

КЛЮЧЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗА 2 И МОНОАМИНОКСИДАЗА А В МОЗГЕ КРЫС, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ПО РЕАКЦИИ НА ЧЕЛОВЕКА: ВЛИЯНИЕ БЕНЗОПЕНТАТИЕПИНА ТС-2153

© 2024 В.С. Москалюк^{1*}, Р.В. Кожемякина¹, Т.М. Хоменко², К.П. Волчо²,
Н.Ф. Салахутдинов², А.В. Куликов¹, В.С. Науменко¹, Е.А. Куликова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; v.moskaliuk@alumni.nsu.ru

²Институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 23.01.2024

После доработки 25.03.2024

Принята к публикации 27.03.2024

В Институте цитологии и генетики СО РАН на протяжении более 85 поколений ведётся селекция серых крыс-пасюков на агрессивное поведение по отношению к человеку (агрессивные) или его отсутствие (ручные). Агрессивные крысы являются интересной моделью для исследования агрессии, вызванной страхом. Показано, что бензопентатиепин ТС-2153 снижает агрессию у агрессивных крыс и влияет на серотониновую систему, играющую существенную роль в регуляции агрессивного поведения. Целью данной работы было исследование влияния ТС-2153 на активность и экспрессию ключевых ферментов серотониновой системы – триптофангидроксилазы 2 (ТПГ2) и моноаминоксидазы А (МАОА) – в мозге агрессивных и ручных крыс. Агрессивным и ручным самцам серых крыс однократно внутрибрюшинно вводили ТС-2153 в дозировках 10 или 20 мг/кг или растворитель и исследовали уровни белков ТПГ2 и МАОА, их ферментативную активность, а также экспрессию генов, их кодирующих. У агрессивных крыс по сравнению с ручными наблюдался повышенный уровень экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге, а также повышение уровня белка ТПГ2 в гиппокампе и уровней белков ТПГ2 и МАОА в гипоталамусе. Ферментативная активность моноаминоксидазы (МАО) была выше в среднем мозге и гиппокампе крыс агрессивной линии, в то время как активность ТПГ2 между двумя генотипами не различалась. Однократное введение ТС-2153 снизило активность ТПГ2 в гипоталамусе и МАО в среднем мозге крыс обеих линий. ТС-2153 повлиял на уровень белка МАОА в гипоталамусе, повысив его у агрессивных и снизив у ручных крыс. Таким образом, в данной работе показаны существенные различия в экспрессии и активности ключевых ферментов серотониновой системы в мозге серых крыс, селекционируемых по реакции на человека, а влияние бензопентатиепина ТС-2153 на эти ферменты может указывать на механизмы антиагрессивного действия этого вещества.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: защитно-оборонительная агрессия, доместикация, моноаминоксидаза А, триптофангидроксилаза 2, серотонин, ТС-2153, крысы, мозг.

DOI: 10.31857/S0320972524060104 EDN: XLGLPH

ВВЕДЕНИЕ

Агрессивное поведение является важной эволюционной адаптацией, которая служит инструментом борьбы за ресурсы, территорию, половых партнёров. В регуляции агрессии участвуют многие гормоны и медиаторы, однако особая роль в механизмах данного поведения отводится

серотонину. Серотонин (5-гидрокситриптамиин, 5-НТ) является одним из важнейших медиаторов головного мозга. Серотониновые нейроны, тела которых находятся в ядрах шва среднего мозга, взаимодействуют почти со всеми отделами центральной нервной системы. Серотонин влияет на многие физиологические системы организма, настроение, ряд форм поведения [1].

Принятые сокращения: МАО – моноаминоксидаза; МАОА – моноаминоксидаза А; ТПГ2 – триптофангидроксилаза 2; ТС-2153 – гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амина.

* Адресат для корреспонденции.

Ключевыми ферментами серотониновой системы являются триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) (КФ 1.14.16.4, триптофан 5-монооксигеназа), которая катализирует лимитирующую стадию синтеза медиатора – присоединение ОН-группы в 5-м положении триптофана, и моноаминоксидаза А (МАОА) (КФ 1.4.3.4), которая окисляет его до 5-гидроксииндолуксусного альдегида. Известна связь этих ферментов с агрессивным поведением. Так, многочисленные исследования выявили положительную корреляцию межсамцовой агрессии с экспрессией и активностью ТПГ2 [2–6]. При изучении мышей десяти различных генотипов было показано, что животные с пониженной активностью ТПГ2 в мозге характеризовались менее выраженным проявлением межсамцовой агрессии [3]. Исследование полиморфизма, влияющего на активность ТПГ2, показало сцепление этого показателя с высокой интенсивностью межсамцовой агрессии [4]. Ингибитор ТПГ2 пара-хлорфенилаланин снижал интенсивность межсамцовой агрессии у мышей линии C57BL/6 [2]. В исследованиях на человеке наблюдалась схожая тенденция: снижение уровня агрессии у людей с малоактивными аллелями гена *TPH2* [7, 8]. Однако некоторыми исследователями была показана обратная корреляция между ТПГ2 и агрессией. Так, мыши с нокаутом по этому гену (*Tph2*^{-/-}) проявляли повышенную агрессию по сравнению с животными дикого типа в тесте резидент-интродер [9]. Более того, крысы с нокаутом по *Tph2* проявляли себя более агрессивно при социальных взаимодействиях [10].

Недостаток МАОА приводит к повышенной межсамцовой агрессии у мышей [11, 12]. Животные с генетическим нокаутом по гену *Maoa* более склонны к ответной агрессии, чаще вступают в драку и имеют меньший латентный период первой атаки [12, 13], а фармакологическое ингибирование данного фермента на пренатальной стадии у мышей и крыс приводит к повышенной склонности к агрессии во взрослом возрасте [14, 15]. У людей недостаток МАОА также вызывает повышенное проявление агрессивного поведения [16], а сниженная ферментативная активность МАОА ассоциирована с проявлением враждебности и злости [17] и агрессивными чертами [18].

Для изучения механизмов определённого типа поведения широко используются генетические селекционные модели животных. Одной из таких моделей, созданной для изучения агрессии, вызванной страхом, и доместикации, являются крысы, селекционируемые в Институте цитологии и генетики в Новосибирске. Отбор ведётся в двух направлениях: на высокий уровень агрессии по отношению к человеку (агрессивные крысы) и её полное отсутствие (ручные крысы). Полученные линии, помимо прочего, демонстрируют

различия в серотониновой системе: по общему уровню этого медиатора и его метаболита в мозге [19, 20], по экспрессии и активности серотониновых рецепторов [20–25], по экспрессии гена транспортера серотонина [26]. У агрессивных крыс по сравнению с ручными на 24-м поколении селекции наблюдалось снижение активности ТПГ2 в среднем мозге [20]. В то же время активность МАОА не различалась между двумя линиями 35–36 поколений [27].

На данной модели недавно было показано, что бензопентатиепин ТС-2153 снижал уровень агрессии у агрессивной линии крыс [28]. Также это вещество показало ряд других полезных эффектов на поведение, в частности анксиолитическое [28, 29], антикаталептическое [30] и антидепрессантное действия [31]. Более того, известно, что ТС-2153 влияет на серотониновую систему: как на общий уровень серотонина и его метаболита [32], так и на экспрессию и функциональную активность серотониновых рецепторов [22, 31, 33].

В то же время влияние ТС-2153 на экспрессию ТПГ2 и МАОА у агрессивных и ручных крыс ранее не было изучено. Более того, уровни данных белков и экспрессия генов, их кодирующих, не изучались у этих животных. Таким образом, целью этой работы было исследование влияния однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в мозге агрессивных и ручных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводили на самцах аутбредных линий серых крыс (*Rattus norvegicus*) возрастом 4–5 месяцев и весом 300–350 г, селекционированных на протяжении более 85 поколений в Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) на высокий уровень агрессии по отношению к человеку (агрессивные, 24 животных) или её полное отсутствие (ручные, 24 животных) [34, 35].

