

ЭФФЕКТЫ ДЛИТЕЛЬНОГО КОМБИНИРОВАННОГО ВВЕДЕНИЯ КЕТАНСЕРИНА И ФЛУОКСЕТИНА МЫШАМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИНИИ B6.CBA-D13Mit76C, ОТЛИЧАЮЩИМСЯ ИЗМЕНЁННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ 5-HT_{1A}-РЕЦЕПТОРОВ

© 2023 А.С. Цыбко*, Е.М. Кондаурова#, Е.А. Заливина, В.О. Благиня, В.С. Науменко

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Новосибирская обл., Россия; электронная почта: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.2023

После доработки 11.04.2023

Принята к публикации 12.04.2023

Рекомбинантная линия мышей B6.CBA-D13Mit76C отличается изменённой чувствительностью 5-HT_{1A}-рецепторов и усиленной транскрипцией кодирующего их гена. Недавно нами было обнаружено, что хроническое введение классического антидепрессанта флуоксетина мышам B6.CBA-D13Mit76C оказывает про-депрессивный эффект в тесте «принудительное плавание». Поскольку известно, что блокада 5-HT_{2A}-рецепторов может быть благотворной при терапии устойчивой к антидепрессантам депрессии, мы оценили эффект длительного введения (14 дней внутрибрюшинно) селективного антагониста 5-HT_{2A}-рецепторов кетансерина (0,5 мг/кг), антидепрессанта флуоксетина (20 мг/кг) или комбинации флуоксетин + кетансерин на поведение, функциональную активность 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторов, обмен серотонина (5-HT) и транскрипцию ключевых генов серотониновой системы в мозге мышей B6.CBA-D13Mit76C. Кетансерин не отменил про-депрессивный эффект флуоксетина, хотя кетансерин, флуоксетин и их комбинация снизили функциональную активность 5-HT_{1A}-рецепторов и транскрипцию гена *Htr1a* в гиппокампе и среднем мозге. Кроме того, все использованные препараты снизили уровни мРНК *Slc6a4* и *Maoa* в среднем мозге. Эти изменения не сопровождались существенными изменениями в уровнях 5-HT и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты. Однако кетансерин усилил активность ключевого фермента синтеза 5-HT в мозге — триптофангидроксилазы-2 (ТПГ-2). Таким образом, несмотря на некоторые позитивные эффекты (снижение транскрипции *Htr1a*, *Slc6a4* и *Maoa* и усиление активности ТПГ-2), длительная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов не способна облегчить неблагоприятное действие классического антидепрессанта флуоксетина при aberrантном функционировании 5-HT_{1A}-рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 5-HT_{1A}-рецептор, 5-HT_{2A}-рецептор, ТПГ-2, флуоксетин, кетансерин, устойчивость к антидепрессантам.

DOI: 10.31857/S0320972523060040, EDN: EELHUV

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня одним из главных вызовов для фармакотерапии большого депрессивного расстройства является терапевтически резистентная депрессия (ТРД). По данным многочисленных исследований, больше трети, если не половина пациентов, демонстрирует неадекват-

ный ответ на классические антидепрессанты, такие как селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), обычно применяемые в качестве лечения первой линии [1]. Устойчивость к СИОЗС имеет комплексную природу, и серотониновая (5-HT) система, очевидно, играет здесь одну из важнейших ролей. Помимо таких ключевых компонентов

Принятые сокращения: 5-ГИУК — 5-гидроксииндолуксусная кислота; СИОЗС — селективные ингибиторы обратного захвата серотонина; ТПГ-2 — триптофангидроксилаза-2; ТРД — терапевтически резистентная депрессия; 5-HT — серотонин или гидрокситриптами́н (5-hydroxytryptamine); 5-HT_{1A} — серотониновый рецептор 1A-подтипа; 5-HT_{2A} — серотониновый рецептор 2A-подтипа.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равнозначный вклад в работу.

5-НТ системы, как триптофангидроксилаза-2 (ТПГ-2), транспортёр 5-НТ (5-НТТ) и моноаминоксидаза А (МАОА), в механизмы нечувствительности/устойчивости к СИОЗС также вовлечён серотониновый рецептор 1A-подтипа (5-НТ_{1A}) [2–4].

Серотониновые рецепторы 2A-подтипа (5-НТ_{2A}) представляют отдельный интерес, поскольку обладают свойствами, выделяющими их на фоне остальных 5-НТ рецепторов. Например, из-за локализации на различных типах нейронов 5-НТ_{2A}-рецепторы способны регулировать секрецию глутамата, дофамина и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [5, 6]. Локализованные во фронтальной коре 5-НТ_{2A}-рецепторы могут запускать механизм отрицательной обратной связи, ингибирующий секрецию 5-НТ серотонинергическими нейронами дорсального шва [7]. Было установлено, что 5-НТ_{2A}-рецепторы могут быть конститутивно активны и в таком состоянии активируют внутриклеточные сигнальные каскады в отсутствие стимулирующего лиганда [8]. Поскольку десенситизация 5-НТ_{2A}-рецепторов может осуществляться не только агонистами, но также и антагонистами, фармакологические свойства данных рецепторов резко отличаются от таковых у остальных подтипов [4, 9, 10]. Известно, что 5-НТ_{2A}-рецепторы образуют гетеромерные комплексы *in vivo* с 5-НТ_{2B}-, 5-НТ_{2C}- [11], дофаминовыми D2- [12] и mGlu2-рецепторами [13]. 5-НТ_{1A}- и 5-НТ_{2A}-рецепторы способны модулировать функциональную активность друг друга [14], поэтому существование гетеромерных комплексов между этими рецепторами [15, 16] представляет особый интерес. Во фронтальной коре активация 5-НТ_{2A}-протомера снижает аффинность 5-НТ_{1A}-рецептора к лиганду в гетеродимерах 5-НТ_{1A}–5-НТ_{2A}, что подчёркивает доминирующее положение 5-НТ_{2A}-рецепторов в подобных комплексах *in vivo* [15].

Растущее число свидетельств указывает на вовлечение 5-НТ_{2A}-рецепторов в патогенез ТРД. Недавний мета-анализ 42 исследований показал, что полиморфизмы 1438A/G и rs7997012G/A в гене *HTR2A* ассоциированы с ответом на антидепрессанты [17]. Ранее было показано, что плотность 5-НТ_{2A}-рецепторов ниже в дорсальной префронтальной коре пациентов с ТРД по сравнению со здоровыми субъектами и пациентами, не получавшими медикаментозного лечения [18]. С другой стороны, нейроны переднего мозга, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов, не отвечающих на СИОЗС, демонстрируют повышенную спай-

ковую активность в ответ на обработку 5-НТ, поскольку отличаются избыточной экспрессией 5-НТ_{2A}-рецепторов [19]. Кетансерин (селективный антагонист 5-НТ_{2A}-рецепторов) эффективно нормализует 5-НТ-индуцированную электрическую активность нейронов пациентов с ТРД [19].

Неудивительно, что 5-НТ_{2A}-рецепторы рассматриваются в качестве важной мишени для фармакотерапии депрессивных расстройств. Частью механизма действия СИОЗС является связывание с 5-НТ_{2A}-рецепторами и их блокада [20, 21]. Селективные антагонисты 5-НТ_{2A}-рецепторов, такие как M100907, нефазодон и метерголин, демонстрируют антидепрессант-подобный эффект путём подавления обратного захвата 5-НТ и модуляции секреции других нейротрансмиттеров в префронтальной коре [22–24]. В ряде открытых и плацебо-контролируемых испытаний было показано, что антидепрессанты и антипсихотические препараты, которые обладают способностью блокировать 5-НТ_{2A}-рецепторы, усиливают клиническую эффективность СИОЗС у пациентов с ТРД [21, 24–28].

Для того чтобы преодолеть ограничения, накладываемые клиническими испытаниями, для изучения нейробиологической основы ТРД и проверки новых терапевтических стратегий следует активно прибегать к доклиническим моделям депрессивных расстройств. Недавно нами была создана рекомбинантная линия мышей B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C), полученная путём переноса дистального фрагмента хромосомы 13 (102,73–118,83 Мпн) из генома мышей CBA на генетический бэкграунд линии C57BL/6J [29, 30]. Полученная линия характеризуется изменённой чувствительностью 5-НТ_{1A}-рецепторов в ответ на хроническое введение агониста рецептора 8-ОН-ДРАТ и большей транскрипцией гена *Htr1a* в гиппокампе [29]. Кроме того, мыши B6-M76C демонстрируют замедленный катаболизм 5-НТ в гиппокампе [29] и меньший объём стриатума, мозжечка и эпифиза [31]. Ранее нами было обнаружено, что хроническое введение СИОЗС флуоксетина вызывает у мышей B6-M76C про-депрессивный эффект в тесте «принудительное плавание» (forced swim test) [30]. Эти результаты вместе с данными о нарушенной функциональной активности 5-НТ_{1A}-рецепторов в мозге мышей B6-M76C предполагают использование данных животных в качестве модели устойчивости к антидепрессантам [30].

