

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Сорокин Иван Евгеньевич

**ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ СВЕТОВОГО ДНЯ НА СЕРОТОНИНОВУЮ
СИСТЕМУ МОЗГА И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ И РЫБ ВИДА *DANIO*
*RERIO***

1.5.5-физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

А.В. Куликов

Новосибирск

2023

Список используемых сокращений	5
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы. Механизмы сезонного аффективного расстройства и роль 5-НТ системы мозга в механизмах сезонного аффективного расстройства.	
1.1. 5-НТ система мозга млекопитающих.....	13
1.1.1. Общая организация 5-НТ системы мозга млекопитающих.....	13
1.1.2. ТПГ1 и ТПГ2.....	16
1.1.3. Рецепторы 5-НТ.....	18
1.1.3.1. 5-НТ1А рецептор.....	19
1.1.3.2. 5-НТ2А рецептор.....	20
1.1.4. SERT.....	21
1.1.5. MAOA и MAOB.....	22
1.2. Сезонное аффективное расстройство (САР).....	23
1.2.1. Симптоматика и эпидемиология.....	23
1.2.2. Циркадные ритмы и САР.....	23
1.2.2.1. Фотопериодическая гипотеза.....	24
1.2.2.2. Гипотеза смещения фазы.....	25
1.3. 5-НТ система мозга и САР.....	25
1.4. Моделирование САР.....	28
1.5. Лабораторные рыбы вида <i>Danio rerio</i> как возможный объект изучения механизма САР и роли 5-НТ системы мозга в механизме САР.....	30
Глава 2. Материалы и методы	35
2.1. Животные.....	35
2.1.1. Мыши.....	35
2.1.2. Рыбы.....	37
2.2. Измерения суточной активности мышей в домашней клетке.....	39

2.3. Автоматическая трассировка мышей в стандартной батарее поведенческих тестов.	40
2.3.1. Тест «открытое поле»	40
2.3.2. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»	41
2.3.3. Тест «принудительное плавание».....	42
2.4. Измерение активности группы <i>D. rerio</i> в домашнем аквариуме	41
2.5. Тест "новый аквариум"	43
2.6. Измерение уровня и обмена 5-НТ в мозге.....	45
2.7. Определения активности ТПГ в головном мозге <i>D. rerio</i>	46
2.8. Определение активности MAO в мозге <i>D. rerio</i>	46
2.9. Определение белка по Брэдфорду	48
2.12. Выделение общей РНК.....	49
2.13. Синтез кДНК и количественная ПЦР реального времени	50
2.14. Статистика.....	51
Глава 3. Результаты исследований	52
3.1. Влияние мутации <i>C1473G</i> и длины светового дня на поведение и 5-НТ систему мозга мышей (Эксперимент 1).....	52
3.1.1. Влияние мутации <i>C1473G</i> и длины светового дня на суточную динамику активности, сна, суточное потребление пищи и воды в домашней клетке	52
3.3.2. Влияние мутации <i>C1473G</i> и длины светового дня на поведение в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»... ..	55
3.3.3. Влияние мутации <i>C1473G</i> и длины светового дня на поведение в тесте «принудительное плавание»	58
3.3.3. Влияние мутации <i>C1473G</i> и длины светового дня на уровень 5-НТ, 5-Н1АА и соотношение 5-Н1АА/5-НТ в мозге мышей.	59
3.2. Влияние пола и длины светового дня на рыб вида <i>D. rerio</i> (Эксперимент 2).....	62

3.2.1. Влияние длины светового дня на пол рыб.....	62
3.2.2. Влияние пола и длины светового дня на массу тела рыб	63
3.2.3. Влияние пола и длины светового дня на поведение рыб в тесте «новый аквариум».....	64
3.2.5. Влияние пола и длины светового дня на активности ТПГ и MAO в мозге рыб.....	68
3.2.6. Влияние пола и, длины светового дня на экспрессию генов <i>Tph1a</i> , <i>Tph1b</i> , <i>Tph2</i> , <i>Maο</i> , <i>Slc6a4</i> , <i>Htr1aa</i> , <i>Htr2aa</i> в мозге рыб.....	69
3.3. Влияние длины светового дня и pCPA на рыб вида <i>D.rerio</i> (Эксперимент 3).....	70
3.3.1. Влияние длины светового дня и pCPA на пол рыб.....	70
3.3.2. Влияние длины светового дня и pCPA на массу тела рыб	70
3.5.3. Влияние длины светового дня и pCPA на активность рыб в домашнем аквариуме.	71
3.3.4. Влияние длины светового дня и pCPA на поведение рыб в тесте «новый аквариум».....	74
3.3.5. Уровень pCPA в мозге рыб	75
3.3.7. Влияние длины светового дня и pCPA на экспрессию генов <i>Tph1a</i> , <i>Tph1b</i> , <i>Tph2</i> , <i>Maο</i> , <i>Htr1aa</i> , <i>Htr2aa</i> в мозге рыб	76
Глава 4. Обсуждение результатов	78
Заключение.....	94
Выводы	97
Список литературы	98

Список используемых сокращений

12L:12D, 14L:10D, 4L:20D — режимы суточного освещения с 12, 14 и 4 часами света (L) и 12, 10 и 20 часами темноты (D)

C57BL/6 — линия мышей (Black6)

B6-1473C\G — конгенные линии мышей с высокой и низкой активностью ТПГ2

C1473G — полиморфизм в гене *Tph2*, вызывающий снижение активности фермента триптофангидроксилазы 2 в мозге мышей

5-НТ --- 5-гидрокситриптамин / серотонин

5-НИАА — 5-гидроксииндолуксусная кислота

5-НТ₁₋₇ (Htr1-7) — белки (гены) рецепторов серотонина 1-7

5-НИАА/5-НТ — относительный показатель обмена серотонина

МАО (*Mao*) — фермент (ген) моноаминоксидаза

5-НТТ (SERT) — белок-транспортер серотонина

Slc6a4 — ген, кодирующий SERT

pCFA — пара-хлорфенилаланин

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

САР — сезонное аффективное расстройство

ТПГ (*Tph*) — фермент (ген) триптофангидроксилаза

Введение

Актуальность проблемы. Освоение северных территорий сопряжено с присутствием человека в дискомфортных условиях среды, поэтому уровень здоровья населения следует рассматривать как один из важных лимитирующих факторов (Сидоров, Гудков, 2004; Levitan, 2007). Продолжающийся отток населения и пока еще существующий отрицательный естественный прирост на северных территориях остро ставит вопросы сохранения человеческого потенциала. Поэтому пристального внимания требуют проблемы упреждающей и текущей профилактики, а также ранней диагностики и лечения заболеваний у северян (Levitan, 2007). Современные исследования демонстрируют, что некоренное население, проживающее в условиях особого фотопериодизма высоких широта, подвержено ускоренному старению и развитию ассоциированных с возрастом заболеваний, что требует дальнейшего изучения в силу важности данного вопроса (Хананашвили, 2000; Ушкалова, 2006; Patten, 2017).

Сезонное аффективное расстройство (САР) характеризуется рецидивирующей депрессией, происходящей обычно в осенний и зимний периоды. Особенностью САР является наличие таких клинических признаков, как гиперсомния (у 70-90% пациентов), увеличенный аппетит (у 70-80%) и стремление к употреблению углеводистой пищи, преимущественно сладкой (у 80-90%) и увеличение массы тела (у 70-80%) (Levitan, 2007). САР снижает трудоспособность и качество жизни человека и впервые возникает у лиц в возрасте после 15 лет до 55 лет (средний возраст – около 23 лет), причём вероятность развития синдрома с возрастом уменьшаются. Большему риску возникновения заболевания подвержены женщины, чем мужчины (приблизительно в 4 раза; Wirz-Justice et al., 2019).

САР является одним из ключевых факторов, препятствующих освоению северных районов. Современные исследования демонстрируют, что

некоренное население, проживающее в условиях особого фотопериодизма высоких широт, подвержено САР, ускоренному старению и развитию ассоциированных с возрастом заболеваний. Таким образом, изучение механизмов возникновения САР, прогнозирование рисков и эффективное лечение этого заболевания является актуальной задачей современной физиологии и медицины.

Многочисленные свидетельства указывают на связь САР с нарушением функции серотониновой системы мозга (5-НТ) (Molnar et al., 2010; Gupta et al., 2014; Kulikov, Popova, 2015; Harrison et al., 2015; Tyrer et al., 2016a,b; Nørgaard et al., 2017; McMahon et al., 2018; Levitan et al., 2020). Однако данные о лечении САР с помощью препаратов, влияющих на 5-НТ систему, довольно противоречивы (Kulikov, Popova, 2015). Поэтому понимание роли 5-НТ в механизме САР необходимо для эффективной терапии данного заболевания.

Ключевым ферментом синтеза 5-НТ в головном мозге млекопитающих является триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) (Walther et al., 2003; Walther, Baden, 2003). Ген, кодирующий ТПГ2, рассматривается как вероятный ген-кандидат, мутации в котором могут увеличивать риск депрессивных расстройств (Ottenhof et al., 2018; Popova, Kulikov, 2010; Kulikov, Popova, 2015; Kulikova, Kulikov, 2019). В то же время, роль ТПГ2 в механизме САР изучена не была. Остается неясным также вопрос о связи мутаций в гене *Tph2* с риском САР.

Исследования участия 5-НТ системы в механизме САР на людях ограничены ассоциациями риска заболевания с молекулярными маркерами генов, кодирующих ферменты метаболизма, транспортер и рецепторы 5-НТ, томографией а также результатами терапии САР агонистами/антагонистами 5-НТ (Molnar et al., 2010; Kulikov, Popova, 2015; Harrison et al., 2015; Tyrer et al., 2016a,b; Nørgaard et al., 2017; McMahon et al., 2018). Ввиду этого

моделирование молекулярных и физиологических механизмов САР на лабораторных животных является чрезвычайно актуальной проблемой трансляционной медицины.

Для моделирования САР используют дневных грызунов *Psammomys obesus* (Einat et al., 2006), *Arvicanthis niloticus* (Leach et al., 2013), *Phodopus sungorus* (Prendergast, Nelson, 2005). Недостаток этих моделей является слабая изученность физиологии, молекулярной биологии и генетики этих видов (Otsuka et al., 2014; Kulikov, Popova, 2015; Shankar, Williams, 2021).

Одним из удачных решений этой проблемы является моделирование механизмов САР на лабораторных мышах, физиология, молекулярная биология и генетика которых изучена очень хорошо. Японские исследователи показали, что длительное содержание молодых мышей линии C57BL/6 при коротком световом дне усиливает у них тревожность, депрессивно-подобные изменения в поведении и 5-НТ системе мозга (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015). У мышей имеется большой набор контролируемых 5-НТ форм поведения, таких как двигательная активность, тревожность и депрессивно-подобное поведение. Важным преимуществом мышей как модельного вида для изучения генетико-молекулярных механизмов САР является обилие генетических мутаций, нарушающих функции 5-НТ системы мозга.

У лабораторных мышей различных линий был выявлен полиморфизм *C1473G* в гене *Tph2*, вызывающий снижение активности фермента в мозге мышей (Куликов, Попова, 1983а,б; Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005). Были получены конгенные линии В6-1473С и В6-1473G, имеющие один и тот же генетический фон (C57BL/6), но различающий аллелями полиморфизма *C1473G* и активностью фермента в мозге (Osipova et al., 2009; Vazovkina et al., 2015). Мыши этих конгенных линий являются хорошими модельными организмами для изучения связи активности ТПГ2, риска и тяжести САР (Kulikov, Popova, 2015).

В то же время, мыши линии C57BL/6 как модель САР имеют ряд недостатков: (1) они сумеречные и ночные животные и продолжительность светового дня не является ключевым фактором их жизнедеятельности, (2) они не способны синтезировать мелатонин – ключевой гормон, влияющий на циркадную ритмику, из-за дефекта фермента арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы (Roseboom et al., 1998; Otsuka et al., 2014).

Лабораторные рыбы вида *Danio rerio* являются дневными животными, их физиология, молекулярная биология и генетика изучены так же хорошо, как и у лабораторной мыши. 5-НТ система мозга этих рыб имеет значительную анатомическую, клеточную, молекулярную и фармакологическую гомологию с млекопитающими (Panula et al., 2010; Maximino et al., 2013; Lillesaar, 2011; Gaspar, Lillesaar, 2012; Herculano, Maximino, 2014). Двигательная активность и тревожность *D. rerio* регулируется 5-НТ, как и у мышей (Maximino et al., 2013; Herculano, Maximino, 2014). Они широко используются для моделирования механизмов и поиска терапии различных психопатологий человека (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014). Кажется, заманчивым использование лабораторных рыб вида *Danio rerio* в качестве модельного объекта изучения серотониновых механизмов реакции на короткий световой день.