Животные содержались в группах по 4 особи в металлических клетках размером 50 × 33 × 20 см в стандартных лабораторных условиях со световым циклом «12 ч день, 12 ч ночь» и свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН (проект RFMEFI62119X0023).

Фармакологическое воздействие. В работе использовали вещество ТС-2153 (гидрохлорид 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин), синтезированное в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова

Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров, использованных в работе

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Т отжига, °С	Длина ампликона, п.н.
<i>Polr2a</i>	F: 5'-TTGTCGGGCAGCAGAACGTG-3' R: 5'-CAATGAGACSTTCTCGTCTCCC-3'	63	186
<i>Maoa</i>	F: 5'-GAAATTACCCACACSTTCTTAGAG-3' R: 5'-CACTTCTTTTACATGCGATG-3'	60	178
<i>Tph2</i>	F: 5'-CCCAGGCAGATGACCATTTCAG-3' R: 5'-GGAATTGTGTGAGGAATGTTGGC-3'	64	146

СО РАН (Новосибирск, Россия). Вещество разводили в 0,05%-ном Tween-20 (v/v), 0,05%-ном ДМСО (v/v) и 0,9%-ном NaCl (m/v) [31] и вводили однократно внутрибрюшинно (в/б) в объёме 100 мкл на 100 г веса животного в дозах 10 и 20 мг/кг.

Схема эксперимента. 24 агрессивных и 24 ручных крысы были разделены на три группы по 8 животных в каждой. Контрольным животным вводили растворитель. Две другие группы получали в/б вещество ТС-2153 в дозировках 10 мг/кг или 20 мг/кг. Через пять часов после инъекции растворителя или препарата животных выводили из эксперимента путём декапитации. Дозировки и время были выбраны согласно полученным ранее данным о влиянии ТС-2153 на поведение и серотониновую систему [29–33, 36]. Выделенные структуры мозга (средний мозг, гиппокамп и гипоталамус) замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80 °С до проведения молекулярных исследований.

Структуру мозга гомогенизировали в 300 мкл буфера Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) при 4 °С с помощью механического гомогенизатора (Z359971, «Sigma-Aldrich», США), аликвоты гомогената использовались для хроматографии и общего выделения РНК и белка.

Определение уровня экспрессии генов. Общую РНК выделяли из 60 мкл гомогената с помощью реагента TRIzol Reagent («Life Technologies», США) в соответствии с инструкцией производителя и ранее описанным протоколом [28]. С полученной общей РНК синтезировалась комплементарная ДНК (кДНК), измерение экспрессии генов проводилось путём детекции флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I (R-402 Master mix, «Syntol», Москва, Россия). Используемые праймеры представлены в таблице. В качестве внешнего стандарта использовалась геномная ДНК, выделенная из гепатоцитов самца крысы линии Wistar, концентрацией 0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 нг/мкл [37–39]. Экспрессия генов рассчитывалась как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*Polr2a*), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Определение количества белка с помощью Вестерн-блот анализа. Уровень белков ТПГ2 и МАОА определяли с помощью Вестерн-блот анализа по ранее описанной методике [28]. Белок разделяли с помощью SDS-PAGE гель-электрофореза (20 мкг белка на дорожку), используя 10%-ный разделяющий гель. Для детекции целевого белка были использованы поликлональные антитела кролика к белку ТПГ2 (1 : 1000, ab184505, «Abcam», Великобритания) и моноклональные антитела кролика к белку МАОА (1 : 500, ab126751, «Abcam»). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе, GAPDH (1 : 2000, ab9485, «Abcam»). Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию белка GAPDH. Белок ТПГ2 детектировали на 56 кДа, МАОА – на 60 кДа и GAPDH – на 37 кДа.

Определение активности моноаминоксидазы (МАО). Активность МАО определялась по ранее описанной методике [40] с помощью модульной системы хроматографического анализа («Shimadzu Corporation», США), оснащённой градиентным насосом (LC-20AD) с вакуумным дегазатором (DGU-20A5R), блоком для автоматизированного ввода пробы с петлёй объёмом 100 мкл (SIL-20A) и электрохимическим детектором (750 мВ, DECADE II, «Antec», Нидерланды). Концентрация субстрата (5-НТ) в реакционной смеси – 0,15 mM. Данная методика измеряет суммарную активность МАОА и МАОБ (моноаминоксидазы Б). Активность МАО рассчитывали как количество синтезированного 5-гидроксииндолуксусного альдегида (нмоль) за одну минуту, нормированное на количество общего белка в пробе, измеренное с помощью метода Бредфорда («Bio-Rad», США) и спектрофотометра Multiscan («Thermo Fisher Scientific», США).

Определение активности триптофангидроксилазы 2. Активность ТПГ2 определялась по ранее описанной методике [41] с помощью описанной выше модульной системы хроматографического анализа. Концентрация субстрата (L-триптофан) в реакционной смеси – 0,4 mM. Активность ТПГ2 рассчитывали как количество синтезированного 5-гидроксириптофана (пмоль) за одну минуту,

нормированное на количество общего белка в пробе.

Статистическая обработка данных. Измерения экспрессии генов, уровней белков и активности ферментов проверялись на нормальность распределения и равенство дисперсий с помощью тестов Лиллиефорса и Барлетта. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего и были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с независимыми факторами «генотип» и «препарат». При обнаружении значимого эффекта разница между группами была проанализирована с помощью *post hoc* анализа по Фишеру. Граница статистической значимости была установлена на уровне $p < 0,05$. Значительно отличающиеся от остальной выборки значения исключались после оценки методом Диксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность ТПГ2 *in vitro* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не показал различий между агрессивными и ручными крысами по активности ТПГ2 *in vitro* в среднем мозге ($F_{1,41} < 1$), гиппокампе ($F_{1,40} < 1$) и гипоталамусе ($F_{1,38} < 1$) (рис. 1). Нами было обнаружено влияние однократного введения ТС-2153 на этот показатель в гипоталамусе ($F_{2,38} = 5,38, p < 0,01$), но не в среднем мозге ($F_{2,41} = 2,05, p > 0,05$) и гиппокампе ($F_{2,40} = 2,1, p > 0,05$). Так, ТС-2153 снизил активность ТПГ2 в гипоталамусе как агрессивных, так и ручных крыс ($p < 0,05$). Эффекта взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» не наблюдалось ни в одной из исследованных нами структур (средний мозг: $F_{2,41} < 1$; гиппокамп: $F_{2,40} < 1$; гипоталамус: $F_{2,38} < 1$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на экспрессию гена *Trh2* в среднем мозге у агрессивных и ручных крыс. Исследование экспрессии гена *Trh2* в среднем мозге методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показало повышенный уровень мРНК данного гена у агрессивных крыс по сравнению с ручными (эффект генотипа: $F_{1,34} = 13,31, p < 0,001$). В то же время не было обнаружено влияния однократного введения ТС-2153 ($F_{2,34} < 1$) и взаимодействия факторов «препарат» и «генотип» ($F_{2,34} < 1$) на данный показатель (рис. 2).