Для проверки идеи о том, что блокада 5-НТ_{2A}-рецептора может улучшить неблагоприятное действие СИОЗС в модели ТРД,

мы исследовали влияние хронического введения классического СИОЗС флуоксетина, селективного 5-HT_{2A}-антагониста кетансерина, одного или в комбинации с флуоксетином, на I) поведение в тестах «принудительное плавание», «открытое поле» и «тёмно-светлая камера»; II) обмен 5-HT и активность ТПГ-2; и III) уровни мРНК генов *Htr1a*, *Htr2a*, *Tph2*, *Maoa* и *Slc6a4* в гиппокампе, фронтальной коре и среднем мозге мышей В6-М76С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и препараты. В эксперименте были использованы взрослые самцы мышей В6-М76С (возраст 10–12 недель, вес 23–26 г). Мыши содержались в стандартных лабораторных условиях при естественном режиме свет/темнота (16 ч света и 8 ч темноты) со свободным доступом к воде и еде. В течение 14 дней мышам вводили флуоксетин («Biokom», Россия), кетансерин («Sigma-Aldrich», США) или их комбинацию. Препараты были растворены в физиологическом растворе и вводились внутривентриально (в.б.) в дозировке 20 мг/кг (флуоксетин; 9 мышей в группе), 0,5 мг/кг (кетансерин; 9 мышей в группе) или в комбинации 20 мг/кг флуоксетина + 0,5 мг/кг кетансерина (9 мышей в группе). Дозировка флуоксетина соответствует используемой в клинической практике и применялась нами в предыдущем исследовании [30]. Выбранная дозировка кетансерина, согласно литературным данным, достаточна для эффективной блокады 5-HT_{2A}-рецепторов [32], но вместе с тем при длительном введении позволяет избежать потенциальной гипотензии, которая может возникнуть при более высоких дозировках [33]. Контрольная группа (7 животных) получала инъекции физиологического раствора. За день до тестирования поведения животные были изолированы в индивидуальных клетках для предотвращения группового эффекта. Во избежание острых эффектов от введения препаратов поведенческие тесты, а также оценка функциональной активности 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторов проводились, начиная со следующего дня после последней инъекции. Образцы мозга данных животных были использованы для проведения ВЭЖХ. Используя ту же дозировку, временной интервал и условия содержания (изоляция в индивидуальные клетки после последней инъекции, хэндлинг для имитации экспериментальных процедур), мы осуществили хроническое введение флуоксетина (10 мышей в группе), кетансерина

(9 мышей в группе), их комбинации (8 мышей в группе) или физиологического раствора (9 мышей в группе) с целью получить образцы мозга для анализа мРНК.

Функциональная активность 5-HT_{1A}-рецепторов. Функциональную активность определяли по выраженности гипотермического ответа на острое введение селективного агониста 5-HT_{1A}-рецепторов 8-ОН-DPAT [34–36]. 8-ОН-DPAT («Sigma-Aldrich») был разведён в физиологическом растворе и введён в.б. в дозировке 1 мг/кг. Температуру тела измеряли до и через 20 мин после инъекции с помощью ректального датчика для мышей («Phymep», Франция), используя микрокомпьютер-термометр («Hanna Instruments», Сингапур). Степень выраженности гипотермического ответа выражали как разницу конечной и начальной температуры тела (Δt , °C).

Функциональная активность 5-HT_{2A}-рецепторов. Функциональную активность рецепторов определяли по завершении всех поведенческих тестов по числу встряхиваний головой (head twitches) в ответ на введение селективного 5-HT_{2A}-агониста 25CN-NBON [37, 38]. Препарат («Tocris Bioscience», Великобритания) был разведён в физиологическом растворе и введён в.б. в концентрации 1 мг/кг. Число встряхиваний головой подсчитывали в течение 20 мин, начиная через 5 мин после введения препарата.

Поведенческие тесты. Тест «открытое поле» (open field) проводили в открытой круглой арене (40 см в диаметре), окружённой стеной из белого пластика высотой 25 см и подсвеченной через матовый полупрозрачный пол двумя галогеновыми лампами 12 Вт каждая, расположенными в 40 см под дном арены [39]. Мышь помещали поблизости от стены арены, её перемещение регистрировалось в течение 5 мин цифровой камерой («Sony», Япония). После тестирования каждого животного арену тщательно отчищали. Видео анализировалось с помощью системы компьютерной регистрации EthoStudio [40]. Горизонтальная двигательная активность (общая пройденная дистанция), исследованная площадь и время в центре арены определялись автоматически.

Тест «тёмно-светлая камера» был выполнен с помощью пластиковой установки, описанной ранее [36]. Животное помещали в тёмный отсек установки головой по направлению к отверстию. Число переходов между тёмным и светлым отсеками и время нахождения в светлом отсеке оценивали в течение 5 мин с помощью программы EthoStudio. Установку тщательно отчищали после каждого теста.

В тесте «принудительное плавание» мышей помещали в стеклянный цилиндр (15 × 25 см), заполненный водой, температура которой была 25 °С. Подвижность животных оценивалась в течение 4 мин (после 2 мин адаптации) с помощью программы EthoStudio. Программа оценивала степень изменения силуэта животного, который определялся как изменение количества пикселей, связанных с животными, между двумя соседними кадрами [41].

Экстракция структур мозга. Мыши были декапитированы через 46–48 ч после тестирования поведения или через 5 дней после последней инъекции (в случае с забором материала для анализа мРНК). Мозг был извлечён в тот же день (12:00–14:00) на льду, целые средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора были выделены в соответствии с онлайн-атласом мышиного мозга (https://scalablebrainatlas.incf.org/mouse/ABA_v3), заморожены в жидком азоте и хранились при температуре –80 °С до процедур подготовки образцов к ВЭЖХ или выделения РНК.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Суммарная РНК была выделена с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя, обработана свободной от РНК ДНКазой («Promega», США) и разведена до концентрации 0,125 мг/мкл в стерильной воде. 1 мкг суммарной РНК брали для синтеза кДНК, смешивая её со случайными гексануклеотидами [42, 43]. Число копий кДНК генов, кодирующих субъединицу А ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*),

5-НТ_{1A}- и 5-НТ_{2A}-рецепторов, МАОА, ТПГ-2 и 5-НТТ, было оценено методом количественной ПЦР на приборе LightCycler 480 («Roche Applied Science», Германия) с использованием селективных праймеров (табл. 1), интеркалирующего красителя SYBER Green I (мастер-микс R-414, «Синтол», Россия) и геномной ДНК, полученной из печени самцов мышей C57BL/6, в качестве внешнего стандарта. Нами была использована серия разведений геномной ДНК с концентрацией 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 и 6400 копий на мкл. Негативный контроль ставили в тех же условиях, но без добавления образца. Экспрессию генов представляли как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям *Polr2a*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [42–44]. Анализ кривой плавления выполняли в конце каждого запуска для каждой пары праймеров, что позволило нам контролировать специфичность амплификации.

ВЭЖХ. Аликвота 50 мкл образца была смешана с 0,6 М НСlO₄ («Sigma-Aldrich»), содержащей 200 нг/мл изопротеренола («Sigma-Aldrich») в качестве внутреннего стандарта. Гомогенат центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 12 000 g до осаждения белка. Супернатанты разбавляли водой в 2 раза и фильтровали при помощи центрифужной пробирки с 0,22 мкм ацетатцеллюлозным фильтром («Spin-X», США). Осадок хранился при температуре –20 °С до определения концентрации белка по Брэдфорду. В петлю системы ВЭЖХ вносилось 20 мкл отфильтрованного супернатанта.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики использованных праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С	Длина продукта, п.н.
<i>Tph2</i>	F 5'-cattcctcgacacaattccagtcg-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	239
<i>Slc6a4</i>	F 5'-cgctctactacctcatctcctcc-3' R 5'-gtcctggcggaagtagtggtg-3'	63	101
<i>Maoo</i>	F 5'-aatgaggatgttaaatgggtagatgttggt-3' R 5'-cttgacatattcaactagacgctc-3'	61	138
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcggtgattgc-3'	62	200
<i>Htr2a</i>	F 5'-agaagccacctgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
<i>Polr2a</i>	F 5'-gttgctgggcagcagaatgtag-3' R 5'-tcaatgagacctctcgtcctcc-3'	61	188

Анализ уровней 5-НТ и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) был осуществлён с помощью ВЭЖХ-системы, содержащей в себе следующие компоненты: проточная ячейка из стеклоглассера (ячейка VT-03, 3 мм, GC sb; «Antec», Нидерланды), электрохимический детектор (700 мВ, DECADE ИТМ; «Antec»), блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20A, системный контроллер CBM-20A и дегазатор DGU-20A5R («Shimadzu Corporation», США). Хроматографическое разделение веществ производили изократическим элюированием на колонке C18 (размер частиц 5 мкм, L × ID 100 × 4,6 мм, Luna, «Phenomenex», США), защищённой предколонкой-картриджем C8 («Phenomenex») при скорости потока 1 мл/мин. Подвижная фаза представляла собой смесь из 50 мМ фосфатного буфера («Sigma-Aldrich»), метанола класса ВЭЖХ («Fisher Chemical», США) и 300 мкг/л натриевой соли октансульфоновой кислоты («Sigma-Aldrich»), pH 3,9. Температура колонки стабилизировалась при 40 °С. Концентрацию веществ выражали в нг/мг белка (определённого по методу Бредфорда).