Цели и задачи. Целью работы было экспериментальное выяснение роли 5-НТ системы мозга в реакции мышей и рыб на длительную экспозицию при коротком световом периоде. Исследовались два связанных и взаимодополняющих вопроса: (1) изменения в 5-НТ системе мозга и 5-НТ-зависимом поведении мышей и рыб при длительном их содержании при коротком световом дне и (2) влияние взаимодействия сниженной активности ТПГ2 и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение мышей и рыб.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Исследовать влияние длины светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ зависимое поведение мышей, различающихся по активности ТПП2 в мозге, вызванным полиморфизмом *C1473G* в гене *Tph2*;
- 2) Изучить влияния длины светового дня на физиологические функции, на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение рыб вида *D. rerio*.
- 3) Выяснить влияние взаимодействия сниженной активности ТПП и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение *D. rerio*

Научная новизна. Впервые в России адаптирована модифицированная модель CAP на мышах линии C57BL/6. Было впервые изучено влияние длины светового дня и мутации *C1473G* в гене *Tph2*, снижающей активность ТПП2, на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение мышей. Впервые было исследовано влияние содержания при коротком световом дне на физиологические функции, 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение рыб вида *D. rerio*. Впервые было исследовано влияние взаимодействия сниженной активности ТПП и короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение *D. rerio*.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты этой работы вносят вклад в понимание (1) характера нарушений 5-НТ системы мозга, регулируемого 5-НТ поведением и физиологических функций, вызванных содержанием при коротком световом дне у мышей и рыб *D. rerio*; (2) роли активности ТПП2 в реакции на содержание при коротком световом дне мышей и рыб *D. rerio*. Была разработана принципиально новая техника моделирования механизмов CAP на рыбах *D. rerio*. Разработаны принципиально новые алгоритмы анализа поведения группы рыб. Полученные результаты и модели могут в дальнейшем послужить основой для разработки новых препаратов, мишенью для которых будет являться

серотониновая система мозга. Сделаны практические рекомендации о связи наследственного снижения активности ТПГ2 с факторами риска САР. Дополнены программы обучения для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений.

Положения, выносящиеся на защиту:

1. Длительное содержание при коротком световом дне усиливает выраженность депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание» и усиливает катаболизм 5-НТ в мозге мышей.
2. Аллель 1473G, снижающая активность ТПГ2 в мозге мышей, снижает уровень 5-ННАА в гиппокампе и стриатуме и увеличивает выраженность депрессивно-подобного поведения мышей.
3. Не выявлено влияния взаимодействия длины светового дня и активности ТПГ2 на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение мышей.
4. Длительное содержание при коротком световом дне приводит к снижению массы тела, маскулинизации самок, снижению двигательной активности в тесте «новый аквариум» и усиливает катаболизм 5-НТ в мозге рыб вида *D. rerio*.
5. Длительное воздействие ингибитора ТПГ, пара-хлорфенилаланина, увеличивает двигательную активность в тесте «новый аквариум», снижает уровень 5-гидроксииндолуксусной кислоты, но увеличивает экспрессию генов *Tph1a* и *Tph2* в мозге *D. rerio*.
6. Не выявлено влияния взаимодействия сниженной активностью ТПГ и короткого светового дня на поведение и 5-НТ систему мозга *D. rerio*.

Апробация результатов.

Публикации. Результаты проведённых работ отражены в 15 публикациях: из них 7 статей в отечественных (6) и международных (1) журналах, а также 8 тезисов в сборниках отечественных (4) и международных (4) конференциях.

Личный вклад автора. Все эксперименты по изучению влияния короткого

светового дня на поведение мышей проводились автором самостоятельно. Все работы по содержанию и разведению рыб, проведению экспериментов по изучению влияния длинны светового дня и пара-хлорфенилаланина на поведение и экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма и рецепторы 5-НТ, в мозге рыб проводились автором самостоятельно. В определении уровня 5-НТ и активности ферментов, ТПГ2 и МАО, в мозге помогали д.б.н. Куликов А.В. и м.н.с. Арефьева А.Б.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н. Куликову А.В., а также сотрудникам и аспирантам сектора генетических коллекций нейропатологий и нейрогеномики поведения, которые помогали в проведении экспериментов и освоении методик: к.б.н. Хоцкину Н.В. за помощь в изучении поведения мышей, к.б.н. Куликовой Е. А. и к.б.н. Базовкиной Д.В. за помощь с подбором специфических для рыб праймеров, аспиранту НГУ Евсюковой В.С. за помощь по содержанию рыб и проведению экспериментов на рыбах, м.н.с. Арефьевой А.Б. за помощь в определении уровня биогенных аминов активности ТПГ и МАО, инженеру Куликову П.А. за разработку программного обеспечения для длительного мониторинга группы рыб.

Структура и объем работы. Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы (211 источников). Общий объем работы составляет 123 машинописных листов, включает 22 рисунка (из них 20 оригинальных) и 10 оригинальных таблиц.

Глава 1. Обзор литературы. Механизмы САР и роль 5-НТ системы мозга в механизмах САР

1.1. 5-НТ система мозга млекопитающих

1.1.1. Общая организация 5-НТ системы мозга млекопитающих.

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) - является одним из древнейших медиаторов нервной системы: 5-НТ нейроны обнаружены у беспозвоночных (Welsh, 1968; Wu, Cooper, 2012) и позвоночных. В организме млекопитающих около 90% 5-НТ находится в периферических тканях, кишечнике, крови, эпифизе (Попова и др., 1978). На периферии 5-НТ синтезируется в энтерохромаффинных клетках кишечника, попадает в кровь и накапливается в тромбоцитах, где он играет ключевую роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов и в механизме свертывания крови. В эпифизе 5-НТ является предшественником гормона мелатонина.

В мозге 5-НТ синтезируется в 5-НТ нейронах. Анатомическая и клеточная структура 5-НТ системы мозга чрезвычайно консервативна и сходна у рыб и млекопитающих (Gaspar, Lillesaar, 2012). Тела 5-НТ нейронов в мозге млекопитающих локализованы в ядрах шва среднего мозга и организуются в 9 кластеров– В1-В9, которые по расположению, направлению проекций и по времени появления в онтогенезе разделяются на две группы: нисходящую и восходящую (Рис. 1а) (Jacobs, Azmitia, 1992).

Нисходящую группу составляют 4 кластера (В1 – В4), которые организуются в 3 ядра: *n. raphe pallidus* (В1 и В4), *n. raphe obscurus* (В2) и *n. raphe magnus* (В3). 5-НТ нейроны этой группы проецируются в продолговатый мозг и достигают дорсального и вентрального рогов спинного мозга (проекции В1 и В3). Важнейшей функцией, нисходящей 5-НТ системы является регуляция активности мотонейронов спинного мозга и поведенческих стереотипов, таких как рефлекс мокрой собаки (Jacobs, Fornal,

1995).

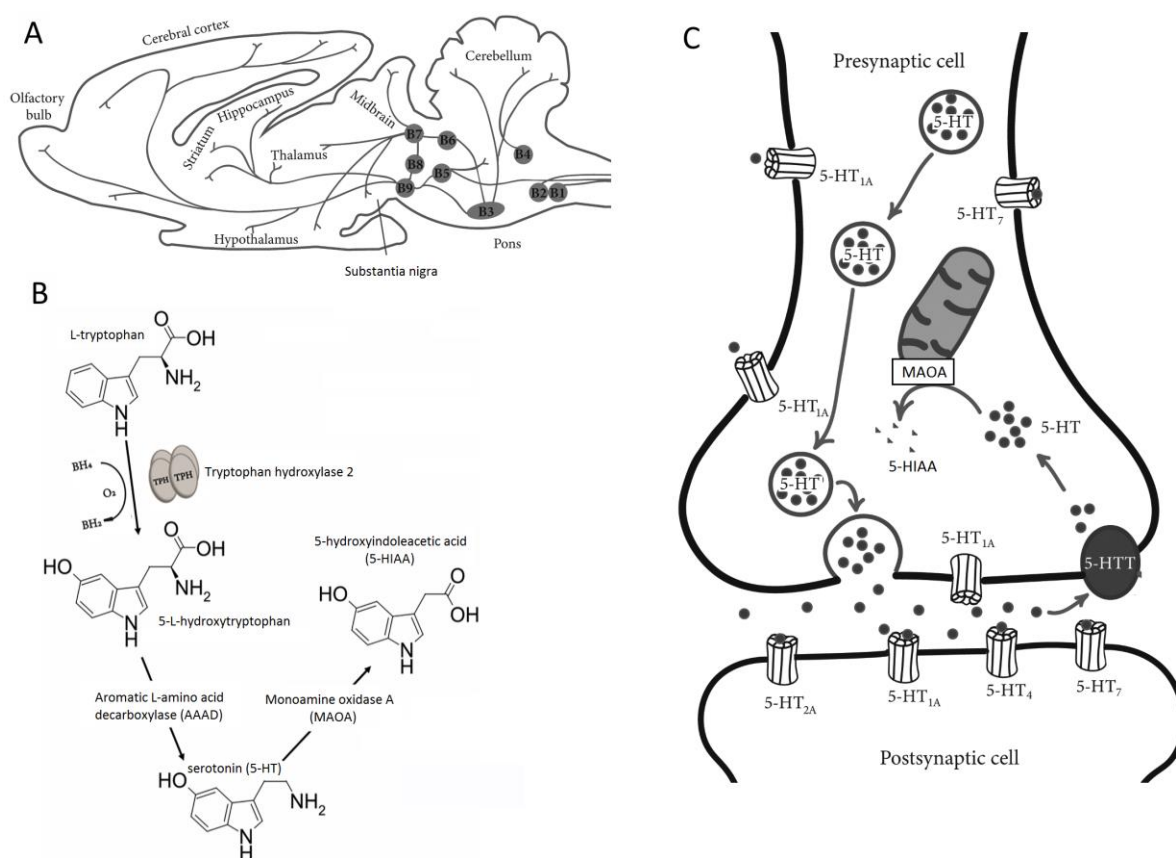


Рис.1. Схемы анатомического строения 5-HT системы мозга млекопитающих (А), метаболизма 5-HT (В) и структуры 5-HT синапса (С) (Kulikova, Kulikov, 2019) (Пояснения в тексте).

Восходящую группу 5-HT нейронов составляют 5 кластеров (B5 – B9), организованные в 4 ядра: *n. caudal linear* (B8), *n. raphe medianus* (B8 и B5), *n. raphe dorsalis* (B7 и B6) и B9 (Рис.1А). Эти нейроны дают преимущественно восходящие проекции и появляются в онтогенезе раньше, чем нейроны нисходящей группы. *N. raphe dorsalis* является самым крупным скоплением 5-HT нейронов и включает около половины всех 5-HT нейронов мозга (Jacobs, Azmitia, 1992). 5-HT нейроны, локализованные в *n. raphe dorsalis* и *n. raphe medianus*, образуют основную массу восходящих 5-HT волокон большого вентрального 5-HT пути. 5-HT система является самой экспансивной: 5-HT окончания составляют 0.5% всех окончаний переднего

мозга крысы (Audet et al., 1989).

В организме млекопитающих синтез 5-НТ идет из незаменимой аминокислоты L-триптофана в две стадии: гидроксирование индольного кольца L-триптофана ферментами триптофангидроксилазами и декарбоксилирование боковой цепи ферментом декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (Рис.1В). Существуют две триптофангидроксилазы: ТПГ1 и ТПГ2 (Walther et al., 2003; Walther, Bader, 2003). Синтезированный медиатор депонируется в везикулы, транспортируется в окончания, секретируется при возбуждении окончаний с помощью Ca^{+2} зависимого экзоцитоза. Секретированный 5-НТ взаимодействуя с 14 типами серотониновых рецепторов (5-НТ1А, 5-НТ1В, 5-НТ1D, 5-НТ1Е, 5-НТ1F, 5-НТ2А, 5-НТ2В, 5-НТ2С, 5-НТ3, 5-НТ4, 5-НТ5А, 5-НТ5В, 5-НТ6, 5-НТ7) осуществляет регуляцию большого числа физиологических функций и форм поведения (Barnes, Sharp, 1999; Pytliak et al., 2011; Barnes et al., 2021) (Рис.1С). Длительность стимуляции рецепторов регулируется белком-транспортером (5-НТТ или синоним SERT), который переносит 5-НТ из синаптической щели обратно в 5-НТ нейрон (Barker, Blakey, 1995; Grouleff et al., 2015) (Рис.1В), где медиатор вновь депонируется в везикулы или разрушается ферментами моноаминоксидазами А и Б (МАОА, МАОБ) до конечного метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА) (Shih, Tompson, 1999; Shih et al., 2011) (Рис.1В и 1С).