Влияние однократного введения ТС-2153 на уровень белка ТПГ2 в мозге у агрессивных и ручных крыс. Значительный эффект влияния генотипа на уровень белка ТПГ2 наблюдался в гиппокампе ($F_{1,41} = 16,45, p < 0,001$) (рис. 3, б) и гипоталамусе ($F_{1,37} = 7,01, p < 0,05$) (рис. 3, в), но не в среднем мозге ($F_{1,35} = 1,55, p > 0,05$) (рис. 3, а). Уровень экспрессии этого белка был повышен в гиппокампе и гипоталамусе агрессивных крыс по сравнению с ручными. Ни в одной из исследованных структур не было обнаружено эффекта однократного введения ТС-2153 (средний мозг: $F_{2,35} = 1,26, p > 0,05$; гиппокамп: $F_{2,41} < 1$; гипоталамус: $F_{2,37} < 1$) и эффекта взаимодействия «генотипа» и «препарата» (средний мозг: $F_{2,35} < 1$; гиппокамп: $F_{2,41} = 1,68, p > 0,05$; гипоталамус: $F_{2,37} = 1,26, p > 0,05$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность МАО *in vitro* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Нами было обнаружено значительное повышение активности МАО в среднем мозге ($F_{1,41} = 11,73, p < 0,01$) (рис. 4, а) и гиппокампе ($F_{1,41} = 9,61, p < 0,01$) (рис. 4, б) агрессивных крыс по сравнению с ручными. В гипоталамусе не было выявлено межлинейных различий ($F_{1,42} = 3,15, p > 0,05$) (рис. 4, в). Более того, ТС-2153 оказал влияние на данный показатель в среднем мозге крыс ($F_{2,41} = 4,19, p < 0,05$), значительно снизив актив-

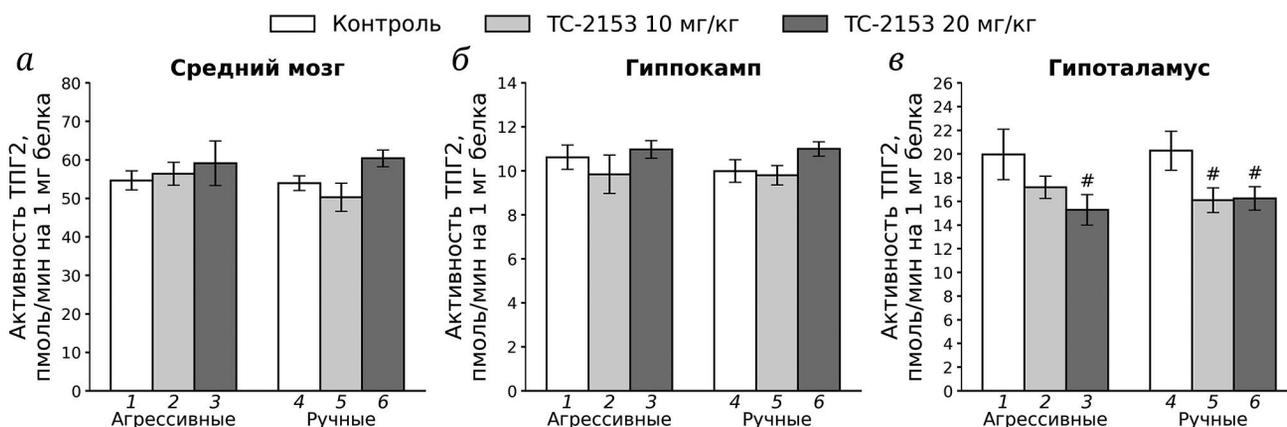


Рис. 1. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на активность ТПГ2 (пмоль/мин на 1 мг белка) *in vitro* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. # $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой (7–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

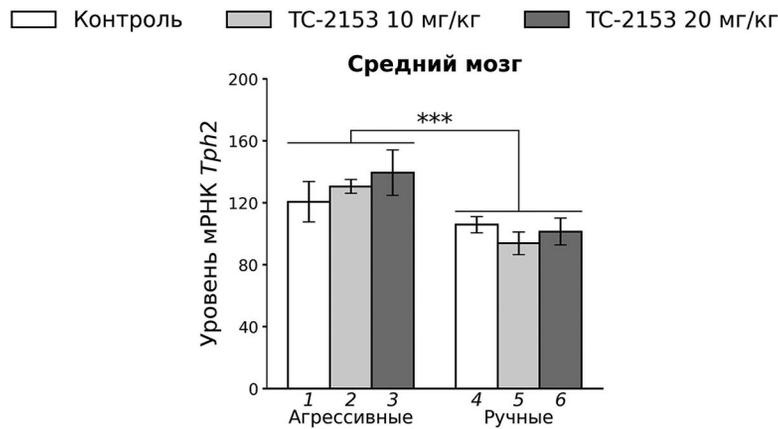


Рис. 2. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень мРНК гена *Trh2* в среднем мозге у агрессивных и ручных крыс. Уровень экспрессии рассчитывался как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*. *** $p < 0,001$ – эффект генотипа (6–7 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

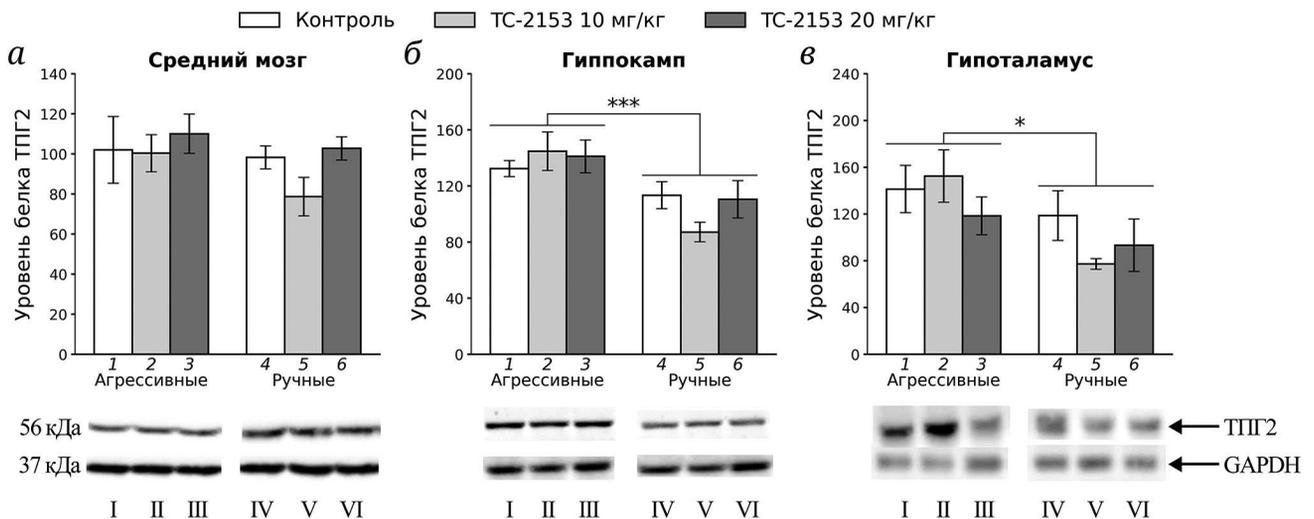


Рис. 3. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень белка ТПГ2 в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень белка представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – эффект генотипа (5–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг. Часть результатов иммуноблота на мембране, использованных для подсчёта уровня белка ТПГ2: I – агрессивные, контроль; II – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; III – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; IV – ручные, контроль; V – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; VI – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

ность MAO у ручных животных ($p < 0,05$), в то время как снижение её активности у агрессивных крыс не было статистически значимым ($p = 0,07$). В гиппокампе ($F_{2,41} < 1$) и гипоталамусе ($F_{2,42} = 1,24$, $p > 0,05$) дисперсионный анализ не показал влияния препарата. Также не наблюдалось значимого эффекта взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» (средний мозг: $F_{2,41} = 2,22$, $p > 0,05$; гиппокамп: $F_{2,41} < 1$; гипоталамус: $F_{2,42} = 1,97$, $p > 0,05$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на экспрессию гена *Maoa* в мозге у агрессивных и ручных крыс. Экспрессия гена *Maoa* не различа-

лась у агрессивных и ручных крыс ни в одной из исследованных структур (средний мозг: $F_{1,35} = 1,17$, $p > 0,05$; гиппокамп: $F_{1,31} < 1$; гипоталамус: $F_{1,34} < 1$) (рис. 5). Эффекта однократного введения ТС-2153 не было обнаружено ни в среднем мозге ($F_{2,35} = 1,72$, $p > 0,05$), ни в гиппокампе ($F_{2,31} = 1,54$, $p > 0,05$), ни в гипоталамусе ($F_{2,34} < 1$). Эффект взаимодействия факторов «генотип» и «препарат» также не был статистически значимым (средний мозг: $F_{2,35} < 1$; гиппокамп: $F_{2,31} < 1$; гипоталамус: $F_{2,34} < 1$).