Определение активности ТПГ-2. Активность ТПГ-2 была оценена в супернатанте гомогената среднего мозга. Из-за возможности деградации кофактора на свету реакцию проводили при слабом рассеянном освещении. Реакционная смесь общим объёмом 25 мкл содержала 0,05 М Tris-HCl буфера (pH 7,6), 0,001 М дитиотреитола («Sigma-Aldrich»), 15 мкл супернатанта, 0,3 мМ 6-метил-5,6,7,8-тетрагидроптеридина в качестве кофактора («Sigma-Aldrich»), 25 ед. каталазы («Sigma-Aldrich»), 0,5 мМ ингибитора декарбоксилазы m-гидроксибензилгидразина («Sigma-Aldrich») и 0,8 мМ L-триптофана («Sigma-Aldrich»). Смесь инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. После этого реакция была остановлена путём добавления 75 мкл 0,6 М HClO₄. Первый контроль был без пробы, во втором реакцию после инкубирования останавливали HClO₄, после чего смесь повторно ставили в термостат. После инкубации образцы центрифугировали в течение 15 мин при 14 000 g и температуре 4 °С до осаждения белка. Супернатант был собран и разведён в два раза водой MilliQ. Концентрацию 5-гидрокситриптофана (5-НТР) оценили с помощью ВЭЖХ, используя 5, 10 и 15 пмоль 5-НТР в качестве соответствующего внешнего стандарта. За единицу активности ТПГ-2 принимали количество фермента, синтезирующего 1 пмоль 5-НТР за 1 мин на мг белка (определённого по методу Бредфорда).

Статистический анализ. Данные представлены как $m \pm SEM$. Для идентификации и устранения экстремальных значений из выборки был использован Q-тест Диксона. После проверки распределения по Гауссу с помощью критерия нормальности Д'Агостино–Пирсона выборки сравнивались либо с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным сравнением по Фишеру, либо с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну (в случае ненормального распределения). Парные сравнения проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведенческие тесты. Хотя основной эффект введения препаратов на мобильность в тесте «принудительное плавание» был слаб ($F_{3,29} = 2,37$; $p = 0,09$), согласно однофакторному ANOVA, парное сравнение выявило значительно более низкую мобильность в группе, получавшей флуоксетин, по сравнению с контролем ($t = 2,17$; $p = 0,04$; рис. 1).

Все использованные препараты не оказали значимого эффекта на исследованную площадь

Физ. раствор Кетансерин
Флуоксетин Кетансерин + флуоксетин

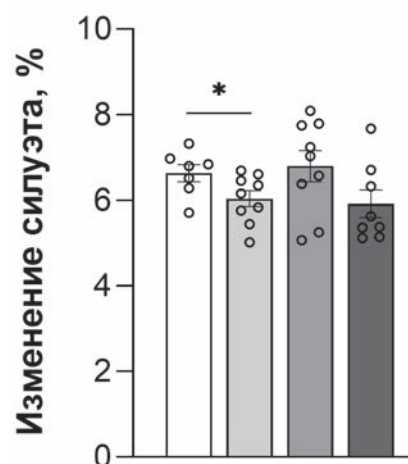


Рис. 1. Влияние хронического введения флуоксетина, кетансерина или их комбинации на мобильность (оцениваемую как скорость изменения силуэта животного) в тесте «принудительное плавание». Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0,05$ по сравнению с группой «физ. раствор» (*t*-критерий Стьюдента)

арены ($H = 1,79$; $p = 0,61$), пройденный путь ($F_{3,29} = 1,09$; $p = 0,36$), время в центре арены ($F_{3,29} = 0,38$; $p = 0,76$), число вертикальных стоек ($F_{3,29} = 0,22$; $p = 0,88$) и актов груминга ($H = 3,9$; $p = 0,26$) в тесте «открытое поле» (табл. 2).

В тесте «тёмно-светлая камера» отсутствовал эффект введения препаратов на время, проведённое в тёмном ($F_{3,29} = 1,36$; $p = 0,27$) и светлом ($F_{3,29} = 1,36$; $p = 0,27$) отсеках, число переходов между отсеками ($F_{3,29} = 1,65$; $p = 0,18$) и число выглядываний из тёмного отсека ($H = 1,79$; $p = 0,61$) (табл. 3). Таким образом, хотя двигательная активность, тревожность и исследовательское поведение не были затронуты введением препаратов, флуоксетин усилил депрессивно-подобное поведение у мышей В6-М76С.

Функциональная активность рецепторов. Все использованные препараты значительно сни-

зили гипотермический ответ на инъекцию агониста 5-НТ_{1A}-рецептора 8-ОН-ДРАТ ($F_{3,29} = 11,83$; $p < 0,001$), что говорит о десенситизации 5-НТ_{1A}-рецепторов (рис. 2, а). Нами отмечен значительный эффект введения препаратов на число встряхиваний головой ($F_{3,28} = 3,95$; $p = 0,01$). Тем не менее апостериорное сравнение показало, что число встряхиваний головой было ниже только в группе «кетансерин + флуоксетин» по сравнению с контролем (тенденция $p = 0,07$) и группой «кетансерин» ($p = 0,02$) (рис. 2, б).

Обмен 5-НТ и активность ТПГ-2. Значительный эффект введения препаратов на обмен 5-НТ был обнаружен только в гиппокампе ($F_{3,29} = 5,87$; $p = 0,002$; рис. 3, в). В соответствии с апостериорным сравнением соотношение 5-ГИУК/5-НТ было выше в группах «флуоксетин» ($p = 0,002$) и «кетансерин + флуоксетин» (сильная тенденция $p = 0,059$).

Таблица 2. Эффект хронического введения физиологического раствора, флуоксетина (20 мг/кг), кетансерина (0,5 мг/кг) или комбинации кетансерин + флуоксетин (0,5 и 20 мг/кг соответственно) на общую пройденную дистанцию, исследованную площадь, вертикальные стойки, акты груминга и пребывание в центре арены в тесте «открытое поле»

Препарат	Общая дистанция (м)	Время в центре (%)	Исследованная площадь арены (%)	Вертикальные стойки (число)	Акты груминга (число)
Физ. раствор	9,27 ± 1,29	13,91 ± 2,81	91,42 ± 4,69	7,29 ± 2,82	1,57 ± 0,53
Флуоксетин	10,35 ± 0,80	14,53 ± 2,37	95,76 ± 1,81	7,89 ± 1,36	1,00 ± 0,33
Кетансерин	10,82 ± 1,05	14,31 ± 2,16	96,87 ± 1,32	7,11 ± 1,16	1,89 ± 0,31
Кетансерин + флуоксетин	12,50 ± 1,72	11,22 ± 2,66	94,86 ± 1,64	8,87 ± 1,41	1,37 ± 0,18

Примечание. Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин» (однофакторный ANOVA и критерий Краскела–Уоллиса).