5-НТ система мозга регулирует большое число физиологических функций (терморегуляция, иммунитет) и форм поведения (Попова и др., 1978; Lucki, 1998; Порова, 2006). Дисфункции этой системы связывают с тяжелыми психопатологиями, такими как депрессия, фобии, шизофрения, аутизм и др. (Maes, Meltzer, 1995; Van Praag, 2004; Willner et al., 2013; Hamon, Blier, 2013; Miller, Hen, 2015). SERT, МАОА, МАОБ, 5-НТ1А, 5-НТ2А рецепторы являются мишенями для клинически эффективных

антидепрессантов, анксиолитиков и антипсихотиков (Willner et al., 2013; Hamon, Blier, 2013; Miller, Hen, 2015). У лабораторных мышей 5-НТ система мозга регулирует выраженность двигательной активности в тесте «открытое поле», тревожности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание» (Holmes et al., 2002; Hamon, Blier, 2013; Bourin, 2015; Ennaceur, Chazot, 2016; Kara et al., 2018).

1.1.2. ТПГ1 и ТПГ2.

Ферменты ТПГ1 и ТПГ2 были выделены в 2003 г группой немецких исследователей (Walther et al., 2003). Ген *Tph1* локализован на 11 хромосоме человека и 7 хромосоме мыши, тогда как ген *Tph2* – на 12 хромосоме человека и 10 хромосоме мыши (Walther et al., 2003; Walther, Vader, 2003). Они вместе с тирозин- и фенилаланин-гидроксилазами относятся к группе гидроксилаз L-ароматических аминокислот, которые гидроксилируют триптофан, тирозин и фенилаланин в присутствии кофактора, тетрагидробиоптерина, кислорода и Fe^{+2} (Fitzpatrick, 1999; 2023). Кроме хромосомной локализации ТПГ1 и ТПГ2 различаются размерами генов, числом экзонов, размером и функциональными характеристиками молекул. Но ключевым различием этих двух ферментов является зависимость их экспрессии от ткани: ТПГ1 экспрессируется в энтерохромаффинных клетках кишечника, тучных клетках кожи и в эпифизе, тогда как ТПГ2 экспрессируется исключительно в 5-НТ нейронах (Walther et al., 2003; Walther, Vader, 2003). В дальнейшем будет рассмотрена только ТПГ2, которая экспрессируется в мозге млекопитающих.

ТПГ2 является лимитирующим фактором синтеза 5-НТ в мозге млекопитающих: нокаут гена *Tph2* (Gutknecht et al., 2008; Savelieva et al., 2008; Alenina et al., 2009), мутация *G1449A* (Beaulieu et al., 2008) или ингибирование фермента п-хлорфенилаланином (Кое, Weissman, 1966; Cervo

et al., 2005; Kulikov et al., 2012; Hagsäter et al., 2021) значительно снижают уровень 5-HT в мозге мышей.

В гене *Tph2* человека и мыши выявлены распространенные и редкие мутации, которые могут снижать активность молекулы ТПГ2. (Табл.1). Некоторые из этих мутации ассоциируются с риском психических нарушений (Zhang et al., 2005; Popova, Kulikov, 2010; Ottenhof et al., 2018).

Таблица 1. Мутации в гене *Tph2*, которые могут снижать активность молекулы ТПГ2.

Мутация	Локализация	Нарушения	Ссылки
Человек			
<i>rs4570625*</i>	5' регуляторный регион	-703G>T	Lin et al., 2007
<i>rs11178997*</i>	5' регуляторный регион	-437T>A	Lin et al., 2007
<i>rs11178998*</i>	5' регуляторный регион	90A>G	Scheuch et al., 2007
<i>rs1389493*</i>	интрон 5	G6493A	Zhang et al., 2011
<i>rs17110563</i>	экзон 6	P206S	Zhou et al., 2005
<i>C907T</i>	экзон 7	R303W	McKinney et al., 2008
<i>rs2887147</i>	экзон 8	A328V	McKinney et al., 2009
<i>G1463A</i>	экзон 11	R441H	Zhang et al., 2005
<i>rs7488262</i>	экзон 11	D479E	Garriock et al., 2005
Мышь			
<i>C1473G</i>	экзон 11	P447R	Zhang et al., 2004
<i>G1449A</i>	экзон 11	R439H	Beaulieu et al., 2008

*Распространенные мутации (частота > 1%)

Наиболее изученным является полиморфизм *C1473G* в гене *Tph2* мыши. Куликов А.В. и Попова Н.К. (Куликов, Попова, 1983а) впервые показали наличие полиморфизма по активности ТПГ в среднем мозге мышей 11 инбредных линий: активность фермента в мозге мышей 7 инбредных линий (C57BL/6, CBA, AKR, C3H, DD, AY, YT) была почти вдвое выше, чем у мышей 4 инбредных линий (Balb/c, DBA2, CC57Br, A/He). Активность ТПГ наследовалась как моногенный признак (Куликов, Попова, 1983а,б). Позднее,

когда уже был открыт ген *Tph2*, этот полиморфизм связали с мутацией *C1373G*, приводящей к замене P447R в каталитическом домене фермента (Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005). Далее аллель G, снижающая активность ТПГ2, была перенесена в геном C57BL/6 и получены две конгенные линии B6-1473C и B6-1473G, имеющие геном C57BL/6, но различающиеся аллелями C/G и активностью фермента (Osipova et al., 2009; Siesser et al., 2010; Vazovkina et al., 2015; Koshimizu et al., 2019).

Линии B6-1473C и B6-1473G характеризовались, соответственно, высокой и низкой активностью ТПГ2, не различались по уровню 5-НТ в мозге, но различались по уровню 5-НИАА в гиппокампе (Siesser et al., 2010; Komleva et al., 2023). В серии стандартных тестов не было выявлено устойчивых различий в поведении между мышами этих линий (Siesser et al., 2010; Koshimizu et al., 2019; Kulikova, Kulikov, 2019). В то же время, было показано, что в природе против аллели G ведется жесткий естественный отбор (Osipova et al., 2010).

1.1.3. Рецепторы 5-НТ.

Многообразие регуляторных функций 5-НТ обусловлено многочисленными рецепторами. В настоящее время в мозге млекопитающих насчитывают 14 различных молекул 5-НТ рецепторов, которые классифицированы в 7 типов. Из них 6 сопряжены с различными G белками и один образует управляемый 5-НТ Na⁺ канал (Табл.2) (Barnes, Sharp, 1999; Pytliak et al., 2011; Barnes et al., 2021). Из всех этих типов рецепторов наиболее изучены функции 5-НТ1А и 5-НТ2А рецепторов (Barnes, Sharp, 1999; Pytliak et al., 2011; Barnes et al., 2021).

Таблица 2. Классификация 5-НТ рецепторов и сопряженные с ними механизмы трансдукции сигнала [Barnes, Sharp, 1999].

Типы	Рецепторы	Сопряжение
5-НТ1	5-НТ1А, 5-НТ1В, 5-НТ1D, 5-НТ1Е, 5-НТ1F	G _i , ↓цАМФ, ↑K ⁺ канал
5-НТ2	5-НТ2А, 5-НТ2В, 5-НТ2С	G _q , ↑Ca ²⁺
5-НТ3	5-НТ3	↑Na ⁺ канал
5-НТ4	5-НТ4	G _s , ↑цАМФ
5-НТ5	5-НТА, 5-НТВ	G _i , ↓цАМФ, ↑K ⁺ канал
5-НТ6	5-НТ6	G _s , ↑цАМФ
5-НТ7	5-НТ7	G _s , ↑цАМФ

1.1.3.1. 5-НТ1А рецептор.

Ген *Htr1a*, кодирующий 5-НТ1А рецептор картирован на 5 хромосоме человека и на 13 хромосоме мыши. Он не содержит интронов. 5-НТ1А рецептор сопряжен с G_i белком и при активации ингибирует аденилатциклазу, снижает уровень цАМФ и открывает K⁺ каналы, что вызывает гиперполяризацию клетки, экспрессирующей рецепторы этого типа (Barnes, Sharp, 1999; Pytliak et al., 2011; Barnes et al., 2021). В мозге 5-НТ1А рецепторы выполняют тормозную функцию.

Они широко распространены в мозге и обнаружены как на 5-НТ нейронах, так и на других нейронах. Большая плотность рецепторов обнаружена на телах 5-НТ нейронах, где они выполняют функцию ауторецепторов и подавляют активность 5-НТ нейронов и секрецию 5-НТ по механизму отрицательной обратной связи. 5-НТ1А рецепторы экспрессируются на пирамидальных глутаматэргических нейронах в коре и гиппокампе – они тормозят активность данных нейронов (Barnes, Sharp, 1999; Pytliak et al., 2011; Barnes et al., 2021; Albert, Vahid-Ansari, 2019).

Агонисты 5-НТ1А рецепторов, 8-ОНДРАТ, буспирон снижают

температуру тела мыши (Hjorth, Sharp, 1990; 1991; Voronova et al., 2011) и оказывают выраженное анксиолитическое действие (Albert, Vahid-Ansari, 2019). Нокаут гена *Htr1a*, напротив, увеличивает тревожность, но снижает выраженность депрессивно-подобного поведения у мышей (Parks et al., 1998; Heisler et al., 1998; Ramboz et al., 1998; Olivier et al., 2001; McDevitt, Neumaier, 2011; Toth, 2003).

1.1.3.2. 5-НТ2А рецептор.

Ген *Htr2a*, кодирующий 5-НТ2А рецептор картирован на 13 хромосоме человека и 14 хромосоме мыши. Он содержит 2 интрона. 5-НТ2А рецептор сопряжен с Gq белком и при взаимодействии с агонистами активируют фосфолипазу C, что сопровождается гидролизом фосфолипида фосфатидилинозитола 4,5-бисфосфата с образованием активных форм инозитола 1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. Первый вызывает освобождение Ca^{+2} из ретикулома (Millan et al., 2008). Таким образом, активация 5-НТ2А рецептора вызывает возбуждение клетки, которая экспрессирует данный рецептор (Guiard, Di Giovanni, 2015).

5-НТ2А рецепторы локализованы повсеместно в мозге, в том числе на пирамидальных нейронах коры и гиппокампа, где они действуют как антагонисты 5-НТ1А рецепторов и осуществляют тонкую регуляцию данных нейронов (Zhang. et al., 2015).

5-НТ2А рецепторы вовлечены в механизмы различных психопатологий (Talvik-Lotfi et al., 2000; Bhagwagar et al., 2006; Perani et al., 2008; Guiard, Di Giovanni, 2015; Zhang, Stackman, 2015). Их плотность возрастает у пациентов с психическими расстройствами (Bhagwagar et al., 2006; Guiard, Di Giovanni, 2015). Хроническое введение антидепрессантов снижает плотность 5-НТ2А рецепторов (Gray, Roth, 2001). Антагонисты 5-НТ2А рецепторов оказывают антидепрессантный эффект, тогда как их агонисты усиливают депрессивно-подобное поведение (Zaniewska et al., 2010; Diaz, Maroteaux, 2011; Guiard, Di

Giovanni, 2015). Оверстимуляция 5-HT_{2A} рецепторов вызывает стереотипию (синдром мокрой собаки) и галлюцинации (Hanks, Gonzalez-Maeso, 2013; Mestre et al., 2013; Guiard, Di Giovanni, 2015; Halberstadt, 2015; Zhang, Stackman, 2015).

1.1.4. SERT.

Белок SERT осуществляет транспорт 5-HT, сопряженный с ионами Na⁺ и Cl⁻, из синаптической щели в 5-HT нейрон. Он кодируется геном *Slc6a4* на 17 хромосоме человека и 11 хромосоме мыши. В мозге ген *Slc6a4* и белок SERT экспрессируется в 5-HT нейронах. SERT ограничивает время пребывания секретированного 5-HT в синаптической щели, его контакта с 5-HT рецепторами и, следовательно, влияния на контролируемые 5-HT процессы в нервной системе (Barker, Blakey, 1995; Grouleff et al., 2015).

Селективные блокаторы SERT такие как флуоксетин, циталопрам и пароксетин увеличивают время нахождения и концентрацию 5-HT в синаптической щели и являются клинически эффективными антидепрессантами (Willner et al., 2013; Hamon, Blier, 2013; Miller, Hen, 2015), а также оказывают выраженный антидепрессантный эффект в моделях депрессивно-подобных нарушений поведения (Cryan et al., 2005a,b; Petit-Demouliere et al., 2005; Yan et al., 2010).

В то же время, связь SERT с психопатологиями не так очевидна. В промоторе гена *Slc6a4* человека имеется участок, состоящий из 16 (L) или 14 (S) тандемных повторов их 22 нуклеотидов – так называемый 5-HTTLPR полиморфизм. Было показано, что короткая аллель снижает уровень экспрессии гена *Slc6a4*, плотность белка SERT и скорость обратного захвата 5-HT (Lesch et al., 1996). Учитывая фармакологические данные, можно было бы предположить снижение риска депрессий у носителей короткой аллели. Однако частота встречаемости короткой аллели в популяциях варьирует от 15% у африканцев, 25% у европейцев и 75% у жителей Дальнего Востока

(Япония, Корея, Китай) (Kunugi et al, 1997; Serretti A. et al., 2006; Odgerel et al., 2013), в то время как риск депрессий у этих народов примерно одинаков. Проведенный метаанализ также не выявил ассоциации полиморфизма 5-HTTLPR с риском депрессий (Anguelova et al., 2003). Нокаут гена *Slc6a4* увеличивает тревожность (Murphy et al., 2008), не влияет существенно на выраженность депрессивно-подобного поведения, но подавляет антидепрессантный эффект селективных блокаторов SERT (Holmes et al., 2002; Murphy et al., 2008; Kalueff et al., 2006).