Влияние однократного введения ТС-2153 на уровень белка MAOA в мозге у агрессивных

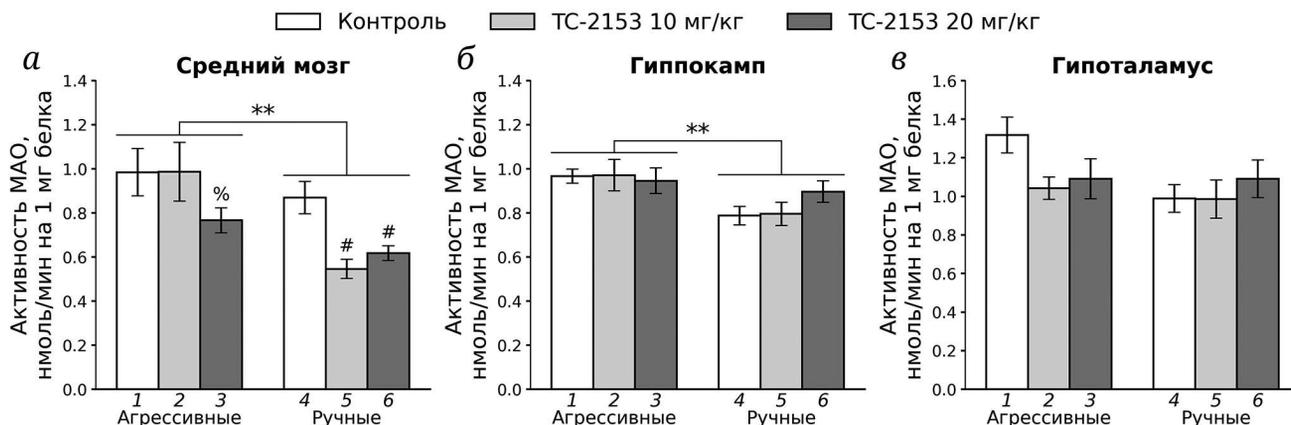


Рис. 4. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на активность МАО (нмоль/мин на 1 мг белка) *in vitro* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. ** $p < 0,01$ – эффект генотипа, # $p < 0,05$, % $p = 0,07$ в сравнении с контрольной группой (7–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

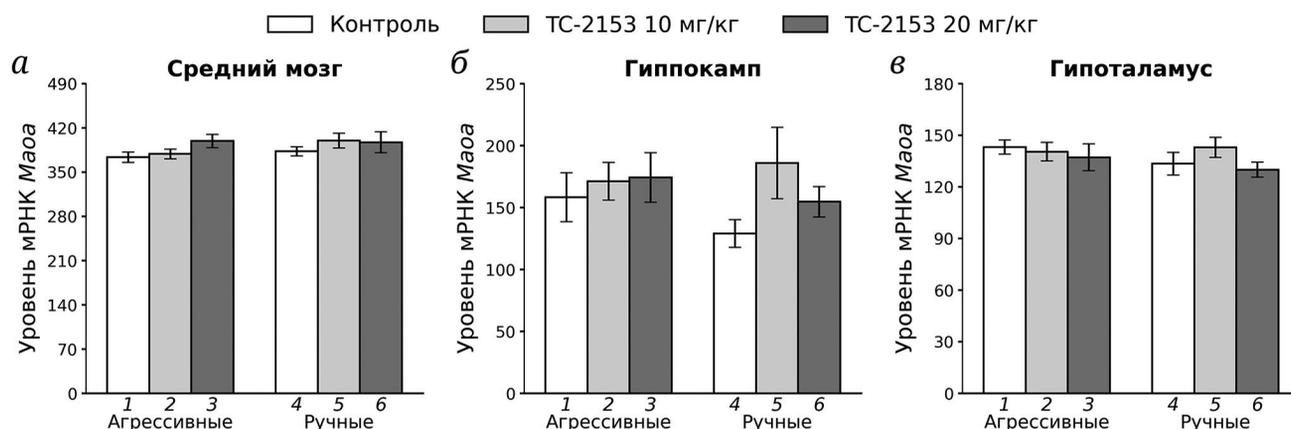


Рис. 5. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень мРНК гена *Maoa* в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень экспрессии рассчитывался как количество копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a* (5–7 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

и ручных крыс. Уровень белка МАОА был достоверно выше в гипоталамусе агрессивных крыс по сравнению с ручными ($F_{1,32} = 16,88$, $p < 0,001$) (рис. 6, в), в то время как в среднем мозге ($F_{1,32} = 3,21$, $p > 0,05$) (рис. 6, а) и гиппокампе ($F_{1,39} = 2,44$, $p > 0,05$) (рис. 6, б) эффект генотипа не был статистически значимым. Однократное введение ТС-2153 не повлияло на экспрессию данного белка (средний мозг: $F_{2,32} < 1$; гиппокамп: $F_{2,39} < 1$; гипоталамус: $F_{2,32} < 1$), также не было обнаружено эффекта взаимодействия генотипа и препарата в среднем мозге ($F_{2,32} < 1$) и гиппокампе ($F_{2,39} < 1$). В то же время значительный эффект взаимодействия этих факторов наблюдался в гипоталамусе агрессивных и ручных крыс ($F_{2,32} = 5,71$, $p < 0,01$): ТС-2153 снизил уровень белка МАОА в данной структуре у ручных животных ($p < 0,05$), а у агрессивных наблюдалась тенденция к его повышению ($p = 0,056$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существуют противоречивые данные относительно участия ТПГ2 в регуляции агрессивного поведения. Так, некоторыми исследователями была получена положительная корреляция между экспрессией и активностью ТПГ2 и этим типом поведения [2–6]. Однако нокаут гена *Tph2* приводил к повышению агрессии у мышей и крыс [9, 10]. Стоит отметить, что последствия нокаута какого-либо гена скорее отражают компенсаторные изменения, вызванные отсутствием его продукта, чем эффекты самого гена. В нашей работе мы показали, что экспрессия гена *Tph2* в среднем мозге агрессивных крыс была выше, чем у ручных. В то же время уровень белка ТПГ2 был повышен у агрессивных животных в гиппокампе и гипоталамусе, но не в среднем