Таблица 3. Эффект хронического введения физиологического раствора, флуоксетина (20 мг/кг), кетансерина (0,5 мг/кг) или комбинации кетансерин + флуоксетин (0,5 и 20 мг/кг соответственно) на пройденный путь, время нахождения в светлом и тёмном отсеках, количество переходов между отсеками и число выглядываний из тёмного отсека в тесте «тёмно-светлая камера»

Препарат	Время в тёмном отсеке (%)	Время в светлом отсеке (%)	Переходы между отсеками (число)	Выглядывания из тёмного отсека (число)	Путь (м)
Физ. раствор	87,03 ± 3,19	12,97 ± 3,19	3,00 ± 0,65	1,28 ± 0,52	6,52 ± 0,61
Флуоксетин	77,80 ± 2,03	22,20 ± 2,03	4,66 ± 0,66	1,66 ± 0,28	6,50 ± 0,29
Кетансерин	80,59 ± 3,37	19,41 ± 3,37	4,33 ± 0,68	1,56 ± 0,63	6,95 ± 0,50
Кетансерин + флуоксетин	84,41 ± 4,79	15,59 ± 4,79	2,62 ± 1,03	1,50 ± 0,46	6,12 ± 0,71

Примечание. Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин» (однофакторный ANOVA и критерий Краскела–Уоллиса).

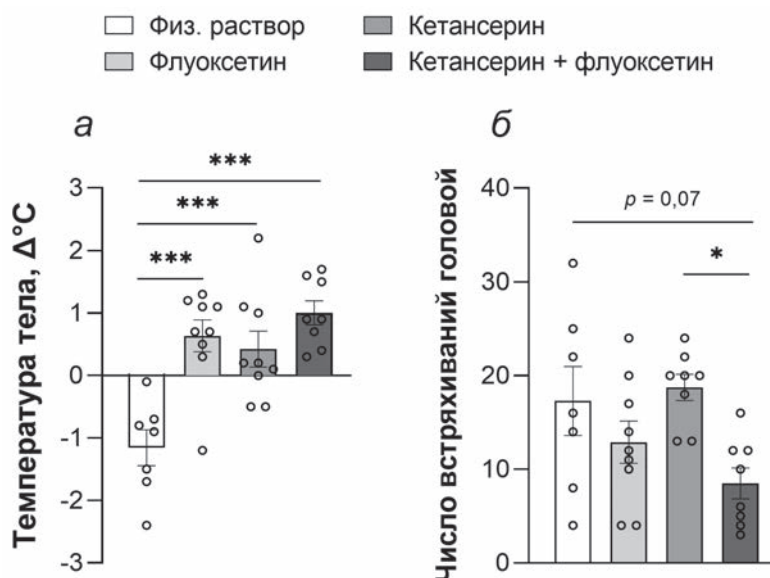


Рис. 2. Гипотермический ответ на острое введение агониста 5-HT_{1A}-рецепторов 8-ОН-DPAT (1 мг/кг) (а) и количество встряхиваний головой, вызванных инъекцией агониста 5-HT_{2A}-рецепторов 25CN-NBON (1 мг/кг) (б) у мышей В6-М76С, подвергавшихся хроническому введению флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин» (исключено одно экстремальное значение при анализе числа встряхиваний головой); $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин». Тенденция: $p = 0,07$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «физ. раствор»; * $p < 0,05$ по сравнению с группой «кетансерин» (однофакторный ANOVA)

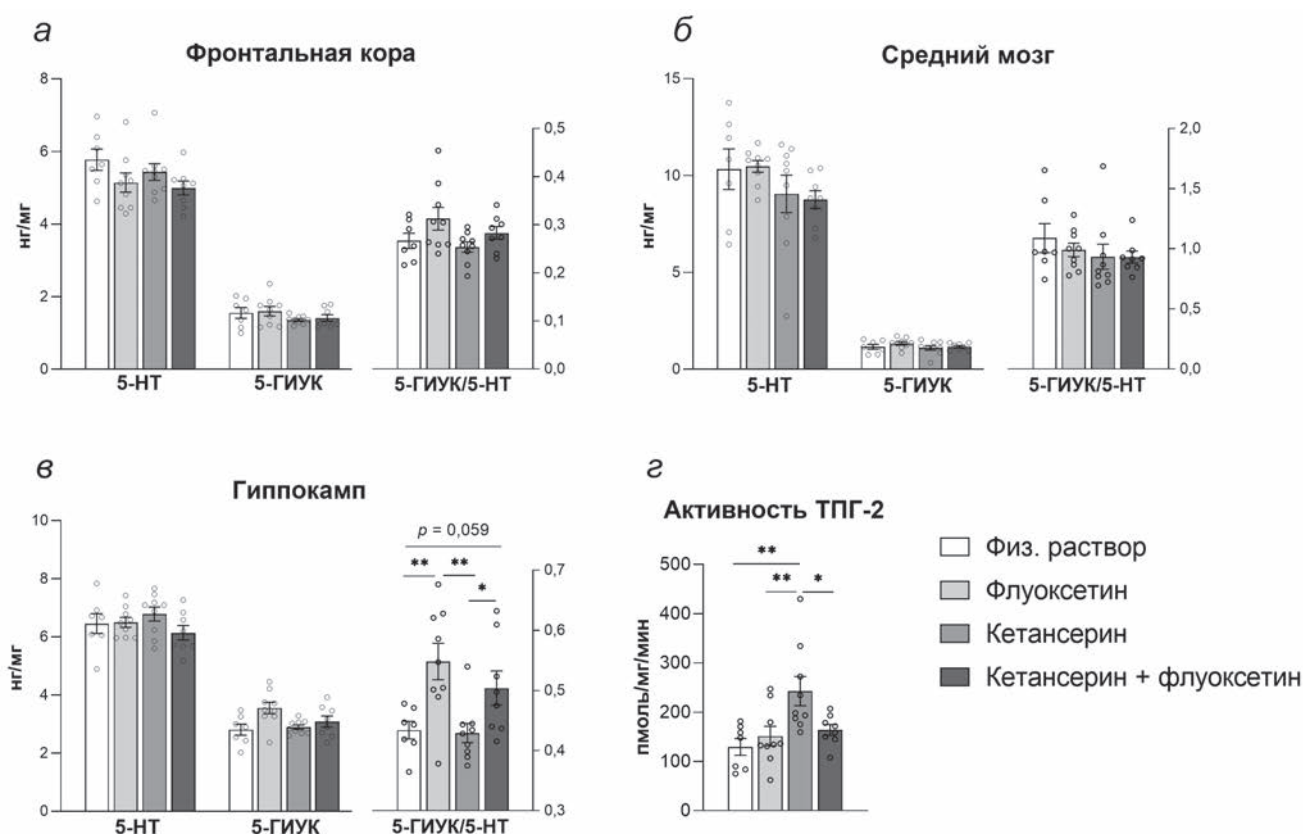


Рис. 3. Уровни 5-HT, 5-ГИУК и соотношение 5-ГИУК/5-HT во фронтальной коре (а), среднем мозге (б) и гиппокампе (в), а также активность ТПГ-2 (г) в среднем мозге мышей В6-М76С, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Уровни 5-HT и 5-ГИУК представлены в нг/мг, активность ТПГ-2 выражена в пмоль/мг/мин. Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 7$ для группы «физ. раствор»; $n = 9$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин»; $n = 8$ для группы «кетансерин + флуоксетин». Тенденция: $p = 0,059$; * $p < 0,05$ по сравнению с группой «кетансерин»; ** $p < 0,01$ по сравнению с группами «физ. раствор» или «кетансерин» (однофакторный ANOVA)