1.1.5. МАОА и МАОБ.

Ферменты МАОА и МАОБ кодируются соответствующими генами, локализованными на X хромосоме человека и мыши. В клетках молекулы МАОА и МАОБ встроены во внешние мембраны митохондрий. Ферменты окисляют биогенные амины 5-НТ, дофамин и норадреналин, причем МАОА окисляет преимущественно 5-НТ, а МАОБ – катехоламины (Shih, Tompson, 1999; Shih et al., 2011).

Ингибиторы МАОА и МАОБ резко увеличивают уровень биогенных аминов в мозге за счет снижения интенсивности их ферментативного окисления (Куликова и др., 2020; 2021). Нокаут гена *Maoa* увеличивает выраженность агрессии у человека (Brunner et al., 1993) и мышей (Cases et al., 1995; Porova et al., 2001a,b). При этом увеличение уровня 5-НТ наблюдается только у молодых мышей с нокаутом гена *Maoa*, с возрастом уровень медиатора у них нормализуется, по-видимому, за счет компенсаторного увеличения активности МАОБ (Porova et al., 2001a).

В промоторе гена *MAOA* человека выявлен участок, состоящий из 3, 4 или 5 тандемных повторов из 30 нуклеотидов. Экспрессия гена *MAOA* у индивидуумов с 4 повторами в 2-10 раз выше, чем у индивидуумов с 3 и 5 повторами (Sabol et al., 1998). Однако влияние этого полиморфизма на активность МАОА и уровень 5-НТ в мозге не изучено.

1.2. Сезонное аффективное расстройство (САР)

1.2.1. Симптоматика и эпидемиология.

Сезонное аффективное расстройство (САР) представляет из себя комплекс депрессивно-подобных нарушений, которые возникают в осенне-зимний период. Симптоматика САР включает хроническую усталость, превалирование негативные эмоции, сонливость (у 70-90% пациентов), увеличенный аппетит (у 70-80%) и стремление к употреблению углеводистой пищи, преимущественно сладкой (у 80-90%) и увеличение массы тела (у 70-80%) (Eagle, 2004; Levitan, 2007; Gupta et al., 2014). У многих здоровых индивидуумов в осенне-зимний период проявляется большинство из этих симптомов в форме субсиндромальной САР (Magnusson, 2000; Wirz-Justice et al 2019). САР является значительной социальной и экономической проблемой. Частоты САР и субсиндромального САР составляют 4-10% и 11-21%, соответственно (Miller, 2005). В США частота САР и субсиндромального САР возрастает с юга на север: с 17.6% на юге (Флорида) до 48.7% на севере (Нью Хэмпшир) (Rosen et al., 1990). Приступы САР снижают трудоспособность и качество жизни человека и впервые возникает у лиц в возрасте после 15 лет до 55 лет (средний возраст – около 23 лет), причем шансы заболеть с возрастом уменьшаются. Большему риску возникновения заболевания подвержены женщины, чем мужчины (приблизительно в 4 раза; Wirz-Justice et al 2019).

1.2.2. Циркадные ритмы и САР.

В настоящее время рассматриваются две гипотезы связи циркадных ритмов и САР: фотопериодическая и смещение фазы. Ключевым в этих гипотезах являются циркадные изменение синтеза и секреции гормона эпифиза – мелатонина (Levian et al., 2007; Sohn et al., 2005).

1.2.2.1. Фотопериодическая гипотеза.

Эта гипотеза связывает возникновение САР с укорочением светового дня в осенний и зимний периоды (Rosenthal et al., 1984; Levitt, Royle, 2002). Изначально предполагалось, что пациенты с САР теряют способность адаптации к более короткому световому дню зимой, что подкреплялось характером распространенности САР в более северных широтах, где световой день зимой короче (Potkin et al., 1986; Rosen et al., 1990). Однако, отмечается слабое влияние широты на распространенность САР (Levitt, Royle, 2002; Blazer et al., 1998; Mersch et al., 1999).

Поскольку мелатонин секретируется только во время темной фазы, длительность его секреции может служить сигналом темной фазы фотопериода у многих млекопитающих (Wehr, 2001). Не было обнаружено различий в продолжительности секреции мелатонина в зимний период между пациентами САР и здоровыми добровольцами. Однако сезонная изменчивость в длительности секреции мелатонина наблюдалась только у пациентов с САР, тогда как у здоровых добровольцев не было обнаружено сезонных изменений в длительности секреции гормона (Wehr et al., 2001). Иными словами, мелатониновая система пациентов с САР реагирует на сезонные изменения освещения по типу других млекопитающих, тогда как у здоровых людей секреция мелатонина не зависит от сезона.

Еще одним подтверждением фотопериодической гипотезы служит эффективность свето-терапии, когда САР-пациентов подвергали ежедневному воздействию яркого (2500 люкс) света в интервале от 6.00 до 9.00 утра и от 18.00 до 21.00 вечера (или с 16.00 до 19.00 вечера) (Rosenthal et al., 1984). Последующие исследования показали, что и однократное воздействие яркого света (2500 люкс по 2 часа ежедневно) было достаточным для антидепрессивного результата (Terman 1989; Pjrek et al 2016).

1.2.2.2. Гипотеза смещения фазы.

Эта гипотеза полагает, что САР – результат задержки фазы внутренних циркадных ритмов по отношению к внешним изменениям освещенности или других ритмов, таких как сон-бодрствование (Lewy et al., 1987; Smagula et al 2018). Согласно этой гипотезе проведение свето-терапии в утренние часы будет иметь наибольший терапевтический эффект, поскольку позволит синхронизовать внутренние ритмы с суточным изменением освещенности.

Однако у САР пациентов не было выявлено смещения фаз суточной секреции мелатонина, кортизола, пролактина, тиреотропина, температуры тела (Checkley et al., 1993; Eastman et al., 1993; Oren et al., 1996). В целом многочисленные данные об смещении фазы внутренних ритмов у САР пациентов довольно противоречивы (см. обзоры Levian et al., 2007; Sohn et al., 2005). Тем не менее, гипотеза о патогенном эффекте рассогласования фаз суточной секреции мелатонина с другими внутренними и внешними ритмами недавно была расширена и на другие психические расстройства (Lanfumeu et al., 2013).

1.3. 5-НТ система мозга и САР

Многочисленные доказательства указывают на связь дефицита 5-НТ в мозге с депрессивными расстройствами и САР: (1) риск депрессии ассоциируется с дефицитом 5-НТ в мозге (van Praag, 2004); (2) антидепрессанты увеличивают уровень 5-НТ в синаптической щели; (3) уровень и метаболизм 5-НТ в мозге снижается осенью и зимой (Carlsson et al., 1980; Brewerton, 1989); (4) увеличение аппетита и тягу к сладкому в зимний период у САР пациентов можно отнести к снижению функций 5-НТ мозга; (5) участие 5-НТ в регуляции сна и бодрствования (Monti et al., 2011).

Имеется довольно большая, хотя и противоречивая, литература по ассоциации между риском САР и мутациями в ключевых генах, кодирующих SERT и 5-НТ рецепторы (Sohn et al., 2005; Tyrer et al., 2016). Одни

исследователи ассоциируют риск САР с коротким аллелем 5-HTTLPR полиморфизма (Rosenthal et al., 1998; Sher et al., 1999b), другие, напротив, с длинным аллелем (Praschak-Reider et al., 2002; Thierry et al., 2004) или не находят какой-либо ассоциации (Lenzinger et al., 1999; Johansson et al., 2001; 2003; Willeit et al., 2003). Не выявлена ассоциации риска САР с полиморфными вариантами генов *HTR1A*, *HTR1B*, *HTR1D*, *HTR1E* (Sher et al., 1999a). Ряд авторов находят ассоциации между САР и некоторыми полиморфными вариантами гена *HTR2A* (Enoch et al., 1999; Arias et al., 2001; Molnar et al., 2010), тогда как другие такой ассоциации не находят (Ozaki et al., 1996; Johansson et al., 2001).

С помощью позитронно-эмиссионной томографии было показано увеличение плотности SERT у САР пациентов зимой по сравнению со здоровыми добровольцами (Tyter et al., 2016; Nørgaard et al., 2017; McMahon et al., 2018).

Существенным доказательством связи САР с дефицитом 5-НТ в мозге является эффективность лечения САР с помощью антидепрессантов (Tam et al., 1995). Хроническая терапия с флуоксетином была эффективна у 50-70% САР пациентов (Lam et al., 1995; 2006; Patronen, Lonqvist, 1996; Ruhrmann et al., 1998). Несмотря на то, что свето-терапия и антидепрессанты оказывают сходный терапевтический эффект у САР пациентов, последние могут оказывать негативные побочные эффекты, такие как возбуждение, нарушение сна (Lam et al., 2006).

Терапия САР с помощью предшественника 5-НТ, L-триптофана, сталкивается со значительными трудностями: (1) L-триптофана плохо проникает в мозг и (2) он может стимулировать синтез кинуренина и его метаболитов, которые активирует нейродегенерацию (см. обзор Kulikov, Pirova, 2015).

Таким образом, клинические данные о связи САР с дефицитом 5-НТ в

мозге крайне скудны и противоречивы из-за значительных этических и технических ограничений. Экспериментальные исследования на модельных объектах позволят более детально изучить механизмы САР и облегчат поиск эффективной терапии заболевания.

Согласно базы данных PubMed пик публикаций по САР приходится на конец 90-х годов прошлого столетия и начало 2000 годов и поддерживается на постоянном уровне последние 20 лет (Рис.2). Практически все эти исследования проведены на человеке. В настоящее время, основной причиной, ограничивающей экспериментальные исследования САР, является отсутствие корректных моделей этой патологии.

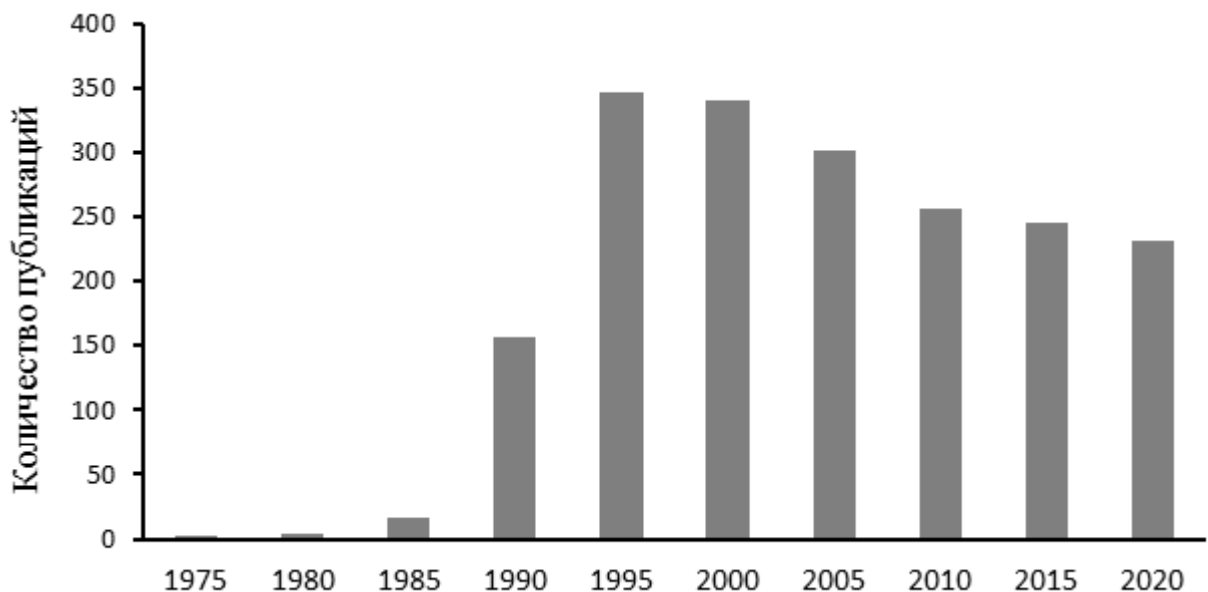


Рис.2. Динамика публикаций по САР (по данным PubMed).

1.4. Моделирование САР

В настоящее время имеются 3 модельных вида для изучения механизмов САР: толстая песчанка (*Psammomys obesus*, Einat et al., 2006), травяная полевка (*Arvicanthis niloticus*, Leach et al., 2013) и сибирский хомячок (*Phodopus sungorus*, Prendergast, Nelson, 2005). Все они дневные животные, активные в дневное время суток. При содержании этих животных в течении 3-4 недель при коротком световом дне (5 или 8 часов) наблюдается

усиление депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание» (Einat et al., 2006; Leach et al., 2013; Prendergast, Nelson, 2005).