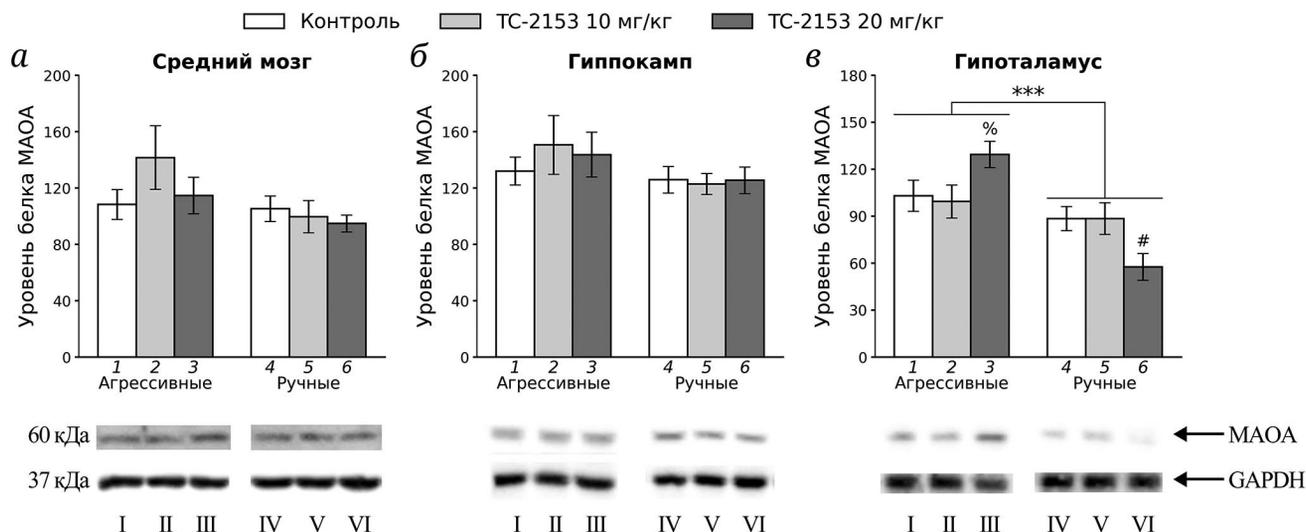


Рис. 6. Влияние однократного введения растворителя (контроль) и ТС-2153 в дозировках 10 и 20 мг/кг на уровень белка MAOA в среднем мозге (а), гиппокампе (б) и гипоталамусе (в) у агрессивных и ручных крыс. Уровень белка представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень белка GAPDH. *** $p < 0,001$ – эффект генотипа, # $p < 0,05$, % $p = 0,056$ в сравнении с контрольной группой (4–8 животных в группе). 1 – Агрессивные, контроль; 2 – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; 3 – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; 4 – ручные, контроль; 5 – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; 6 – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг. Часть результатов иммуноблота на мембране, использованных для обчёта уровня белка MAOA: I – агрессивные, контроль; II – агрессивные, ТС-2153: 10 мг/кг; III – агрессивные, ТС-2153: 20 мг/кг; IV – ручные, контроль; V – ручные, ТС-2153: 10 мг/кг; VI – ручные, ТС-2153: 20 мг/кг

мозге (рис. 7). Эти результаты согласуются с основными данными о положительной корреляции экспрессии ТПГ2 и агрессивного поведения. Известно, что тела серотониновых нейронов находятся в ядрах шва среднего мозга, откуда отдают проекции в другие отделы ЦНС. Фермент ТПГ2 производится в телах серотониновых нейронов в среднем мозге и с помощью аксонального транспорта доставляется в другие структуры мозга, где обеспечивает синтез серотонина в синаптических окончаниях. Таким образом, наблюдаемое в нашей работе увеличение уровня мРНК в среднем мозге, возможно, возникает в основном за счёт серотонинергических нейронов, посылающих проекции в гиппокамп и гипоталамус, где наблюдается повышение уровня белка. Ферментативная активность ТПГ2 не различалась между агрессивными и ручными крысами. Данные результаты расходятся с более ранними, полученными на крысах 24–27 поколений селекции, когда наблюдалось повышение активности этого фермента в среднем мозге ручных крыс по сравнению с агрессивными [20]. Наблюдаемое расхождение может объясняться результатом продолжающихся перестроек в серотониновой системе у этих линий крыс за прошедшие 30 лет отбора.

Известно, что снижение экспрессии основного фермента разрушения серотонина MAOA приводит к повышению агрессии [11–13, 16], однако в данной работе у агрессивных крыс мы обнаружили повышенный базальный уровень этого белка

в гипоталамусе по сравнению с ручными и повышенный уровень активности MAO в среднем мозге и гиппокампе (рис. 7). Возможно, наблюдаемое повышение уровня белка и ферментативной активности ассоциировано с этим специфическим типом агрессии. Так, ранее у ручных лисиц было показано снижение активности данного фермента в стволе мозга по сравнению с дикими [42], тогда как у агрессивных и ручных крыс 35–36 поколений селекции и диких серых крыс активность MAOA не различалась [27]. Интересно, что нами не было обнаружено различий между генотипами в уровне мРНК гена *Maoa* на фоне изменений в уровне белка. Более того, различия в уровне белка и ферментативной активности не совпадают по локализации. Это может указывать на различные пути воздействия на регуляцию MAOA в зависимости от структуры мозга.

Межлинейные различия по активности и экспрессии ТПГ2 и MAOA в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе Агрессивные по сравнению с ручными

	ТПГ2	MAOA
Активность		↑
Уровень мРНК	↑	
Уровень белка	↑	↑

Рис. 7. Межлинейные различия по активности и экспрессии ключевых ферментов серотониновой системы, ТПГ2 и MAOA, в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных и ручных крыс

Ранее мы обнаружили, что у агрессивных крыс наблюдается более низкая экспрессия 5-HT_{1A}-рецептора в среднем мозге [22], где он в основном экспрессируется пресинаптически, а его активация приводит к гиперполяризации серотонинергических нейронов и ингибированию серотониновой сигнализации (обзор см. в работе Altieri et al. [43]). С другой стороны, экспрессия 5-HT_{2A}-рецепторов, которые являются известными активаторами 5-HT-системы (обзор см. в работе Raote et al. [44]), была повышена в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных крыс [22]. Таким образом, на основе наблюдаемых паттернов экспрессии этих двух типов рецепторов и более ранних данных о повышенном уровне серотонина в поясной коре, прилежащем ядре и скорлупе агрессивных крыс [19] мы предположили, что данная линия характеризуется более активной 5-HT-системой по сравнению с ручными крысами. Этот вывод подтверждается представленными здесь данными о повышенной активности и экспрессии ТПГ2 и МАОА – основных ферментов синтеза и катаболизма серотонина – у агрессивных крыс.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что у агрессивных крыс по сравнению с ручными был повышен уровень белка внутриклеточной трансдукции стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP [28]. Этот белок играет существенную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Более того, на мышах было показано, что ингибирование активности ТПГ2 с помощью пара-хлорфенилаланина приводило к снижению уровня мРНК гена, кодирующего белок STEP в стриатуме [45], а в данной работе мы показали увеличение экспрессии ТПГ2 у агрессивных животных. Эти результаты могут свидетельствовать о связи этих двух ферментов. Возможно, что данное взаимодействие опосредовано нейротрофическим фактором мозга BDNF, ведь известно, что недостаток ТПГ2 при нокауте кодирующего её гена у мышей приводит к повышению экспрессии белка BDNF [46, 47], который, в свою очередь, негативно коррелирует с экспрессией STEP.

Бензопентатиепин ТС-2153 является ингибитором белка STEP [48] и оказывает влияние на серотонинергическую систему головного мозга [31–33]. Более того, нами было показано, что ТС-2153 снижал проявление агрессии и уровень белка STEP у агрессивных крыс, а также оказывал анксиолитический эффект как на агрессивных, так и на ручных животных [28].

В данной работе мы обнаружили, что однократное введение ТС-2153 не оказало эффекта ни на уровень мРНК гена *Trh2*, ни на количество белка ТПГ2. Ранее на мышах также не было обнаружено влияния хронического введения ТС-2153 на экспрессию гена *Trh2* в среднем мозге [33]. Однако

Влияние однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе

ТС-2153	Агрессивные	Ручные
Активность ТПГ2		
Активность МАО		
Уровень белка МАОА		

Рис. 8. Влияние однократного введения ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ2 и МАОА в среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе агрессивных и ручных крыс

ТС-2153 повлиял на активность ТПГ2 – снизил этот показатель в гипоталамусе как у агрессивных, так и у ручных крыс (рис. 8). В предварительных экспериментах *in vitro* было показано, что ТС-2153 в концентрациях 0,01 мМ и меньше – предположительные концентрации этого вещества в мозге крыс при используемых в этой работе дозировках – напрямую не влиял на активность ТПГ2, а, значит, это вещество оказывает своё действие опосредованно. Активность ТПГ2 регулируется кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II [49], активность которой зависит от концентрации кальция. Ранее мы показали, что ТС-2153 снижает активность серотониновых 5-HT_{2A}-рецепторов [31], чья активация сопровождается повышением внутриклеточной концентрации кальция, а антагонисты 5-HT_{2A}-рецепторов блокируют это повышение [50–52]. Таким образом, ТС-2153, снижая функциональную активность 5-HT_{2A}-рецепторов, может влиять на концентрацию кальция, что приводит к снижению активности ТПГ2.