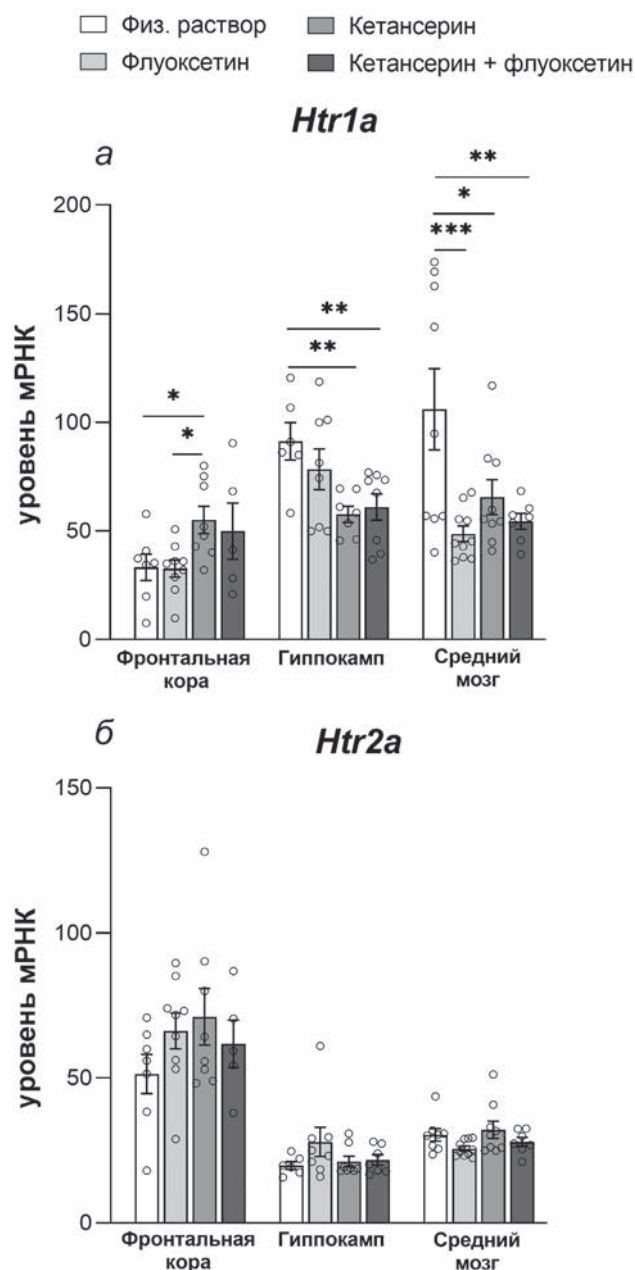


Рис. 4. Уровни мРНК *Htr1a* (а) и *Htr2a* (б) во фронтальной коре, гиппокампе и среднем мозге мышей В6-М76С, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина или их комбинации. Экспрессия представлена как число копий кДНК искомого гена, отнесенное на 100 копий кДНК *Polr2a*. Данные представлены как $m \pm SEM$; во фронтальной коре $n = 7$ для группы «физ. раствор», $n = 9$ для группы «флуоксетин», $n = 8$ для группы «кетансерин», $n = 5$ для группы «кетансерин + флуоксетин»; в гиппокампе $n = 6$ для группы «физ. раствор», $n = 8$ для группы «флуоксетин», $n = 8$ для группы «кетансерин» (исключено одно экстремальное значение в выборке *Htr1a*), $n = 7$ для группы «кетансерин + флуоксетин»; в среднем мозге $n = 9$ для группы «физ. раствор» (исключено одно экстремальное значение в выборке *Htr2a*), $n = 10$ для группы «флуоксетин», $n = 9$ для группы «кетансерин», $n = 7$ для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0,01$ по сравнению с группами «физ. раствор» или «кетансерин»; ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «физ. раствор» (однофакторный ANOVA)

Хотя в среднем мозге не выявлено значительных изменений в продукции и катаболизме 5-НТ, нами отмечен значительный эффект, оказанный препаратами на активность ключевого фермента синтеза 5-НТ в мозге – ТПГ-2 ($F_{3,29} = 5,407$; $p = 0,004$). Апостериорное сравнение показало, что активность ТПГ-2 была значительно выше в группе «кетансерин», чем в группах «физ. раствор» ($p = 0,001$), «флуоксетин» ($p = 0,003$) или «кетансерин + флуоксетин» ($p = 0,013$; рис. 3, з).

Уровни мРНК. Значительное воздействие препаратов на уровень мРНК гена *Htr1a* было обнаружено во фронтальной коре ($F_{3,25} = 3,04$; $p = 0,047$), гиппокампе ($F_{3,25} = 4,16$; $p = 0,016$) и среднем мозге ($F_{3,31} = 5,92$; $p = 0,002$; рис. 4, а). В среднем мозге все использованные препараты снизили уровень мРНК *Htr1a* ($p < 0,001$, $p = 0,011$ и $p < 0,003$ для флуоксетина, кетансерина и комбинации кетансерин + флуоксетин соответственно). В гиппокампе снижение уровня мРНК *Htr1a* было обнаружено только в группе «кетансерин» ($p = 0,005$) или «кетансерин + флуоксетин» ($p = 0,009$). С другой стороны, введение кетансерина привело к повышению уровня мРНК *Htr1a* во фронтальной коре ($p = 0,028$ по сравнению с группой «физ. раствор» и $p = 0,017$ по сравнению с группой «флуоксетин»). Нами не обнаружено какого-либо значимого эффекта введения препаратов на уровни мРНК гена *Htr2a* во всех исследованных структурах мозга ($F_{3,25} = 1,15$; $p = 0,34$; $F_{3,25} = 1,05$, $p = 0,38$ и $F_{3,29} = 2,28$; $p = 0,1$ для фронтальной коры, гиппокампа и среднего мозга соответственно; рис. 4, б).

В среднем мозге введение всех использованных препаратов повлияло на уровни мРНК генов *Slc6a4* и *Maoa* ($F_{3,30} = 5,29$; $p = 0,004$ и $F_{3,30} = 6,51$; $p = 0,001$ соответственно). Апостериорное сравнение показало, что введение всех препаратов снизило уровни мРНК *Slc6a4* ($p = 0,001$, $p = 0,003$ и $p = 0,008$ для групп «флуоксетин», «кетансерин» и «кетансерин + флуоксетин» соответственно; рис. 5, б). Сходным образом уровень мРНК *Maoa* был снижен при хроническом введении флуоксетина ($p < 0,001$), кетансерина ($p = 0,016$) или комбинации кетансерин + флуоксетин ($p = 0,008$; рис. 5, в). Не выявлено какого-либо значительного эффекта, оказанного на уровень мРНК гена *Trp2* ($F_{3,31} = 1,49$; $p = 0,23$; рис. 5, а).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы продемонстрировали, что хроническое введение флуоксетина сни-

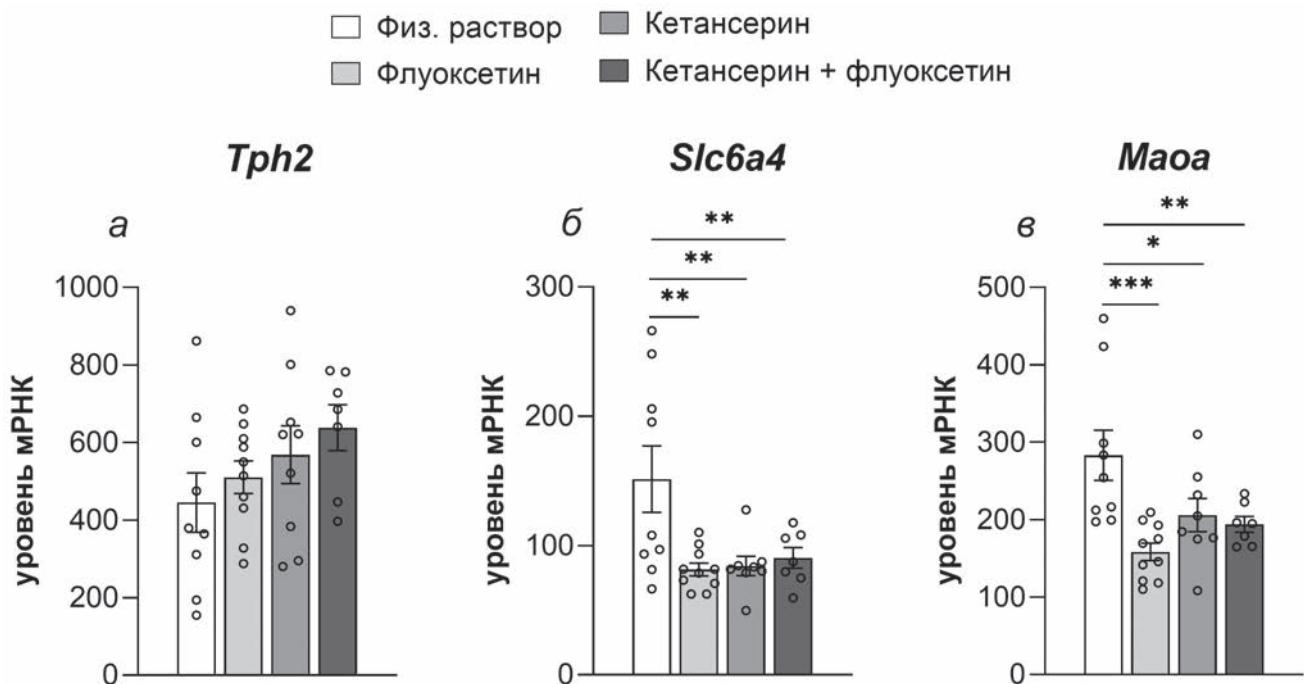


Рис. 5. Уровни мРНК генов *Tph2* (а), *Slc6a4* (б) и *Maoa* (в) в среднем мозге мышей В6-М76С, получавших хронические инъекции флуоксетина, кетансерина и их комбинации. Экспрессия представлена как число копий кДНК искомого гена, отнесенное на 100 копий кДНК *Polr2a*. Данные представлены как $m \pm SEM$; $n = 9$ для группы «физ. раствор»; $n = 10$ для группы «флуоксетин»; $n = 9$ для группы «кетансерин» (исключено по одному экстремальному значению в выборках *Slc6a4* и *Maoa*); $n = 7$ для группы «кетансерин + флуоксетин». * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с группой «физ. раствор» (однофакторный ANOVA)

