov

Institute for Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376, Russia

We have studied the influence of a chronic administration of the 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist ketanserin (0.1 mg/kg, i.p.) and the 5-HT_{1A} receptor antagonist NAN-190 (0.1 mg/kg, i.p.) alone or in combinations with 17β-estradiol (0.5 mg per animal, i.m.) for 14 days on the depressive behavior and expression of c-Fos protein in the paraventricular nucleus of hypothalamus in adult ovariectomized (OVX) female rats. The depression in rats was modeled by the Porsolt test. The c-Fos protein expression in the paraventricular nucleus of hypothalamus was determined using immunohistochemical techniques. In the Porsolt test, 17β-estradiol in OVX rats reduced the immobilization time to some extent. Ketanserin alone significantly decreased the immobilization time in OVX rats. The chronic administration of ketanserin in combination with 17β-estradiol in OVX females potentiated the antidepressant effect of ketanserin. At the same time, ketanserin administration led to a significant decrease in the level of c-Fos protein in the hypothalamus in OVX rats as compared to the intact control. These results are indicative of a substantial interaction between the ovarian hormonal system and the serotonergic brain system involved the mechanisms of depression.