Снижение активности этого фермента под действием ТС-2153 согласуется с антиагрессивным и анксиолитическим эффектами этого вещества [28]. Так как активность и экспрессия ТПГ2 положительно коррелируют с уровнем агрессии, логично, что снижение активности этого фермента сопровождается снижением выраженности агрессии. Однако действие ТС-2153 на активность ТПГ2 наблюдается как у агрессивных, так и ручных крыс, хотя антиагрессивное действие проявляется только у агрессивной линии. Ручные крысы характеризуются почти максимальным баллом дружелюбного поведения в тесте «перчатка», и, возможно, снижение активности ТПГ2 уже не приводит к видимым поведенческим эффектам в этом направлении. В то же время анксиолитическое действие ТС-2153 наблюдается у обеих линий крыс. Оно тоже может быть опосредовано снижением активности ТПГ2: многочисленные исследования показали также положительную корреляцию между ТПГ2 и тревожностью (обзор см. в работе Kulikova et al. [53]).

ТС-2153 также повлиял на ферментативную активность MAO (рис. 8). Введение ТС-2153 снизило активность этого фермента в среднем мозге агрессивных (на уровне тенденции) и ручных крыс. Известно, что ингибиторы MAO оказывают анксиолитический эффект [54–56]. Ранее нами было показано, что однократное введение ТС-2153 снизило тревожность у агрессивных и ручных крыс [28] в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Возможно, что наблюдаемое изменение поведения связано также с действием этого вещества на активность MAO в среднем мозге. Предварительные эксперименты показали, что ТС-2153 также не связывается напрямую с этим ферментом. Влияние данного вещества на активность MAO может быть опосредовано через митоген-активируемую протеинкиназу p38, которая фосфорилирует серин в 209-м положении и деактивирует MAOA [57]. Активность же p38 тоже регулируется фосфорилированием, и этот белок является одной из мишеней фосфатазы STEP [58]. При этом ТС-2153, ингибируя STEP, через p38 распространяет своё действие на активность MAOA.

В дополнение к этому ТС-2153 изменил уровень белка MAOA, снизив его в гипоталамусе ручных крыс, а в гипоталамусе агрессивных наблюдалась тенденция к его повышению. При этом влияния на экспрессию гена *Maoa* не было выявлено. Возможно, в данный временной промежуток (5 часов после инъекции) уровень мРНК уже пришёл в норму, и мы видим только изменения в уровне белка. Гипоталамус является важнейшим звеном гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и регулятором реакции организма на стрессовое воздействие. Агрессивные и ручные крысы различаются по базовому состоянию ГГНС и ответу на стресс [34, 35, 59]. В то же время пути регуляции экспрессии MAOA подвержены влиянию стресса и взаимосвязаны с ГГНС (обзор см. в работе Higuchi et al. [60]). Таким образом, межлинейные различия агрессивных и ручных крыс в ГГНС могут служить причиной разнонаправленного ответа на однократное введение ТС-2153 в гипоталамусе. В частности, известно, что транскрипционный фактор FoxO1 является репрессором гена *Maoa* [61]. Его активность, в свою очередь, регулируется киназами p38 и ERK1/2 [62] – субстратами стриатумспецифичной протеинтирозинфосфатазы STEP [58], которую блокирует ТС-2153. При этом эти две киназы оказывают противоположное действие на FoxO1: p38 активирует данный транскрипционный фактор, а ERK1/2 – деактивирует. Разнонаправленное действие ингибитора STEP бензопентатиепина ТС-2153 на уровень белка MAOA у агрессивных и ручных крыс может свидетельствовать о разном состоянии этих сигнальных путей у двух линий животных.

Таким образом, в данной работе мы обнаружили существенные различия в активности и экспрессии основных ферментов синтеза и катаболизма серотонина – ТПГ2 и MAOA – у крыс, селекционированных в течение более 85 поколений на выраженное агрессивное поведение по отношению к человеку или его отсутствие. Более того, мы показали, что у агрессивных и ручных крыс ингибитор белка STEP ТС-2153 снижает активность ТПГ2 и MAOA в гипоталамусе и среднем мозге соответственно и разнонаправленно влияет на уровень белка MAOA в гипоталамусе. Полученные в работе данные позволяют глубже понять вклад ключевых ферментов серотониновой системы в процессы, лежащие в основе агрессивного поведения, вызванного страхом, а также пути влияния вещества ТС-2153 на серотонинергическую систему мозга.

Вклад авторов. В.С. Москалюк – проведение экспериментов, анализ результатов, написание текста статьи; Р.В. Кожемякина – проведение экспериментов; Т.М. Хоменко, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов – разработка и синтез ТС-2153; А.В. Куликов – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; В.С. Науменко – редактирование текста статьи, общее руководство проектом; Е.А. Куликова – концепция, анализ результатов, редактирование текста статьи, общее руководство проектом.

Финансирование. Крысы содержались за счёт средств бюджетного проекта FWNR-2022-0010. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00028.

Благодарности. Исследование 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: RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты проводились согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации, утверждённым Министерством здравоохранения РФ (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 года), и в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health, «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», NIH Publications No. 80023, 1996) и были одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 99 от 09.11.2021). Нами были приложены все усилия, чтобы минимизировать количество животных, использованных в экспериментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carver, C. S., Johnson, S. L., and Joormann, J. (2009) Two-mode models of self-regulation as a tool for conceptualizing effects of the serotonin system in normal behavior and diverse disorders, *Curr. Dir. Physiol. Sci.*, **18**, 195-199, <https://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2009.01635.x>.
2. Kulikov, A. V., Osipova, D. V., Naumenko, V. S., Terenina, E., Mormède, P., and Popova, N. K. (2012) A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism, *Behav. Brain Res.*, **233**, 113-119, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.031>.
3. Kulikov, A. V., Osipova, D. V., and Naumenko, V. S. (2005) Association between *Tph2* gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains, *Genes Brain Behav.*, **4**, 482-485, <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00145.x>.
4. Osipova, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2009) C1473G polymorphism in mouse *tph2* gene is linked to tryptophan tydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test, *J. Neurosci. Res.*, **1174**, 1168-1174, <https://doi.org/10.1002/jnr.21928>.
5. Popova, N. K. (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system, *Bioessays*, **28**, 495-503, <https://doi.org/10.1002/bies.20412>.
6. Takahashi, A., Shiroishi, T., and Koide, T. (2014) Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes, *Front. Neurosci.*, **8**, 156, <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00156>.
7. Laas, K., Kiive, E., Mäestu, J., Vaht, M., and Veidebaum, T. (2017) Nice guys: homozygosity for the *TPH2*-703G/T (rs4570625) minor allele promotes low aggressiveness and low anxiety, *J. Affect. Disord.*, **215**, 230-236, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.03.045>.
8. Manuck, S. B., Flory, J. D., Ferrell, R. E., Dent, K. M., Mann, J. J., and Muldoon, M. F. (1999) Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene, *Biol. Psychiatry*, **45**, 603-614, [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00375-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00375-8).
9. Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., and Alenina, N. (2012) Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin, *Translat. Psychiatry*, **2**, e122-9, <https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>.
10. Meng, X., Grandjean, J., Sbrini, G., Schipper, P., Hofwijks, N., Stoop, J., Calabrese, F., and Homberg, J. (2022) Tryptophan hydroxylase 2 knockout male rats exhibit a strengthened oxytocin system, are aggressive, and are less anxious, *ACS Chem. Neurosci.*, **13**, 2974-2981, <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.2c00448>.
11. Godar, S. C., Fite, P. J., Mcfarlin, K. M., Bortolato, M., and Program, C. P. (2016) The role of monoamine oxidase A in aggression: current translational developments and future challenges, *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **69**, 90-100, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.01.001>.
12. Popova, N. K., Skrinskaya, Yu. A., Amstislavskaya, T. G., Vishnivetskaya, G. B., Seif, I., and De Meier, E. (2001) Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **31**, 597-602, <https://doi.org/10.1023/A:1012364910091>.
13. Scott, A. L., Bortolato, M., Chen, K., and Shih, J. C. (2008) Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation, *Neuroreport*, **19**, 739-743, <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282fd6e88>.
14. Mejia, J. M., Ervin, F. R., Baker, G. B., and Palmour, R. M. (2002) Monoamine oxidase inhibition during brain development induces pathological aggressive behavior in mice, *Biol. Psychiatry*, **52**, 811-821, [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(02\)01418-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01418-x).
15. Whitaker-Azmitia, P. M., Zhang, X., and Clarke, C. (1994) Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies, *Neuropsychopharmacology*, **11**, 125-132, <https://doi.org/10.1038/npp.1994.42>.
16. Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H., and van Oost, B. A. (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A, *Science*, **262**, 578-580, <https://doi.org/10.1126/science.8211186>.
17. Soliman, A., Bagby, R. M., Wilson, A. A., Miler, L., Clark, M., Rusjan, P., Sacher, J., Houle, S., and Meyer, J. H. (2011) Relationship of monoamine oxidase A binding to adaptive and maladaptive personality traits, *Psychol. Med.*, **41**, 1051-1060, <https://doi.org/10.1017/S0033291710001601>.
18. Alia-Klein, N., Goldstein, R. Z., Kriplani, A., Logan, J., Tomasi, D., Williams, B., Telang, F., Shumay, E., Biegon, A., Craig, I. W., Henn, F., Wang, G.-J., Volkow, N. D., and Fowler, J. S. (2008) Brain monoamine oxidase A activity predicts trait aggression, *J. Neurosci.*, **8**, 5099-5104, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0925-08.2008>.
19. Albert, F. W., Shchepina, O., Winter, C., Römpler, H., Teupser, D., Palme, R., Ceglarek, U., Kratzsch, J., Sohr, R., Trut, L. N., Thiery, J., Morgenstern, R., Plyusnina, I. Z., Schöneberg, T., and Pääbo, S. (2008) Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans, *Horm. Behav.*, **53**, 413-421, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.010>.