жает мобильность в тесте «принудительное плавание», указывая на про-депрессивный эффект у мышей В6-М76С, что, в свою очередь, указывает на устойчивость мышей В6-М76С к действию СИОЗС и согласуется с нашими предыдущими наблюдениями [30]. Напротив, антидепрессантный эффект не был обнаружен у мышей, получавших кетансерин. В литературе имеется достаточно данных, свидетельствующих об антидепрессивных свойствах антагонистов 5-HT_{2A}-рецепторов [27, 45–47]. Конкретно для кетансерина антидепрессантный эффект обнаруживался как при остром [48], так и при хроническом введении [49, 50] в различных моделях депрессивно-подобного поведения. Однако антидепрессантный эффект в ответ на введение кетансерина не был обнаружен у мышей В6-М76С. Логично предположить, что наблюдаемое отсутствие антидепрессантного эффекта кетансерина, как и про-депрессивный эффект флуоксетина, могут быть объяснены аномальной активностью 5-HT_{1A}-рецепторов у мышей В6-М76С [29, 30].

Нами обнаружено, что функциональная активность 5-HT_{1A}-рецепторов одинаково снижалась после хронического введения флуоксетина, кетансерина или комбинации этих препаратов. Тем не менее в основе этого феномена могут лежать разные механизмы. Снижение

активности 5-HT_{1A}-рецепторов после хронического введения СИОЗС флуоксетина, вероятно, вызвано повышением концентрации 5-НТ в синаптической щели, который, действуя на рецепторы длительное время, индуцировал их десенситизацию. В основе эффекта кетансерина может лежать антагонизм 5-HT_{1A}- и 5-HT_{2A}-рецепторов. К примеру, ранее мы уже сообщали о значительном снижении гипотермического ответа у мышей после острого введения кетансерина [14]. 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}-антагонизм может быть следствием физического взаимодействия между данными рецепторами [15]. Так, в гетерорецепторных комплексах активация 5-HT_{2A}-рецептора значительно снижает связывание 5-HT_{1A}-рецептора с лигандом в гиппокампе и фронтальной коре, в то время как блокада 5-HT_{2A}-рецептора кетансерином восстанавливает их связывание [15]. Более того, нами выявлено существенное снижение уровня мРНК гена *Htr1a* в среднем мозге и гиппокампе, что указывает на подлинную даун-регуляцию 5-HT_{1A}-рецепторов.

Было выявлено значительное снижение функциональной активности 5-HT_{2A}-рецептора в ответ на хроническое введение флуоксетина в комбинации с кетансерином. Напротив, хроническое введение одного кетансерина не привело к изменениям функциональной

активности 5-HT_{2A}-рецепторов, что противоречит литературным данным, сообщающим о снижении плотности 5-HT_{2A}-рецепторов в ответ на хроническое введение антагонистов [9, 51]. Также нами не обнаружено признаков снижения уровня мРНК гена *Htr2a* ни в одной из исследованных структур, что не позволяет предполагать даун-регуляцию 5-HT_{2A}-рецепторов. Следует отметить, что связывание 5-HT_{2A}-рецептора с антагонистом не обязательно способствует интернализации рецептора, а может приводить лишь к его диссоциации с G-белком [9]. Мы также не можем исключить, что использованная дозировка кетансерина (0,5 мг/кг) была недостаточной для десенситизации 5-HT_{2A}-рецепторов. Например, значительная десенситизация рецептора с последующей даун-регуляцией при хроническом введении кетансерина была показана при использовании препарата в концентрации 10 мг/кг [51]. Когда кетансерин вводился вместе с флуоксетином, функциональная активность 5-HT_{2A}-рецепторов, вероятно, снижалась из-за аддитивного эффекта блокады рецепторов антагонистом и одновременной десенситизации из-за повышения количества 5-HT в синаптической щели. Это предположение соотносится со множеством данных, указывающих на снижение плотности 5-HT_{2A}-рецепторов при хроническом введении СИОЗС [9, 52].

Повышение соотношения 5-ГИУК/5-HT в гиппокампе мышей, подвергнутых хроническому введению флуоксетина или комбинации флуоксетина и кетансерина, указывает на усиление обмена 5-HT. В наших прежних работах отмечалось, что гиппокамп — одна из немногих структур мозга, в которых у мышей В6-М76С снижен катаболизм 5-HT [29, 30]. Локальное усиление катаболизма 5-HT в гиппокампе, обнаруженное в настоящем исследовании, может быть связано с даун-регуляцией постсинаптических 5-HT_{1A}-рецепторов, о чём можно судить по значительному снижению уровня мРНК. Этот результат хорошо согласуется с ранее высказанным предположением о том, что у мышей В6-М76С постсинаптические 5-HT_{1A}-рецепторы подвергаются более эффективной десенситизации [29]. Кроме того, в ряде работ указывается, что ингибирование не только пре-, но и постсинаптических 5-HT_{1A}-рецепторов приводит к усилению секреции 5-HT, что является следствием дезингибирования 5-HT нейронов [7, 53].

В нашем исследовании изменения в метаболизме 5-HT сопровождалось значительным снижением уровня мРНК генов, кодирующих

МАОА (фермент, разрушающий 5-HT до его основного метаболита, 5-ГИУК) и транспортер 5-HT (5-НТТ) в среднем мозге мышей всех экспериментальных групп. Хорошо известно, что через две недели введения флуоксетина экспрессия 5-НТТ в среднем мозге существенно снижается [54, 55], поскольку 5-НТТ является основной мишенью для СИОЗС. Снижение уровня мРНК гена *Maoo* в мозге в ответ на введение флуоксетина ранее было показано только в контексте пренатального введения СИОЗС [56]. В литературе отсутствуют упоминания о влиянии антагонистов 5-HT_{2A}-рецептора (включая кетансерин) на экспрессию 5-НТТ и МАОА в мозге. Таким образом, нами впервые показано, что хроническое введение кетансерина, одного или в комбинации с флуоксетином, снижает уровни мРНК генов *Slc6a4* и *Maoo* в среднем мозге мышей.

Кроме того, отмеченное нами повышение активности ТПГ-2 (ключевого фермента биосинтеза 5-HT в мозге) у мышей, получавших хронические инъекции кетансерина, согласуется с литературными данными, предполагающими, что введение антагонистов 5-HT_{2A}-рецептора (MDL 100907 либо ритансерина) оказывает влияние, противоположное ингибированию 5-HT нейронов, и восстанавливает их проводящую активность [57, 58]. Известно, что 5-HT_{2A}-рецепторы локализованы на ГАМК-интернейронах в ядрах дорсального шва и обуславливают локальную ингибирующую петлю отрицательной обратной связи [59]. Длительная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов у мышей В6-М76С могла привести к дезингибированию 5-HT нейронов. Возможно, данный эффект был достаточен для значительного усиления продукции и/или секреции нейротрансмиттера в гиппокампе. Ранее мы сообщали, что десенситизация 5-HT_{2A}-рецептора не только усиливает активность ТПГ-2, но также вызывает значительное увеличение концентрации 5-HT в среднем мозге [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные показывают, что хроническое введение кетансерина (как по отдельности, так и в комбинации с флуоксетином) даёт некоторые преимущества мышам линии В6-М76С: I) повышает активность ТПГ-2 и обмен 5-HT в гиппокампе, и II) снижает функциональную активность 5-HT_{1A}-рецептора и уровни мРНК *Htr1a*, *Slc6a4* и *Maoo*. Эти результаты согласуются с благотворными эффектами блокады 5-HT_{2A}-рецепторов при

лечении депрессивных расстройств. В то же время наши данные показывают, что у животных линии В6-М76С с нарушенной чувствительностью 5-HT_{1A}-рецепторов длительная блокада 5-HT_{2A}-рецепторов селективным антагонистом не позволяет достичь антидепрессантного эффекта ни при монотерапии, ни в комбинации с флуоксетином. Полученные данные позволяют предполагать, что нарушение экспрессии и/или чувствительности 5-HT_{1A}-рецепторов является важным фактором, который может не только значительно ухудшать терапевтический ответ при ТРД, но и создавать препятствия для любых попыток его коррекции.

Вклад авторов. Е.М. Кондаурова — концепция, проведение экспериментов, анализ результатов; Е.А. Заливина, В.О. Благина — проведение экспериментов; А.С. Цыбко — написание текста; В.С. Наumenko — редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00011).