Существенным недостатком этих объектов является слабая изученность физиологии, молекулярной биологии и генетики этих видов, что значительно затрудняет изучение молекулярных и генетических механизмов САР.

Одним из решений данной проблемы является использование лабораторных мышей для изучения генетических и молекулярных механизмов САР, поскольку генетика и молекулярная биология этого объекта хорошо изучены. Японские исследователи были первыми, кто показал, что содержание молодых (4-6 недель в начале эксперимента) мышей стандартной линии C57BL/6 в течении 45 дней в условиях короткого светового дня (8 часов свет и 16 часов темнота) приводит к усилению у них тревожности, депрессивно-подобного поведения и снижению уровня 5-НТ в некоторых структурах мозга (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015). Однако для признания данной модели САР широким научным сообществом необходима их верификация другими исследовательскими группами, что до настоящего времени сделано не было.

Существенным преимуществом мышей C57BL/6 по сравнению с другими моделями САР является то, что на эту линию перенесено огромное число мутаций различных генов. Это позволяет использовать мутантных, трансгенных и рекомбинантных мышей с генотипом C57BL/6 для изучения участия различных генов и белков в механизме САР. Например, конгенные линии мышей B6-1473C и B6-1473G с высокой и низкой активностью ТПГ2, соответственно, являются подходящей моделью для изучения связи риска САР с активностью данного фермента.

В то же время, мыши линии C57BL/6 не являются идеальным модельным объектом для изучения механизма САР поскольку они: (1) являются сумеречными и ночными животными, активны в сумерках и ночное

время и, следовательно, не должны быть слишком чувствительны к короткому световому дню; (2) они не способны синтезировать мелатонин вследствие спонтанного нокаута гена, кодирующего арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу – ключевой фермент синтеза гормона (Ebihara et al., 1986; Rosenboom et al., 1998). Последнее противоречит требованию construct validity, предъявляемого к модели CAP, а именно фотопериодической гипотезе и гипотезе о смещении фазы (см раздел 1.2.2). Поэтому поиск более адекватной модели изучения механизмов CAP и роли 5-НТ системы мозга в механизме CAP является ключевой и еще не решенной проблемой нейробиологии.

1.5. Лабораторные рыбы вида *Danio rerio* как возможный объект изучения механизма CAP и роли 5-НТ системы мозга в механизме CAP

В природе рыбы данного вида обитают в пресных неглубоких водоемах Юго-Восточной Азии (Индия, Индокитай, Бирма), то есть живут вблизи экватора при постоянном фотопериоде 12 часов свет и 12 часов темнота (Engeszer et al., 2007; Arunachalam et al., 2013). Они активны в дневное время. Это стайные животные, молодые и взрослые рыбы большую часть светового периода проводят в толще воды или ближе к поверхности, где они добывают корм (Spence et al., 2008) и при опасности они прячутся у дна (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014).

Анатомия, нейробиология и физиология нервной системы, а также молекулярная биология, генетика и поведение *D. rerio* изучены также тщательно, как и у лабораторной мыши. Геном этого вида полностью секвенирован (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014).

Поведение *D. rerio* в целом отличается от мыши поскольку это стайные животные и у них отсутствует материнское поведение и забота о потомстве. В настоящее время на рыбах не создано теста аналогичного тестам «принудительное плавание» или «подвешивание за хвост» для изучения

депрессивно-подобного поведения и скрининга антидепрессантов. Однако показано, что все классические антидепрессанты, действующие на 5-НТ систему мозга, такие как селективные ингибиторы SERT (Maximino et al., 2013; Синякова и др., 2017; Kulikov et al., 2019; Куликова и др., 2020; Evsiukova et al., 2021) и моноаминоксидазы (Evsiukova et al., 2021) вызывают у рыб характерное поведение “surface dwelling”, выражающееся в том, что рыба проводит большую часть времени вблизи поверхности. Это поведение можно до некоторой степени рассматривать как аналог вызванной антидепрессантами увеличения подвижности и уменьшения времени неподвижности у мышей в тестах «принудительное плавание» или «подвешивание за хвост».

Отделение от стаи и помещение в незнакомый аквариум является стрессом для *D. rerio* и вызывает у рыб характерное поведение “bottom dwelling”, когда рыба проводит большую часть времени у дна. Полагают, что “bottom dwelling” является проявлением тревожности, аналогом избегания лабораторными грызунами центральной зоны в тесте «открытое поле» или открытых рукавов в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», поскольку все известные анксиолитики (этиловый спирт, диазепам и др.) уменьшают время, проведенное у дна (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014). Иными словами, тест «новый аквариум» является корректным тестом на тревожность, аналогичным тестам «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Следует отметить, что двигательная активность и тревожность в тесте «новый аквариум» регулируются 5-НТ.

Анатомия 5-НТ системы мозга *D. rerio* очень похожа на таковую млекопитающих (Lillesaar, 2011; Gaspar, Lillesaar, 2012) (Рис.3). Более того, имеется значительная молекулярная гомология между 5-НТ системами мозга рыб и млекопитающих (Panula et al., 2010). В то же время, имеются отличия. Так в геноме *D. rerio* имеются три гена *Tph1a*, *Tph1b*, *Tph2*, кодирующие три

фермента ТПГ1А, ТПГ1В и ТПГ2 и только один ген *Mao*, кодирующий один фермент MAO (Табл. 3). Число типов 5-НТ рецепторов также превышает таковое у млекопитающих (Табл. 3).

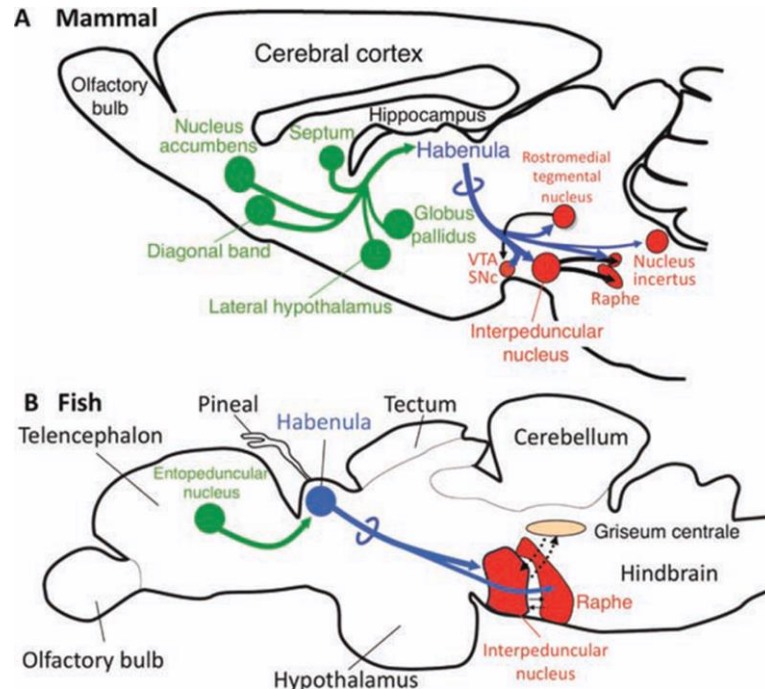


Рис.3. Сравнение анатомической структуры 5-НТ системы мозга *D. rerio* и грызунов (Gaspar, Lillesaar, 2012).

Наконец, имеется значительная фармакологическая гомология между 5-НТ системами *D. rerio* и грызунов (Maximino et al., 2013; Herculano et al., 2014). Например, ингибитор ТПГ, п-хлорфенилаланин, снижает уровень 5-НТ в мозге мышей (Kulikov et al., 2012; Куликова и др., 2020) и *D. rerio* (Куликова и др., 2021; Evsiukova et al., 2021). Ингибитор MAO, паргилин, увеличивает уровень 5-НТ в мозге *D. rerio* (Куликова и др., 2021; Evsiukova et al., 2021). Агонист 5-НТ1А рецепторов, буспирон, оказывает анксиолитический эффект у грызунов (Albert, Vahid-Ansari, 2019), так и у *D. rerio* (Maximino et al., 2013).

Таблица 3. Молекулярная организация 5-HT систем млекопитающих и *D. rerio*
(Данные взяты из *Ensemble genome browser*: <https://www.ensembl.org/index.html>).

<i>Mus musculus</i>	<i>Danio rerio</i>
<i>Tph1, Tph2</i>	<i>Tph1a, Tph1b, Tph2</i>
<i>Slc6a4</i>	<i>Slc6a4a, Slc6a4b</i>
<i>Maoa, Maob</i>	<i>Maο</i>
<i>Htr1a</i>	<i>Htr1aa, Htr1ab</i>
<i>Htr1b</i>	<i>Htr1b</i>
<i>Htr2a</i>	<i>Htr2aa, Htr2ab</i>
<i>Htr2b</i>	<i>Htr2b</i>
<i>Htr2c</i>	<i>Htr2cl1, Htr2cl2</i>
<i>Htr3a, Htr3b</i>	<i>Htr3a, Htr3b</i>
<i>Htr4</i>	<i>Htr4</i>
<i>Htr5a</i>	<i>Htr5aa, Htr5ab</i>
<i>Htr5b</i>	
<i>Htr6</i>	<i>Htr6</i>
<i>Htr7</i>	<i>Htr7b, Htr7c</i>

Все сказанное позволяет считать *D. rerio* как потенциально новый объект для моделирования механизмов САР.

Таким образом, в результате анализа имеющейся литературы возникает необходимость экспериментально выяснить изменения в поведения и 5-HT системе мозга при длительном содержании мышей при коротком световом дне, влияние наследственного дефицита активности ТПГ2 и нарушений метаболизма на выраженность симптоматики САР у мышей и возможность использования рыб вида *D. rerio* для моделирования 5-HT механизмов САР. Для этого необходимо экспериментально исследовать следующие вопросы:

1. Выяснить влияние полиморфизма *C1473G* в гене *Tph2* и короткого светового дня на 5-HT систему мозга и 5-HT-зависимое поведение мышей

конгенных линий В6-1473С и В6-1473G с высокой и низкой активностями ТПГ2, соответственно.

2. Выяснить влияние длительного содержания при коротком фотопериоде на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение рыб вида *D. rerio*.

3. Исследовать влияние фармакологической блокады ТПГ и длины светового дня на 5-НТ систему мозга и 5-НТ-зависимое поведение *D. rerio*.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Животные

Все исследования выполнялись в строгом соответствии с рекомендациями в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных Российского Национального Центра Генетических Ресурсов Лабораторных Животных на основе SPF-вивария Федерального Исследовательского Центра Института Цитологии и Генетики СО РАН. Все процедуры соответствовали Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года об охране животных, используемых в научных целях и Положению по использованию рыб Национального Института Здоровья США от 12 апреля 2013 года. Протоколы исследования были одобрены Комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия (номер разрешения: 28 от 19 июня 2015 г.). Исследование поведения проходило на оборудовании, которое входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России N 281 от 30.04.2013. Были предприняты все усилия для сведения к минимуму используемого количества животных и их страданий при проведении сопутствующих тестов.

2.1.1. Мыши

Протокол воздействия сокращенным днём, предложенный Otsuka et al. (2014) был модифицирован: вдвое уменьшено время световой фазы (до 04L:20D) и увеличено время воздействия с 3 до 4 недель.

Эксперименты по влиянию фотопериода проводили на половозрелых самцах (11 недель) мышей линий B6-1473C (n = 16) и B6-1473G (n = 16), различающихся по активности ТПГ2. Однопометников B6-C1473C и B6-1473G получали скрещиванием гетерозиготных особей B6-1473CG: в

потомстве было 25% B6-1473C, 25% B6-1473G и 50% B6-1473CG; Генотип определяли с помощью ПЦР с селективными для C и G аллелей праймерами (Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005).

С момента отсадки от матери (3 недели) и до начала экспериментов мышей с одинаковым генотипом и полом помещали в группы из 4 особей в стандартные клетки Optimice (Animal Care Systems, Inc.) в комнате с 20-кратным воздухообменом при температуре $24 \pm 2^\circ \text{C}$, влажностью 45-50%. Пищу и подстилку перед использованием подвергали автоклавированию при 121°C . Животным была предоставлена деионизированная вода (произведенная в устройстве Millipore) с минеральной добавкой «Северянка» («Эко-проект», Санкт-Петербург, Россия) и кормом *ad libitum*.

Эксперимент 1. Изучение влияния длинны светового дня и мутации *C1473G* в гене *Tph2* на 5-НТ систему мозга и регулируемое 5-НТ поведение мышей. Опыты проводили на самцах мышей конгенных линий B6-1473C (n = 16) и B6-1473G (n = 16). На начало эксперимента животные были в возрасте 11 недель и имели массу тела 26 ± 1 г. Самцов одного и того же генотипа содержали по 4 особи в клетке при стандартном (14L:10D) или коротком (4L:20D) световом дне в течении 28 дней. Были сформированы 4 группы по 8 животных в каждой: (1) B6-1473C, 14L:10D; (2) B6-1473C, 4L:20D; (3) B6-1473G, 14L:10D; (4) B6-1473G, 4L:20D. Перед тестированием всех животных рассаживали в индивидуальные клетки и на протяжении всего тестирования сохраняли выбранный режим фотопериода. Животных тестировали в Phenomaster (суточная активность), «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание». Интервал между тестами составлял 1 день.