20. Popova, N. K., Kulikov, A. V., Nikulina, E. M., Kozlachkova, E. Y., and Maslova, G. B. (1991) Serotonin metabolism and 5-HT receptors in Norway rats selected for low aggressiveness to man, *Aggr. Behav.*, **17**, 207-213, [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1991\)17:4%3C207::AID-AB2480170403%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1991)17:4%3C207::AID-AB2480170403%3E3.0.CO;2-2).
21. Kondaurova, E. M., Ilchibaeva, T. V., Tsybko, A. S., Kozhemyakina, R. V., Popova, N. K., and Naumenko, V. S. (2016) 5-HT_{1A} receptor gene silencers Freud-1 and Freud-2 are differently expressed in the brain of rats with genetically determined high level of fear-induced aggression or its absence, *Behav. Brain Res.*, **310**, 20-25, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.04.050>.
22. Moskaliuk, V. S., Kozhemyakina, R. V., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., and Kulikova, E. A. (2023) On associations between fear-induced aggression, *Bdnf* transcripts, and serotonin receptors in the brains of Norway rats: an influence of antiaggressive drug TC-2153, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 983, <https://doi.org/10.3390/ijms24020983>.
23. Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., Plyusnina, I. F., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2013) Serotonin 5-HT_{1A} receptor in infancy-onset aggression: comparison with genetically defined aggression in adult rats, *Behav. Brain Res.*, **243**, 97-101, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.059>.
24. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., and Plyusnina, I. Z. (2009) Functional correlates of the brain 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors and expression of 5-HT_{2A} AND 5-HT_{2C} genes in aggressive and nonaggressive Norway rats [in Russian], *Russ. Fiziol. Zhurn. Im I M Sechenova*, **95**, 99-105.
25. Popova, N. K., Naumenko, V. S., Plyusnina, I. Z., and Kulikov, A. V. (2005) Reduction in 5-HT_{1A} receptor density, 5-HT_{1A} mRNA expression, and functional correlates for 5-HT_{1A} receptors in genetically defined aggressive rats, *J. Neurosci. Res.*, **80**, 286-292, <https://doi.org/10.1002/jnr.20456>.
26. Naumenko, V. S., Kozhemyakina, R. V., Plyusnina, I. Z., and Popova, N. K. (2009) Expression of serotonin transporter gene and startle response in rats with genetically determined fear-induced aggression, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **147**, 81-83, <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0441-2>.
27. Voitenko, N. N. (1993) Brain monoamine oxidase in aging wild Norway rats, chosen for lack of aggressive behavior toward humans [in Russian], *Vopr. Med. Khim.*, **39**, 28-30.
28. Moskaliuk, V. S., Kozhemyakina, R. V., Bazovkina, D. V., Terenina, E., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., Kulikov, A. V., Naumenko, V. S., and Kulikova, E. (2022) On an association between fear-induced aggression and striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in the brain of Norway rats, *Biomed. Pharmacother.*, **147**, 112667, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112667>.
29. Khomenko, T. M., Tolstikova, T. G., Bolkunov, A. V., Dolgikh, M. P., Pavlova, A. V., Korchagina, D. V., Volcho, K. P., and Salakhutdinov, N. F. (2009) 8-(Trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine: novel aminobenzopentathiepine having *in vivo* anticonvulsant and anxiolytic activities, *Lett. Drug Design Discov.*, **6**, 464-467, <https://doi.org/10.2174/157018009789057544>.
30. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Volcho, K. P., and Popova, N. K. (2012) A new synthetic varacin analogue, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), decreased hereditary catalepsy and increased the BDNF gene expression in the hippocampus in mice, *Psychopharmacology*, **221**, 469-478, <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2594-8>.
31. Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Illarionova, N. B., Sorokin, I. E., Bazhenova, E. Y., Kondaurova, E. M., and Volcho, K. P. (2018) Inhibitor of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), produces antidepressant-like effect and decreases functional activity and protein level of 5-HT_{2A} receptor in the brain, *Neuroscience*, **394**, 220-231, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.10.031>.
32. Kulikova, E. A., Bazhenova, E. Y., Popova, N. K., Khomenko, T. M., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., and Kulikov, A. V. (2015) Effect of acute administration of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153) on biogenic amines metabolism in mouse brain, *Lett. Drug Design Discov.*, **12**, 833-836.
33. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Khomenko, T. M., Korchagina, D. V., Volcho, K. P., Salakhutdinov, N. F., and Popova, N. K. (2011) Effect of new potential psychotropic drug, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride, on the expression of serotonin-related genes in mouse brain [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **45**, 282-288.
34. Naumenko, E. V., Popova, N. K., Nikulina, E. M., Dygalo, N. N., Shishkina, G. T., Borodin, P. M., and Markel, A. L. (1989) Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **33**, 85-91, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90434-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90434-6).
35. Plyusnina, I., and Oskina, I. (1997) Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans, *Physiol. Behav.*, **61**, 381-385, [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00445-3).
36. Kulikov, A. V., Tikhonova, M. A., Kulikova, E. A., Volcho, K. P., Khomenko, T. M., Salakhutdinov, N. F., and Popova, N. K. (2014) Antidepressant activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153): comparison with classical antidepressants, *Lett. Drug Des. Discov.*, **11**, 169-173.