Благодарности. Содержание животных было поддержано бюджетным проектом № FWNR-2022-0023. Разведение животных линии В6-М76С было осуществлено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), поддержанного Министерством науки и высшего образования России (уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все экспериментальные процедуры были проведены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных, восьмое издание, комиссия по обновлению Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных; Национальный Совет Исследователей, 2020, Национальная Академия Наук (США)) и одобрены этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (заключение № 34 от 15 июня 2016 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Papp, M., Cubala, W. J., Swiecicki, L., Newman-Tancredi, A., and Willner, P. (2022) Perspectives for therapy of treatment-resistant depression, *Br. J. Pharmacol.*, **179**, 4181-4200, doi: 10.1111/bph.15596.
2. Kulikov, A. V., Gainetdinov, R. R., Ponimaskin, E., Kalueff, A. V., Naumenko, V. S., and Popova, N. K. (2018) Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **22**, 319-330, doi: 10.1080/14728222.2018.1452912.
3. Vahid-Ansari, F., Zhang, M., Zahrai, A., and Albert, P. R. (2019) Overcoming resistance to selective serotonin reuptake inhibitors: targeting serotonin, serotonin-1A receptors and adult neuroplasticity, *Front. Neurosci.*, **13**, 404, doi: 10.3389/fnins.2019.00404.
4. Popova, N. K., Tsybko, A. S., and Naumenko, V. S. (2022) The implication of 5-HT receptor family members in aggression, depression and suicide: similarity and difference, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8814, doi: 10.3390/ijms23158814.
5. Alex, K. D., and Pehek, E. A. (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission, *Pharmacol. Ther.*, **113**, 296-320, doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.004.
6. Wyskiel, D. R., and Andrade, R. (2016) Serotonin excites hippocampal CA1 GABAergic interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum moleculare border, *Hippocampus*, **26**, 1107-1114, doi: 10.1002/hipo.22611.
7. Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., and Quérée, P. (2007) Important messages in the "post": recent discoveries in 5-HT neurone feedback control, *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 629-636, doi: 10.1016/j.tips.2007.10.009.
8. Berg, K. A., Harvey, J. A., Spampinato, U., and Clarke, W. P. (2008) Physiological and therapeutic relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors for the treatment of depression, *Prog. Brain Res.*, **172**, 287-305, doi: 10.1016/S0079-6123(08)00914-X.
9. Van Oekelen, D., Luyten, W. H. M. L., and Leysen, J. E. (2003) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties, *Life Sci.*, **72**, 2429-2449, doi: 10.1016/s0024-3205(03)00141-3.
10. Aloyo, V. J., Berg, K. A., Spampinato, U., Clarke, W. P., and Harvey, J. A. (2009) Current status of inverse agonism at serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors, *Pharmacol. Ther.*, **121**, 160-173, doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.10.010.
11. Moutkine, I., Quentin, E., Guiard, B. P., Maroteaux, L., and Doly, S. (2017) Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers, *J. Biol. Chem.*, **292**, 6352-6368, doi: 10.1074/jbc.M117.779041.

12. Lukasiewicz, S., Polit, A., Kędracka-Krok, S., Wędzony, K., Maćkowiak, M., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010) Hetero-dimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D(2) receptors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 1347-1358, doi: 10.1016/j.bbamer.2010.08.010.
13. Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuellar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., López-Giménez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., and González-Maeso, J. (2012) Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu₂) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function, *J. Biol. Chem.*, **287**, 44301-44319, doi: 10.1074/jbc.M112.413161.
14. Naumenko, V. S., Bazovkina, D. V., and Kondaurova, E. M. (2015) On the functional cross-talk between brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors [in Russian], *Zhurn. Vyssh. Nerv. Deyat. Im I. P. Pavlova*, **65**, 240-247.
15. Borroto-Escuela, D. O., Li, X., Tarakanov, A. O., Savelli, D., Narváez, M., Shumilov, K., Andrade-Talavera, Y., Jimenez-Beristain, A., Pomierny, B., Díaz-Cabiale, Z., Cuppini, R., Ambrogini, P., Lindskog, M., and Fuxe, K. (2017) Existence of brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} isoreceptor complexes with antagonistic allosteric receptor-receptor interactions regulating 5-HT_{1A} receptor recognition, *ACS Omega*, **2**, 4779-4789, doi: 10.1021/acsomega.7b00629.
16. Szlachta, M., Kuśmider, M., Pabian, P., Solich, J., Kolasa, M., Żurawek, D., Dziedzicka-Wasylewska, M., and Faron-Górecka, A. (2018) Repeated clozapine increases the level of serotonin 5-HT_{1A}R heterodimerization with 5-HT_{2A} or dopamine D(2) receptors in the mouse cortex, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 40, doi: 10.3389/fnmol.2018.00040.
17. Wan, Y.-S., Zhai, X.-J., Tan, H.-A., Ai, Y. S., and Zhao, L. B. (2021) Associations between the 1438A/G, 102T/C, and rs7997012G/A polymorphisms of HTR_{2A} and the safety and efficacy of antidepressants in depression: a meta-analysis, *Pharmacogenomics J.*, **21**, 200-215, doi: 10.1038/s41397-020-00197-2.
18. Baeken, C., De Raedt, R., and Bossuyt, A. (2012) Is treatment-resistance in unipolar melancholic depression characterized by decreased serotonin_{2A} receptors in the dorsal prefrontal – anterior cingulate cortex? *Neuropharmacology*, **62**, 340-346, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.043.
19. Vadodaria, K. C., Ji, Y., Skime, M., Paquola, A., Nelson, T., Hall-Flavin, D., Fredlender, C., Heard, K. J., Deng, Y., Le, A. T., Dave, S., Fung, L., Li, X., Marchetto, M. C., Weinshilboum, R., and Gage, F. H. (2019) Serotonin-induced hyperactivity in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons, *Mol. Psychiatry*, **24**, 795-807, doi: 10.1038/s41380-019-0363-y.
20. Leysen, J. E. (2004) 5-HT₂ receptors, *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, **3**, 11-26, doi: 10.2174/1568007043482598.
21. Celada, P., Puig, M., Amargós-Bosch, M., Adell, A., and Artigas, F. (2004) The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression, *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**, 252-265.
22. Marek, G. J., Martin-Ruiz, R., Abo, A., and Artigas, F. (2005) The selective 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine, *Neuropsychopharmacology*, **30**, 2205-2215, doi: 10.1038/sj.npp.1300762.
23. Pehek, E. A., Nocjar, C., Roth, B. L., Byrd, T. A., and Mabrouk, O. S. (2006) Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacology*, **31**, 265-277, doi: 10.1038/sj.npp.1300819.
24. Mestre, T. A., Zurowski, M., and Fox, S. H. (2013) 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **22**, 411-421, doi: 10.1517/13543784.2013.769957.
25. McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Woldeyohannes, H. O., Alsuwaidan, M., and Konarski, J. Z. (2007) A preclinical and clinical rationale for quetiapine in mood syndromes, *Expert Opin. Pharmacother.*, **8**, 1211-1219, doi: 10.1517/14656566.8.9.1211.
26. Sanford, M., and Keating, G. M. (2012) Quetiapine: a review of its use in the management of bipolar depression, *CNS Drugs*, **26**, 435-460, doi: 10.2165/11203840-000000000-00000.
27. Wright, B. M., Eiland, E. H. 3rd, and Lorenz, R. (2013) Augmentation with atypical antipsychotics for depression: a review of evidence-based support from the medical literature, *Pharmacotherapy*, **33**, 344-359, doi: 10.1002/phar.1204.
28. Miranda, A. S., de Moreira, F. A., and Teixeira, A. L. (2017) The preclinical discovery and development of quetiapine for the treatment of mania and depression, *Expert Opin. Drug Discov.*, **12**, 525-535, doi: 10.1080/17460441.2017.1304378.
29. Kulikova, E. A., Bazovkina, D. V., Akulov, A. E., Tsybko, A. S., Fursenko, D. V., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Ponimaskin, E., and Kondaurova, E. M. (2016) Alterations in pharmacological and behavioural responses in recombinant mouse line with an increased predisposition to catalepsy: role of the 5-HT_{1A} receptor, *Br. J. Pharmacol.*, **13**, 2147-2161, doi: 10.1111/bph.13484.
30. Kondaurova, E. M., Rodnyy, A. Y., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Eremin, D. V., Antonov, Y. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2020) Genetic background underlying 5-HT_{1A} receptor functioning affects the response to fluoxetine, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21228784.