2.1.2. Рыбы.

Исследования проводились на рыбах вида *D. rerio*, стандартная линия АВ. Родители рыб были получены в дар из European Research Institute of Biology of Ageing (ERIBA, Гронинген, Голландия) и разводили в секторе генетических коллекций нейропатологий ИЦиГ СО РАН. Оплодотворенную икру содержали в растворе метиленового синего (1%) при постоянной аэрации и температуре среды 28°C. Вылупившихся личинок в течении 2 недель содержали в аквариуме на 6 л с аэрацией при температуре 27°C и световом режиме (12:12). Личинок кормили живой пресноводной коловраткой. Подмену 20% воды и чистку аквариума осуществляли 2 раза в неделю. Подросших мальков в возрасте 2 недель перенесли в аквариумы на 40 л снабженных устройствами для биологической фильтрации и аэрации воды, где их и содержали до начала эксперимента при температуре 27°C и световом режиме (12:12). Мальков кормили до возраста 4 недель живыми личинками *Artemia salina*. В возрасте 4 недель молодых рыб переносили в аквариумы на 125 литров, снабженные бактериальными фильтрами, где они содержались в группах по 60 особей обоего пола (1:1) до начала эксперимента. Рыб кормили два раза в день в течении 6 дней в неделю стандартным сухим кормом Tetramin Tropical Flakes (Tetra, США) и раз в неделю – замороженными *Daphnia magna*.

Было проведено два эксперимента по изучению влияния длинны светового дня на физиологические характеристики, 5-НТ систему мозга и регулируемое 5-НТ поведение рыб.

Эксперимент 2. Проводили на 120 особях *D. rerio* (60 самцов и 60 самок). На начало эксперимента рыбы были в возрасте 6 недель. Рыб помещали в 4 аквариума (20 литров каждый) по 15 самцов и 15 самок в каждом. Два аквариума содержали 60 дней при стандартном световом дне (12L:12D) а другие 2 аквариума – при коротком (4L:20D) световом дне.

Чистка поверхностей аквариумов и подмена воды у экспериментальных рыб происходит только в светлое время (10:00) раз в неделю. Кормление рыб осуществляется дважды в день одинаковым количеством гранулированного корма (Tetra) порциями по 0.16 г/аквариум после включения освещения в 09:15 и в 12:30 и раз в неделю рыб кормили замороженными личинками *Chironomus plumosus*.

Через 60 дней содержания при стандартном и коротком фотопериодах рыб тестировали в тесте «новый аквариум» (10:00 – 12:00), усыпляли помещением в холодную воду (+2°C), взвешивали, проверяли пол по наличию семенников или яичников, выделяли мозг целиком, замораживали его жидким азотом и хранили при -80°C.

Затем мозги рыб в каждой из 4 групп (примерно по 30 мозгов в каждой группе) случайным образом разделяли на три блока (по 10 образцов в каждом): (1) для определения уровня биогенных аминов, (2) для определения активности ТПГ2 и MAO и (3) для выделения РНК. Такое разделение обусловлена небольшими размерами мозга рыбы и невозможностью измерить уровень биогенных аминов, активность фермента и экспрессию генов в одном мозге.

Эксперимент 3. Этот эксперимент был проведен с целью изучить влияние сниженной активности ТПГ и короткого светового дня на поведение и 5-HT систему мозга рыб. Активность ТПГ снижали с помощью добавления в воду аквариума ингибитора ТПГ, пара-хлорфенилаланина метилового эфира (pCPA, Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 5 мг/л. Концентрацию pCPA в воде контролировали ежесуточно (см. 2.11). Эксперимент проводили на 40 *D. rerio* (соотношение полов 1:1). На начало эксперимента рыбы были в возрасте 12 недель. Рыб помещали в 8 аквариумов (6.3 литров каждый) по 5 особей (2 самца/3 самки или 3 самца/2 самки) в каждом. Были сформированы 4 группы рыб по 10 в каждой (5 самцов и 5 самок): (1) фотопериод 12L:12D

контроль, (2) фотопериод 12L:12D pCRA, (3) фотопериод 4L:20D контроль, (2) фотопериод 4L:20D pCRA. Чистка поверхностей аквариумов и подмена воды у экспериментальных рыб происходит только в светлое время (10:00) раз в неделю. Кормление рыб осуществляется дважды одинаковым количеством гранулированного корма (Tetra) порциями по 0.08 г/аквариум после включения освещения в 09:15 и в 12:30 и раз в неделю рыб кормили личинками *Chironomus plumosus*. Двигательную активность рыб во всех аквариумах записывали в течении всего светового периода (4 или 12 часов) в виде 14 мин файлов с частотой 1 кадр/сек.

Через 30 дней содержания при стандартном и коротком фотопериодах, в присутствии или отсутствии pCRA рыб тестировали в тесте «новый аквариум» (10:00 – 12:00), усыпляли помещением в холодную воду (+2°C), взвешивали, проверяли пол по наличию семенников или яичников, выделяли мозг целиком, замораживали его жидким азотом и хранили при -80°C до проведения нейрохимических исследований.

2.2. Измерения суточной активности мышей в домашней клетке

Суточная активность и потребление пищи в домашней клетке исследовались с помощью программно-аппаратного комплекса PhenoMaster (TSE Systems, Германия) согласно инструкциям от производителя. Установка состоит из 8 индивидуальных клеток с инфракрасными датчиками, фиксирующими перемещение животного. Поилка и кормушка так же подсоединены к датчикам для учета потребляемой пищи и воды. Информация с датчиков поступает на компьютер каждую секунду, где обрабатывается программным обеспечением, поставляемым фирмой производителем. В течении двух суток мониторинга фиксируются данные по потреблению пищи и воды, пройденного пути, скорости животного, и времени сна, определяемого как отсутствие подвижности животного в течение 40 с и более эта оценка хорошо коррелировала с временем сна, оцененного по ЭЭГ (Pack

et al., 2007; Fisher et al., 2012; Vains et al., 2017) Первые сутки считались адаптационными и не учитывались при последующем обсчете. Таким образом, в конечном анализе использовались только вторые сутки для оценки базовой активности животных.

2.3. Автоматическая трассировка мышей в стандартной батарее поведенческих тестов.

Все тесты проводились с 15:00 до 18:00 в темное время суток при красном освещении. 3D сенсор Microsoft Kinect 1 и программное обеспечение EthoStudio были применены для автоматического отслеживания поведения мыши в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт». Ранее этот датчик был успешно применен для отслеживания поведения мини свиней в открытом поле и на данный момент активно применяется в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН для автоматической трассировки животных (Kulikov et al., 2008; 2014). Основное преимущество трехмерного датчика над стандартным цифровым видео заключается в том, что он может отслеживать животное любого цвета на арене теста открытого поля и в открытых и закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта.

Для автоматической регистрации в тесте «принудительное плавание» использовали Web камеру и инвертированное освещение, когда источник света находится снизу арены, которое усиливает контраст животного с фоном (Kulikov et al., 2010; Хоцкин и др., 2015).

2.3.1. Тест «открытое поле»

Тест «открытое поле» используется для оценки двигательной (пройденное расстояние) и исследовательской (число вертикальных стоек) активностей, а также тревожности (время в центре) в условиях мягкого

стресса (новая обстановка и интенсивное освещение) (Prut, Belzung, 2003; Stanford, 2007).

Тестирование проводили на ярко освещенной белой пластиковой арене диаметром 60 см со стенкой высотой 30 см. Центральная часть арены диаметром 30 см была выбрана в качестве центра. Аппарат ярко освещался двумя галогенными лампами (35 Вт), установленными в метре над ареной. Мышь помещали у стенки арены, и ее движение автоматически отслеживалось в течение 5 мин. Программное обеспечение EthoStudio автоматически вычисляет два поведенческих признака: (1) время, проведенное в центре (%), (2) пройденный путь (м), в то время как (3) вертикальная активность или количество вертикальных поз и (4) груминг или число актов умывания регистрировались вручную с нажатием клавиш (Kulikov et al., 2008). После каждого теста арена протиралась 6% перекисью водорода и затем сухой салфеткой.

2.3.2. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»— основной для оценки тревожности. В нем оценивается баланс между естественным страхом животных перед открытым пространством, высотой, новизной и одновременным стремлением исследовать эти незнакомые условия (Belzung, Griebel, 2001; Milner, Crabbe, 2008).

Тестирование проводили в аппарате, изготовленном из серого пластика и включающем два закрытых и два открытых рукава (30×5 см). Закрытые «рукава» ограничены пластиковыми стенками высотой 30 см. Аппарат был поднят на высоте 60 см над полом и тускло освещался рассеянным освещением галогенной лампы (15 Вт), установленной в метре над ареной. Мышь помещалась в центре арены головой к закрытому рукаву и ее движение автоматически отслеживалось в течение 5 мин. Так как 3D датчик

может отслеживать животных как в открытых, так и в закрытых рукавах, было возможно рассчитывать следующие характеристики: проведенное время (%) в центре, закрытых и открытых «рукавах», и пройденный путь (м). Количество актов выглядывания из закрытых рукавов и свешивания головы с открытых рукавов регистрировалось оператором вручную. После каждого теста арена протиралась 6% перекисью водорода и затем сухой салфеткой.

2.3.3. Тест «принудительное плавание»

Тест «принудительное плавание» является основным тестом на депрессивно-подобное состояние. В нем оценивают время пассивного плавания помещенной в воду мыши, которое как полагают пропорционально выраженности депрессивного состояния (Porsolt et al., 1977; Kara et al., 2018). Мышей помещали в прозрачный пластиковый цилиндр (18 см в диаметре и 30 см в высоту), заполненный водой (25°C). Через 2 минуты адаптации в течение 4 мин оценивали время замирания (%) (Kulikov et al., 2010). Воду меняли после каждого теста.

2.4. Измерение активности группы *D. rerio* в домашнем аквариуме

Эта методика разработана нами, программное обеспечение, DanioStudio, написана инженером Куликовым П.А. Смешанную по полу группу из 5 рыб (2 самца/3 самки или 3 самца/2 самки) рыб помещали в стеклянные аквариумы на 6.3 л (20 см длина, 20 см высота, 20 см ширина, 17 см глубина воды), обклеенные с трех сторон черным пластиком (для увеличения контраста), а одна сторона направлена на WEB камеру C270 Pro (Logitech, Lausanne, Швейцария). Аквариумы освещались сверху светодиодными лампами. Каждый аквариум был снабжен устройством для биологической фильтрации и аэрации воды Barbus 019 (Китай), температура воды была $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ и заданный световой режим. Кормление рыб сухим кормом Tetramin Tropical Flakes (Tetra USA, Blacksburg, США) осуществлялось

дважды в день (в 09-00 и в 12-00). На следующий день после акклиматизации двигательную активность и пространственное распределение рыб измеряли в течении 4 или 12 часов (с 9-00 до 12-00 или 9-00 до 21-00) с помощью разработанного нами программно-аппаратного комплекса DanioStudio.

Каждый 15 мин интервал данная программа с частотой в 1 кадр/с сохраняла последовательность полутоновые изображения формата 640 x 480 пикселей аквариума с находящимися в нем рыбами в виде компрессированных avi файлов (840 изображений в каждом).

Затем эта программа покадрово анализировала совокупность данных видеофайлов. Для каждого кадра отделяли ассоциированные с рыбами пиксели от ассоциированных с фоном пикселей с помощью порогового алгоритма, основанного на яркости: пиксели ярче порога рассматривались как ассоциированные с рыбой и им приписывалось значение 1, тогда как пикселям ниже порога приписывалось значение 0. Величина порога выбиралась визуально наблюдателем, так чтобы максимизировать отношение сигнал/шум.

Для подавления мешающего влияния постоянных элементов интерьера (стенки аквариума, фильтры, постоянные блики освещения и т.п.), а также отражений рыб от поверхности воды и от стенок использовали специальные маски. Основная маска (M0) присваивала пикселям постоянным элементам интерьера изображения значения 0, а остальным – 1. На базе основной маски изготавливались еще две дополнительные маски для верхней (M1) и нижней (M2) третей аквариума. Маски изготавливали с помощью графического редактора Paint, входящего в комплект Windows 7. Обычно один набор масок изготавливался для всей дневной серии из 48 файлов для каждого аквариума. Эти три маски выделяли область трассировки, включающие весь аквариум (M0), его верхнюю (M1) и нижнюю (M2) трети.