37. 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, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.06.005>.
38. 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, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.01.008>.
39. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain [in Russian], *Mol Biol (Mosk)*, **40**, 37-44, <https://doi.org/10.1134/s0026893306010079>.
40. Evsiukova, V. S., Arefieva, A. B., Sorokin, I. E., and Kulikov, A. V. (2023) Age-related alterations in the level and metabolism of serotonin in the brain of males and females of annual turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*), *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3185, <https://doi.org/10.3390/ijms24043185>.
41. Komleva, P. D., Alhalabi, G., Izyurov, A. E., Khotskin, N. V., and Kulikov, A. V. (2023) Effects of the combination of the C1473G mutation in the *Tph2* gene and *lethal yellow* mutations in the *Raly-Agouti* locus on behavior, brain 5-HT and melanocortin systems in mice, *Biomolecules*, **13**, 963, <https://doi.org/10.3390/biom13060963>.
42. Popova, N. K., Voitenko, N. N., Kulikov, A. V., and Avgustinovich, D. F. (1991) Evidence for the involvement of central serotonin in mechanism of domestication of silver foxes, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **40**, 751-756, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90080-L](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90080-L).
43. Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., and Andrews, A. M. (2013) Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior, *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 72-83, <https://doi.org/10.1021/cn3002174>.
44. Raote, I., Bhattacharya, A., and Panicker, M. M. (2022) Serotonin 2A (5-HT_{2A}) Receptor Function: Ligand-Dependent Mechanisms and Pathways, in *Serotonin Receptors in Neurobiology* (Chattopadhyay, A., ed.), Frontiers in Neuroscience, Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis, Accessed: October 8, 2022.
45. Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., Bazhenova, E. Yu., and Kulikov, A. V. (2020) Pargyline and p-chlorophenylalanine decrease expression of Ptpn5 encoding striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in the mouse striatum, *Mol. Biol.*, **54**, 274-280, <https://doi.org/10.1134/S0026893320020090>.
46. Kronenberg, G., Mosienko, V., Gertz, K., Alenina, N., Hellweg, R., and Klempin, F. (2016) Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein concentrations in mice lacking brain serotonin, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **266**, 281-284, <https://doi.org/10.1007/s00406-015-0611-3>.
47. Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G., and Pasqualetti, M. (2013) Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation, *Mol. Psychiatry*, **18**, 1106-1118, <https://doi.org/10.1038/mp.2012.128>.
48. Xu, J., Chatterjee, M., Baguley, T. D., Brouillette, J., Kurup, P., Ghosh, D., Kanyo, J., Zhang, Y., Seyb, K., Ononenyi, C., Foscue, E., Anderson, G. M., Gresack, J., Cuny, G. D., Glicksman, M. A., Greengard, P., Lam, T. T., Tautz, L., Nairn, A. C., Ellman, J. A., and Lombroso, P. J. (2014) Inhibitor of the tyrosine phosphatase STEP reverses cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *PLoS Biol.*, **12**, e1001923, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001923>.
49. Kuhn, D. M., Sakowski, S. A., Geddes, T. J., Wilkerson, C., and Haycock, J. W. (2007) Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II, *J. Neurochem.*, **103**, 1567-1573, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04855.x>.
50. Hagberg, G.-B., Blomstrand, F., Nilsson, M., Tamir, H., and Hansson, E. (1998) Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca²⁺ channels, *Neurochem. Int.*, **32**, 153-162, [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00087-9).
51. Lin, O. A., Karim, Z. A., Vemana, H. P., Espinosa, E. V. P., and Khasawneh, F. T. (2014) The antidepressant 5-HT_{2A} receptor antagonists pizotifen and cyproheptadine inhibit serotonin-enhanced platelet function, *PLoS One*, **9**, e87026, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087026>.
52. Seitz, P. K., Bremer, N. M., McGinnis, A. G., Cunningham, K. A., and Watson, C. S. (2012) Quantitative changes in intracellular calcium and extracellular-regulated kinase activation measured in parallel in CHO cells stably expressing serotonin (5-HT) 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors, *BMC Neurosci.*, **13**, 25, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-25>.
53. Kulikova, E. A., and Kulikov, A. V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models, *Exp. Opin. Ther. Targets*, **23**, 655-667, <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1634691>.
54. Jaka, O., Iturria, I., van der Toorn, M., Hurtado de Mendoza, J., Latino, D. A. R. S., Alzualde, A., Peitsch, M. C., Hoeng, J., and Koshibu, K. (2021) Effects of natural monoamine oxidase inhibitors on anxiety-like behavior in zebrafish, *Front. Pharmacol.*, **12**, 669370, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.669370>.
55. Poltyrev, T., Gorodetsky, E., Bejar, C., Schorer-Apelbaum, D., and Weinstock, M. (2005) Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-

- pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats, *Psychopharmacology (Berl)*, **181**, 118-125, <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2229-z>.
56. Zisook, S. (1985) A clinical overview of monoamine oxidase inhibitors, *Psychosomatics*, **26**, 240-251, [https://doi.org/10.1016/S0033-3182\(85\)72877-0](https://doi.org/10.1016/S0033-3182(85)72877-0).
 57. Cao, X., Rui, L., Pennington, P. R., Chlan-Fourney, J., Jiang, Z., Wei, Z., Li, X.-M., Edmondson, D. E., and Mousseau, D. D. (2009) Serine 209 resides within a putative p38(MAPK) consensus motif and regulates monoamine oxidase-A activity, *J. Neurochem.*, **111**, 101-110, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06300.x>.
 58. Muñoz, J. J., Tárrega, C., Blanco-Aparicio, C., and Pulido, R. (2003) Differential interaction of the tyrosine phosphatases PTP-SL, STEP and HePTP with the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38alpha is determined by a kinase specificity sequence and influenced by reducing agents, *Biochem. J.*, **372**, 193-201, <https://doi.org/10.1042/BJ20021941>.
 59. Herbeck, Yu. E., Os'kina, I. N., Gulevich, R. G., and Plyusnina, I. Z. (2010) Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior, *Cytol. Genet.*, **44**, 108-113, <https://doi.org/10.3103/S0095452710020064>.
 60. Higuchi, Y., Soga, T., and Parhar, I. S. (2017) Regulatory pathways of monoamine oxidase A during social stress, *Front. Neurosci.*, **11**, 604, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00604>.
 61. Wu, J. B., and Shih, J. C. (2011) Valproic acid induces monoamine oxidase A via Akt/forkhead box O1 activation, *Mol. Pharmacol.*, **80**, 714-723, <https://doi.org/10.1124/mol.111.072744>.
 62. Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1, *Cell Signal.*, **19**, 519-527, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.015>.

KEY ENZYMES OF SEROTONERGIC SYSTEM TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 AND MONOAMINE OXIDASE A IN THE BRAIN OF RATS SELECTIVELY BRED FOR REACTION TOWARD HUMANS: EFFECTS OF BENZOPENTATHIEPIN TC-2153

**V. S. Moskaliuk^{1*}, R. V. Kozhemyakina¹, T. M. Khomenko², K. P. Volcho²,
N. F. Salakhutdinov², A. V. Kulikov¹, V. S. Naumenko¹, and E. A. Kulikova¹**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (SB RAS),
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: v.moskaliuk@alumni.nsu.ru*

² *N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia*

In the Institute of cytology and genetics (Novosibirsk) for over 85 generations takes place a selection of grey rats for high aggression toward humans (aggressive rats) or its complete absence (tame rats). Aggressive rats are an interesting model to study fear-induced aggression. Benzopentathiepin TC-2153 exerts an antiaggressive effect on aggressive rats and affects serotonergic system – an important regulator of aggression. The aim of this study was to investigate the TC-2153 effect on key serotonergic system enzymes – tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) and monoamine oxidase A (MAOA) – in the brain of aggressive and tame rats. TC-2153 (10 or 20 mg/kg) or vehicle were administered once i.p. to male aggressive and tame rats. TPH2 and MAOA enzymatic activity, mRNA and protein levels were assessed. Selection for high aggression level resulted in elevated *Tph2* mRNA levels in the midbrain, TPH2 protein in hippocampus and TPH2 and MAOA proteins in hypothalamus. MAOA activity was higher in the midbrain and hippocampus of aggressive rats while TPH2 activity did not differ between the strains. Single TC-2153 administration decreased TPH2 and MAOA activity in hypothalamus and midbrain respectively. The drug acted upon MAOA protein levels in hypothalamus: elevated that of aggressive rats and decreased in the tame ones. Thus, this study shows profound differences in the expression and activity of the key serotonergic system enzymes in the brain of rats selectively bred for highly aggressive behavior toward humans and its absence, and effects of benzopentathiepin TC-2153 on these enzymes may point to the mechanisms of its antiaggressive action.

Keywords: fear-induced aggression, domestication, monoamine oxidase A, tryptophan hydroxylase 2, serotonin, TC-2153, rats, brain