31. Kulikova, E. A., Bazovkina, D. V., Antonov, Y. V., Akulov, A. E., Kulikov, A. V., and Kondaurova, E. M. (2017) Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy, *Neurosci. Res.*, **117**, 14-21, doi: 10.1016/j.neures.2016.11.009.
32. Hervig, M. E.-S., Jensen, N. C. H., Rasmussen, N. B., Rydbirk, R., Olesen, M. V., Hay-Schmidt, A., Pakkenberg, B., and Aznar, S. (2017) Involvement of serotonin 2A receptor activation in modulating medial prefrontal cortex and amygdala neuronal activation during novelty-exposure, *Behav. Brain Res.*, **326**, 1-12, doi: 10.1016/j.bbr.2017.02.050.
33. Balasubramaniam, G., Lee, H. S., and Mah, S. C. (1993) Differences in the acute and chronic anti-hypertensive mechanism of action of ketanserin in spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 129-134.
34. Hjorth, S. (1985) Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT, *J. Neural Transm.*, **61**, 131-135, doi: 10.1007/BF01253058.
35. O'Connell, M. T., and Curzon, G. (1996) A comparison of the effects of 8-OH-DPAT pretreatment of different behavioural responses to 8-OH-DPAT, *Eur. J. Pharmacol.*, **312**, 137-143, doi: 10.1016/0014-2999(96)00496-7.
36. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Cybko, A. S., and 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, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.044.
37. Buchborn, T., Lyons, T., and Knöpfel, T. (2018) Tolerance and tachyphylaxis to head twitches induced by the 5-HT_{2A} agonist 25CN-NBOH in mice, *Front. Pharmacol.*, **9**, 17, doi: 10.3389/fphar.2018.00017.
38. Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V., Filimonova, E. A., Eremin, D. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2020) The chronic treatment with 5-HT_{2A} receptor agonists affects the behavior and the BDNF system in mice, *Neurochem. Res.*, **12**, 3059-3075, doi: 10.1007/s11064-020-03153-5.
39. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., and Kulikov, V. A. (2008) Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 345-351, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.024.
40. Khot'skin, N. V., Plyusnina, A. V., Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Sorokin, I. E., Kolotygin, I., Mormede, P., Terenina, E. E., Shevelev, O. B., and Kulikov, A. V. (2019) On association of the lethal yellow (A(Y)) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior, *Behav. Brain Res.*, **359**, 446-456, doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.013.
41. Kulikov, A. V., Morozova, M. V., Kulikov, V. A., Kirichuk, V. S., and Popova, N. K. (2010) Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test, *J. Neurosci. Methods*, **191**, 26-31, doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.002.
42. Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., Voronova, I. P., Tikhonova, M. A., and 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, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.06.005.
43. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT_{1A} serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **40**, 30-36, doi: 10.1134/S0026893306010067.
44. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and 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, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
45. Carr, G. V., and Lucki, I. (2011) The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies, *Psychopharmacology*, **213**, 265-287, doi: 10.1007/s00213-010-2097-z.
46. Muguruza, C., Miranda-Azpiazu, P., Díez-Alarcia, R., Morentin, B., González-Maeso, J., Callado, L. F., and Meana, J. J. (2014) Evaluation of 5-HT_{2A} and mGlu2/3 receptors in postmortem prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder: effect of antidepressant treatment, *Neuropharmacology*, **86**, 311-318, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.009.
47. Guiard, B. P., and Di Giovanni, G. (2015) Central serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: the missing link? *Front. Pharmacol.*, **6**, 46, doi: 10.3389/fphar.2015.00046.
48. Rajkumar, R., Pandey, D. K., Mahesh, R., and Radha, R. (2009) 1-(m-Chlorophenyl)piperazine induces depressogenic-like behaviour in rodents by stimulating the neuronal 5-HT_{2A} receptors: proposal of a modified rodent antidepressant assay, *Eur. J. Pharmacol.*, **608**, 32-41, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.02.041.
49. Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., and Pazos, A. (2012) Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, β -catenin and antidepressant-like effects, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 1046-1057, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01516.x.
50. Pandey, D. K., Bhatt, S., Jindal, A., and Gautam, B. (2014) Effect of combination of ketanserin and escitalopram on behavioral anomalies after olfactory bulbectomy: prediction of quick onset of antidepressant action, *Indian J. Pharmacol.*, **46**, 639-643, doi: 10.4103/0253-7613.144935.
51. Yadav, P. N., Kroeze, W. K., Farrell, M. S., and Roth, B. L. (2011) Antagonist functional selectivity: 5-HT_{2A} serotonin receptor antagonists differentially regulate 5-HT_{2A} receptor protein level *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**, 99-105, doi: 10.1124/jpet.111.183780.

52. Yamauchi, M., Miyara, T., Matsushima, T., and Imanishi, T. (2006) Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors, *Brain Res.*, **1067**, 164-169, doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.075.
53. Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2013) 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system, *Rev. Neurosci.*, **24**, 191-204, doi: 10.1515/revneuro-2012-0082.
54. Dygalo, N. N., Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., Yudina, A. M., and Ovchinnikova, E. S. (2006) Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **85**, 220-227, doi: 10.1016/j.pbb.2006.08.004.
55. Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., and Dygalo, N. N. (2007) Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect, *Neuroscience*, **150**, 404-412, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.017.
56. Bond, C. M., Johnson, J. C., Chaudhary, V., McCarthy, E. M., McWhorter, M. L., and Woehrle, N. S. (2020) Perinatal fluoxetine exposure results in social deficits and reduced monoamine oxidase gene expression in mice, *Brain Res.*, **1727**, 146282, doi: 10.1016/j.brainres.2019.06.001.
57. Martín-Ruiz, R., Puig, M. V., Celada, P., Shapiro, D. A., Roth, B. L., Mengod, G., and Artigas, F. (2001) Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism, *J. Neurosci.*, **21**, 9856-9866, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09856.2001.
58. Boothman, L. J., Allers, K. A., Rasmussen, K., and Sharp, T. (2003) Evidence that central 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B/C} receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat, *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 998-1004, doi: 10.1038/sj.bjp.0705328.
59. Liu, R., Jolas, T., and Aghajanian, G. (2000) Serotonin 5-HT(2) receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus, *Brain Res.*, **873**, 34-45, doi: 10.1016/S0006-8993(00)02468-9.
60. Naumenko, V. S., Tsybko, A. S., Bazovkina, D. V., and Popova, N. K. (2012) Involvement of 5-HT_{2A} receptors in genetic mechanisms of autoregulation of brain 5-HT system, *Mol. Biol.*, **46**, 416-422, doi: 10.1134/S0026893312020100.

EFFECTS OF CHRONIC COMBINED TREATMENT WITH KETANSERIN AND FLUOXETINE IN B6.CBA-D13Mit76C RECOMBINANT MICE WITH ABNORMAL 5-HT_{1A} RECEPTOR FUNCTIONAL ACTIVITY

A. S. Tsybko^{**}, E. M. Kondaurova[#], E. V. Zalivina, V. O. Blaginya, and V. S. Naumenko

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: antoneybko@mail.ru

The recombinant B6.CBA-D13Mit76C mouse strain is characterized by altered sensitivity of 5-HT_{1A} receptors and greater *Htr1a* gene transcription. Recently, we found that in B6.CBA-D13Mit76C mice, chronic fluoxetine treatment produced pro-depressive effect in a forced swim test. Since 5-HT_{2A} receptor blockade may be beneficial in treatment-resistant depression, we investigated the influence of chronic treatment (14 days, intraperitoneally) with selective 5-HT_{2A} antagonist ketanserin (0.5 mg/kg), fluoxetine (20 mg/kg), or fluoxetine + ketanserin on the behavior, functional activity of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, serotonin turnover, and transcription of principal genes of the serotonin system in the brain of B6.CBA-D13Mit76C mice. Ketanserin did not reverse the pro-depressive effect of fluoxetine. Fluoxetine, ketanserin, and fluoxetine + ketanserin decreased functional activity of 5-HT_{1A} receptors and *Htr1a* gene transcription in the mid-brain and hippocampus. Additionally, all the tested drug regimens decreased mRNA levels of *Slc6a4* and *Maoa* in the midbrain. These changes were not accompanied by a significant shift in the levels of serotonin and its metabolite 5-HIAA. Notably, ketanserin upregulated enzymatic activity of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2). Thus, despite some benefits (reduced *Htr1a*, *Slc6a4*, and *Maoa* transcription and increased TPH2 activity), prolonged blockade of 5-HT_{2A} receptors failed to ameliorate the adverse effect of fluoxetine during abnormal functioning of 5-HT_{1A} receptors.

Keywords: 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, TPH2, fluoxetine, ketanserin, antidepressant resistance