Каждый кадр умножали на маску и для полученной матрицы оценивали суммарный силуэт рыб в аквариуме (с основной маской), в верхней и нижней третях аквариума (с соответствующими вспомогательными масками). Затем для двух последовательных кадров с помощью операции исключающего ИЛИ (XOR) оценивали сумму изменений силуэтов как сумму пикселей, изменивших свое значение (в начале ассоциированных с рыбой – затем с фоном, или наоборот) во всем аквариуме. Эти 4 полученные значения, а также их суммы за все время регистрации, записывались и сохранялись в текстовом файле. На основе этих значений для каждой записи вычисляли следующие параметры: (1) средняя скорость изменения силуэта, как отношение число измененных пикселей к суммарному числу ассоциированных с рыбами пикселей; плотность рыб в (2) верхней и (3) нижней третях аквариума, как отношение суммарного числа ассоциированных с рыбами пикселей, полученных соответственно с масками M1 и M2, к таковому, полученному с помощью маски M0.

2.5. Тест «новый аквариум»

Поведение в тесте «новый аквариум» проводили на 61 день в эксперименте 2 или на 31 день в эксперименте 3. Тестирование происходит в дневное время с 10 до 13 ч. Рыбу случайным образом осторожно, чтобы минимизировать стресс для остальных, вынимали их аквариума и помещали в стеклянную кювету 24 x 15 x 7 см, заполненную водой до 10 см и помещали на платформу с освещением двумя светодиодными лампами 5 Вт каждая, расположенными на расстоянии 40 см сверху и 10 см за кюветой и отделенной от нее матовым экраном. Подобное освещение позволяет получить необходимый для автоматической трассировки движений рыбки контраст с фоном (Рис.4). Положение рыбки регистрировали в течение 5 мин с частотой 30 кадров/сек WEB камерой C270 Pro (Logitech, Lausanne, Швейцария), расположенной в 49 см перед передней стенкой кюветы и

соединенной с компьютером через USB порт. Изображения с камеры автоматически обрабатывались программой EthoStudio (Kulikov et al., 2019; Evsiukova et al., 2021a; 2021b). Определяли стандартные для данного теста показатели такие как (1) пройденный путь (м), (2) среднее расстояние то дна аквариума (см), величина исследованной площади (%), время (%) проведенное в нижней и верхней третях аквариума. резервуара (%), время неподвижности (%). Все параметры оценивались автоматически с помощью программы EthoStudio (Рис.4).

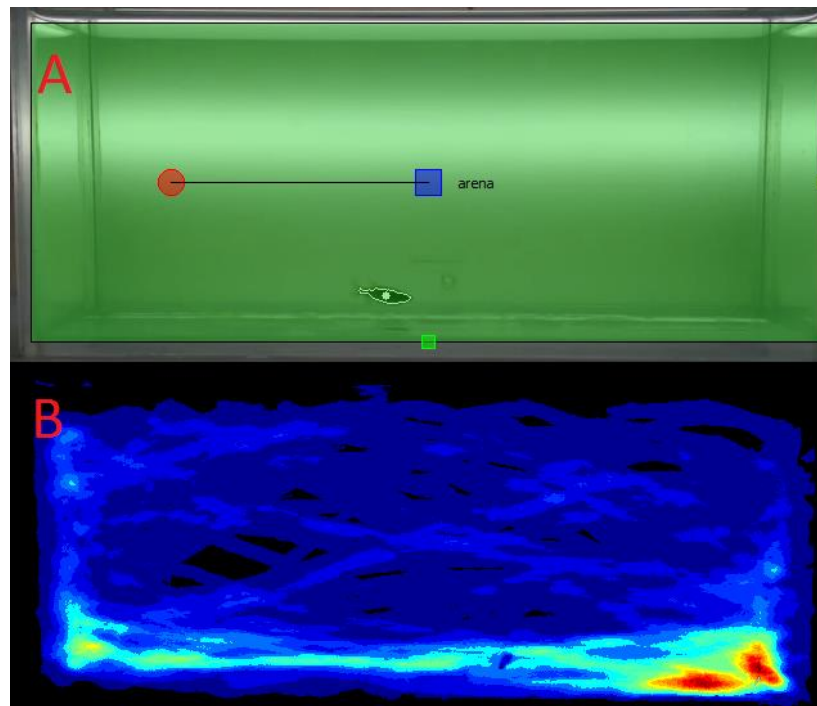


Рис.4. Регистрация *D.rerio* в тесте «новый аквариум». А – виртуальная арена, В – градиентная карта плотности распределения ассоциированных с рыбой пикселей.

.2.6. Измерение уровня и обмена 5-НТ в мозге

В эксперименте 1 кору, гиппокамп, стриатум и средний мозг мышей гомогенизировали в 250, 300, 300 и 400 мкл, а в эксперименте 2 мозг рыбы гомогенизировали в 150 мкл 0.6 М HClO_4 для экстракции 5-НТ и 5-НИАА; полученные гомогенаты центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). В эксперименте 3 мозг рыбы гомогенизировали в 150 мкл ультрачистой воды. Затем аликвоту 50 мкл гомогената смешивали с 150 мкл 0.6 М HClO_4 для экстракции 5-НТ и 5-НИАА, центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Другая аликвота 100 мкл гомогената смешивалась с тризолом (Trizol TM, Bio Rad, США) для выделения общей РНК согласно протоколу производителя. Супернатант, содержащий биогенные амины разбавляли вдвое водой и концентрацию 5-НТ и 5-НИАА определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Luna C18 (2) (размер частиц 5 мкм, $L \times ID$ 75×4,6 мм, Phenomenex, США) с электрохимическим детектированием (750 мВ, электрохимическим детектором DECADE II™; Antec, Нидерланды) и ячейкой из стеклографита (VT-03 3 мм GC sb, Antec, Нидерланды). Система ВЭЖХ включала контроллер CBM-20A, насос LC-20AD, автоматический дозатор SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Подвижная фаза содержала 13.06 г KH_2PO_4 , 200 мкл 0.5 М Na_2EDTA , 300 мг натриевой соли 1-октансульфоновой кислоты (Sigma, США), 940 мкл концентрированной H_3PO_4 и 130 мл метанола (13% объема, Vektor Ltd., Россия) в 1 л, $\text{pH} = 3,2$. Площади пиков были оценены с использованием программного обеспечения Lab Solution LG / GC версии 5.54 (Shimadzu Corporation, США) и откалиброваны с помощью стандартов, содержащих 0.5, 1 и 2 нг 5-НТ и 5-НИАА.

Осадок после центрифугирования растворяли в 1 мл 0.1 М NaOH и количество белка в нем определяли по Бредфорду согласно инструкции производителя.

Содержание 5-НТ и 5-НИАА выражено в нг/мг белка (по Бредфорду). Обмен 5-НТ оценивали по отношению 5-НИАА / 5-НТ.

2.7. Определения активности ТПГ в головном мозге *D. rerio*

В эксперименте 2 мозг рыбы гомогенизировали в 150 мкл холодного 50 мМ трис НСl, рН 7.6 и 1 мМ дитиотреитола, центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Активность ТПГ определяли в чистом супернатанте. Осадок использовали для определения активности МАО.

Аликвоту 15 мкл супернатанта инкубировали 15 мин при 27°C в конечном объеме 25 мкл содержащем 0.6 мМ L-триптофана, 0.3 мМ кофактора 6-метил-5,6,7,8-тетрагидробиоптеридина, 0.3 мМ ингибитора декарбоксилазы, м-гидроксibenзилгидразина, 5 ед каталазы и 1 мМ дитиотреитола. Реакцию останавливали 75 мкл 0.6 М НСlO₄ с последующим центрифугированием 15 мин при 12700 об/мин. Чистый супернатант разбавляли вдвое водой и количество синтезированного 5-гидрокситриптофана определяли с помощью ВЭЖХ (2.6). Площади пиков 5-гидрокситриптофана калибровали по кривой, построенной по концентрациям 25, 50 и 100 пикомоль 5-гидрокситриптофана. Для определения белка аликвоту 10 мкл супернатанта смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH. Белок определяли по Бредфорду, следуя инструкциям производителя. Активность ТПГ выражали в пикомолях 5-гидрокситриптофана синтезированного за мин в пересчете на мг белка.

2.8. Определение активности МАО в мозге *D. rerio*

Осадок после центрифугирования гомогената (2.7) вновь гомогенизировали в 150 мкл 50 мМ Tris НСl, рН 7.6 и центрифугировали 15 мин (4°C) при 500 об/мин. Активность МАО определяли в мутном супернатанте. Аликвоту 10 мкл мутного супернатанта инкубировали 10 мин при 27°C с 0.1 мМ 5-НТ в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали

добавлением 75 мкл 0.6 М HClO_4 с последующим центрифугированием 15 мин при 12700 об/мин. Чистый супернатант разбавляли вдвое водой и количество синтезированного 5-гидроксииндолуксусного альдегида определяли с помощью ВЭЖХ (2.6). Площади пиков 5-гидроксииндолуксусного альдегида калибровали по кривой, построенной по концентрациям 200, 400 и 800 пмоль 5-гидроксииндолуксусного альдегида. Для определения белка аликвоту 10 мкл мутного супернатанта смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH . Белок определяли по Брэдфорду, следуя инструкциям производителя. Активность MAO выражали в пикомолях 5-гидроксииндолуксусного альдегида синтезированного за мин в пересчете на мг белка.

2.9. Определение белка по Брэдфорду

Аликвоту 5 мкл раствора белка в 0.1М NaOH (см. 2.6 - 2.8) смешивали с 145 мкл разбавленного водой 1:4 реактива Бредфорда (Bio-Rad Laboratories, Inc.), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Концентрацию белка определяли на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf AG, Germany) при длине волны 595 нм и рассчитывали по калибровочной кривой, построенной со стандартами: 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 мг/мл.

2.10. Определение концентрации pCRA в воде аквариума.

Пробы воды депротенизировали концентрированной HClO_4 (конечная концентрация кислоты в пробе 0.6 М) и центрифугировали 15 мин при 12500 об/мин. Аликвоту 35 мкл чистого супернатанта смешивали с 310 мкл 0.5 М боратного буфера (pH 10.5) и 3 мкл о-фталевого реактива (5% о-фталевого альдегид и 5% 2-меркаптоэтанол в метаноле), инкубировали 10 мин при 60°C. Количество pCRA в пробах определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Zorbax Eclipse C18 (частицы диаметром 5 микрон, длина колонки 150 мм, диаметр 3 мм (Agilent

Technologies, США) флуориметрического детектора Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) при длинах волн возбуждения 350 нм и флуоресценции 455 нм. Мобильная фаза содержала 50 мМ KH_2PO_4 (pH 4.5) и 60% метанола. Площади пиков определяли с помощью Agilent ChemStation (Agilent Technologies, США) и калибровали с помощью калибровочной кривой, построенной с концентрациями 0.5, 1 и 2 мкг рСРА.

2.11. Определение концентрации рСРА в мозге рыб.

Аликвоту 20 мкл разбавленного экстракта мозга в 0.6 М HClO_4 (2.6) смешивали с 330 мкл 0.5 М боратного буфера (pH 10.5) и 3 мкл о-фталевого реактива (см. выше) и инкубировали 10 мин при 60°C. Содержание рСРА определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (2.10) и выражали в мкг/мг белка по Брэдфорду.

2.12. Выделение общей РНК

В эксперименте 2 мозг рыбы гомогенизировали в 300 мкл тризола (Bio Rad, США), а в эксперименте 3 100 мкл гомогената смешивали с 300 мкл тризола, инкубировали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 60 мкл хлороформа, интенсивно встряхивали 1 мин и вновь инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Смесь центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Аликвоту 150 мкл водной фазы осторожно переносили в стерильную пробирку, добавляли 200 мкл изопропанола, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. РНК осаждали центрифугированием в течении 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Супернатант сливали, а к осадку добавляли 1 мл 75% этанола и снова центрифугировали 15 мин при 12700 об/мин (4°C). Спирт сливали, осадок просушивали 40 мин при комнатной температуре, растворяли его в 24 мкл обработанной DEPC воды, добавляли 1 мкл ДНКазы (Promega, США), инкубировали 15 мин при 37°C, затем фермент

разрушали нагреванием 10 мин при 65°C. После охлаждения концентрацию РНК измеряли на приборе NanoDrop 2000 (ThermoFisher Inc., США), разбавляли до концентрации РНК 125 нг/мкл и хранили при -80°C.

2.13. Синтез кДНК и количественная ПЦР реального времени

Синтез кДНК проводили с рандомным гексонуклеотидным праймером с помощью набора реактивов R01-250 (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Количество транскриптов исследуемых генов кДНК оценивали с помощью количественной ПЦР реального времени с использованием наборов R-402 (Синтол, Россия), селективных праймеров (Табл. 4) по флуоресценции SYBR Green, согласно следующему протоколу: 95°C, 4 мин., затем 40 циклов 95°C, 15 с.; температура отжига (Табл. 4), 60 с., 80°C; 2 с. измерение флуоресценции. В качестве стандартов для рыб использовали геномные ДНК, выделенные из мышц *D. rerio* в разведениях 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 или 12800 копий в мкл. Экспрессия генов была представлена как количество копий кДНК по отношению к 100 копиям кДНК *Polr2a* (Kulikov et al, 2005; Науменко, Куликов, 2006; Evsiukova et al., 2021).

2.14. Статистика

Все полученные количественные показатели были проверены на нормальность по критерию Лиллиефорса (Lilliefors, 1967) и соответствовали этому критерию. Все исследованные показатели представляли, как средние значения \pm ошибки средних. Значения поведенческих параметров в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «новый аквариум», все биохимические параметры анализировали с помощью однофакторного и двухфакторного ANOVA. Суточная динамика в Phenomaster, мониторинг поведения рыб

анализировали одно- или двухфакторным ANOVA для повторяющихся значений («время»). Соотношение полов рыб сравнивали с помощью критерия χ^2 Пирсона (эксперимент 2) и точного критерия Фишера (эксперимент 3). Во всех расчетах использовали стандартный пакет программ Statistica 8.0.

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности, температуры отжига и размеры ампликонов праймеров для *D. rerio*.

Ген	Последовательность	Температура С°	Размер ампликона
<i>Polr2eb</i>	F5' GTGACGCAGGATGAATTGGA R5' CACCAGGACTGTCAGGTCATT	62	105
<i>Tph1a</i>	F5' ACTGTCAGGAAATGCCAGGA R5' TTTGACTTTCGCTTCCTCAA	59	124
<i>Tph1b</i>	F5' TGGAGATCCTATAACCACACGTAGA R5' TGGGATGTTGTCTTCTCTGTATCC	63	166
<i>Tph2</i>	F5' TCTACTACAACCCTTACACGCAGA R5' CGTCACAGACGGTGGTTAAG	62	105
<i>Maο</i>	F5' AAACCATGCACTTGATGACTGA R5' TCATACTTGCCATAACCCCTG	62	121
<i>Slc6a4a</i>	F5' ACCGCAAATCCAATGACCGAT R5' CGCTCACGGGAACCTCTG	63	144
<i>Htr1aa</i>	F5' GCTGCACTTCTTCCATCCTG R5' GGTTTCCTCCAACCCAACAT	61	178
<i>Htr2aa</i>	F5' TTTGGCAGTGGTTTGTGAAC R5' ATCCAGTGAGTGGCAGGTGT	61	257

Глава 3. Результаты исследований

3.1. Влияние мутации *C1473G* и длины светового дня на поведение и 5-НТ систему мозга мышей (Эксперимент 1)

3.1.1. Влияние мутации *C1473G* и длины светового дня на суточную динамику активности, сна, суточное потребление пищи и воды в домашней клетке

Анализ мониторинга двигательной активности в домашней клетке выявил влияние фактора «генотип» ($F_{1,28} = 6.47$, $p < 0.02$), но не фактора «фотопериод» ($F_{1,28} = 1.66$, $p > 0.05$) или взаимодействия данных факторов ($F_{1,28} < 1$). Мыши линии В6-1473G (68.63 ± 2.99 м/ч.) в среднем проявляют большую двигательную активность по сравнению с животными линии В6-1473С (57.85 ± 2.99 м/час, $p < 0.05$). Отмечается влияние фактора «время суток» на повышение двигательной активности ($F_{23,644} = 22.8$, $p < 0.001$) в темное время суток (Рис.5).

Для обоих генотипов суточная динамика двигательной активности не различалась, о чем свидетельствует отсутствие влияния взаимодействия факторов «время суток»×«генотип» ($F_{23,644} < 1$). Однако выявлено существенное влияние взаимодействия факторов «время суток»×«фотопериод» ($F_{23,644} = 4.46$, $p < 0.001$): у мышей обоих генотипов, содержащихся при коротком световом дне, пик активности начинался примерно на 2 ч позже после выключения света по сравнению с мышами, содержащимися при стандартном световом дне (рис.5).

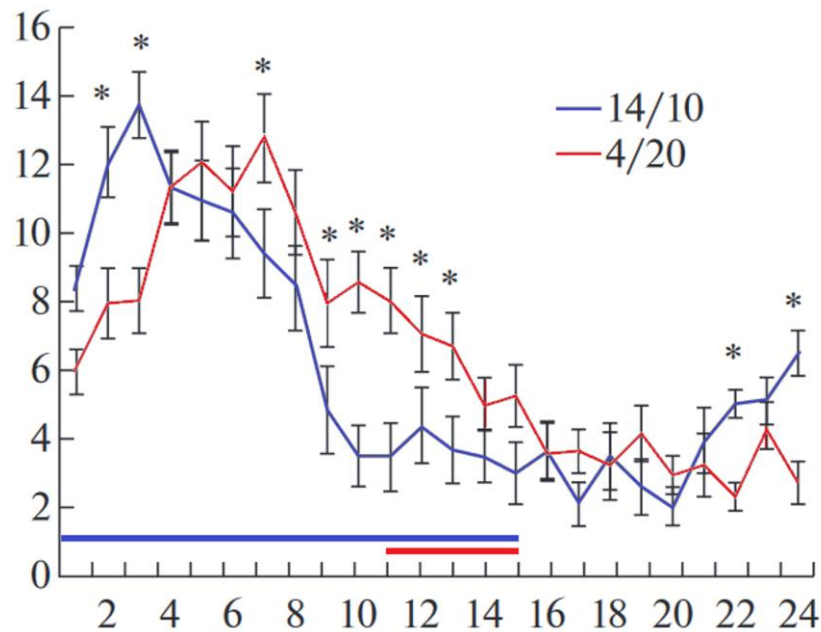


Рис.5: Суточная динамика двигательной активности (м/час) у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G, содержащихся при стандартном (14 L : 10 D) и коротком (4 L : 20 D) световом дне, в домашней клетке.

При оценке динамики продолжительности сна выявлен эффект фактора «фотопериод» ($F_{1,28} = 11.76$, $p = 0.002$), но не фактора «генотип» ($F_{1,28} < 1$) или взаимодействия данных факторов ($F_{1,28} < 1$). Мыши обоих генотипов, содержащиеся при коротком световом дне, в среднем меньше времени проводили во сне (25.08 ± 0.62 мин/ч) по сравнению с животными, содержащимися при стандартном световом дне (28.09 ± 0.60 мин/ч, $p < 0.01$). Время суток влияло на длительность сна ($F_{23,644} = 31.4$, $p < 0.001$): мыши обоих генотипов больше времени проводили во сне в светлое время суток (Рис.6). Однако не выявлено взаимодействие факторов «время суток»×«генотип» ($F_{23,644} < 1$). В то же время, выявлено существенное влияние взаимодействия факторов «время суток»×«фотопериод» ($F_{23,644} = 3.15$, $p < 0.001$): у мышей обоих генотипов увеличение времени сна наблюдалось за несколько часов до начала световой фазы. Поэтому у животных, содержащихся при коротком световом дне, увеличение времени

сна наступает существенно позже, чем у мышей, содержащихся при стандартном световом дне (Рис. 6).

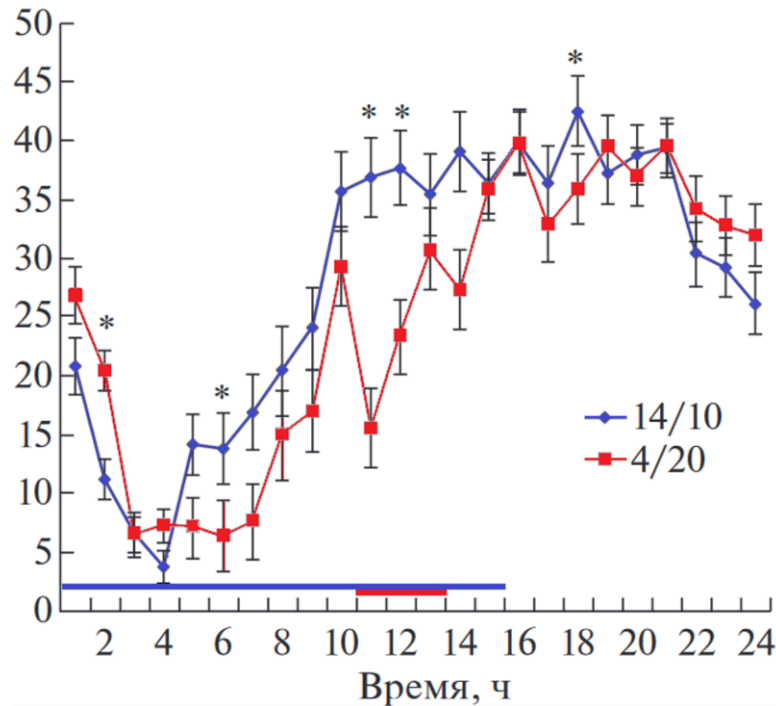


Рис.6: Суточная динамика сна (мин/час) у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G, содержащихся при стандартном (14 L : 10 D) и коротком (4 L : 20 D) дне, в домашней клетке

* $p < 0.05$ по сравнению с животными, содержащимися при длинном дне.

Для суточного потребления воды и пищи не выявлено влияния факторов «генотип» ($F_{1,24} = 1.01$, $p > 0.05$ для воды и $F_{1,28} = 1.59$, $p > 0.05$ для пищи), «фотопериод» ($F_{1,24} < 1$ для воды и $F_{1,28} < 1$ для пищи) и их взаимодействия ($F_{1,24} < 1$ для воды и $F_{1,28} < 1$ для пищи) (Рис.7).

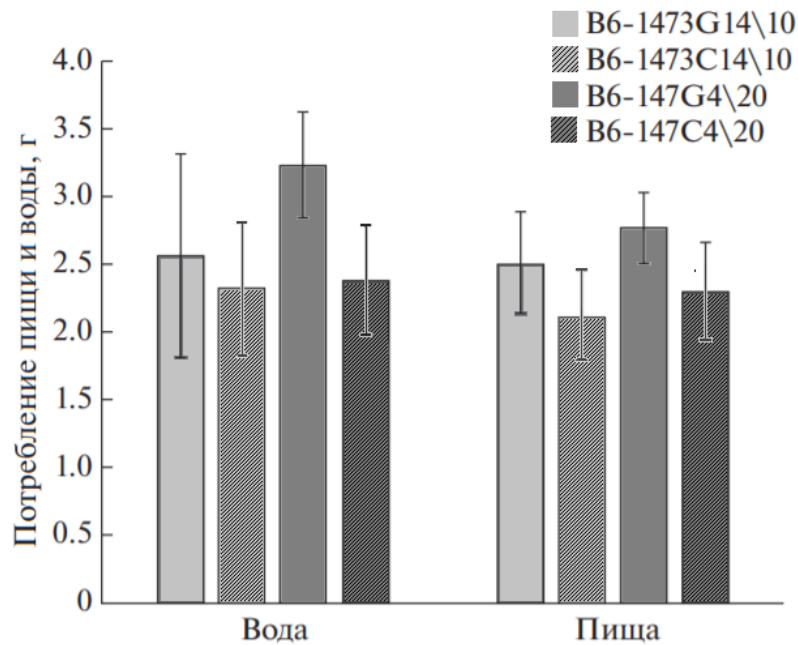


Рис.7: Суточное потребление воды и пищи у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G, содержащихся при стандартном (14 L : 10 D) и коротком (4 L : 20 D) световом дне, в домашней клетке.

3.3.2. Влияние мутации C1473G и длины светового дня на поведение в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт»

В тесте «открытое поле» мыши четырех исследуемых групп (два генотипа и два световых режима) не различались ни по одному из измеряемых показателей (Табл. 5).

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши четырех исследуемых групп не различались по времени, проведенном в центре, закрытых и открытых рукавах, а также по числу “заглядываний” вниз лабиринта (Табл. 5). В то же время выявлены значимые межгрупповые различия по следующим показателям: пройденный путь и число “выглядываний” из закрытых рукавов (Табл. 5).

Не обнаружено влияния факторов «генотип» ($F_{1,28} < 1$) и «фотопериод» ($F_{1,28} < 1$) на величину пройденного пути в «приподнятый крестообразный лабиринт». В то же время, выявлено существенное влияние взаимодействия этих факторов на данный показатель ($F_{1,28} = 9.0$, $p < 0.01$). Содержание при

коротком световом дне уменьшало величину пройденного пути у мышей B6-1473G, но не влияло на этот показатель у животных B6-1473C (Табл. 5).

На число “выглядываний” из закрытых рукавов достоверно оказывал влияние фактор «фотопериод» ($F_{1,28} = 9.5$, $p < 0.01$), влияние же факторов «генотип» ($F_{1,28} < 1$) или взаимодействие этих факторов ($F_{1,28} = 1,46$, $p > 0,05$) не выявлено. Содержание при коротком дне снижало этот показатель у мышей обоих генотипов (Табл. 5).

3.3.3. Влияние мутации C1473G и длины светового дня на поведение в тесте «принудительное плавание»

В тесте «принудительное плавание» выявлены значимые межгрупповые различия по времени подвижности ($F_{3,28} = 5.24$, $p = 0,005$). Выявлены эффекты факторов «генотип» ($F_{1,28} = 8.78$; $p = 0,006$) и «фотопериод» ($F_{1,28} = 4.81$; $p = 0,04$), но не их взаимодействия ($F_{1,28} = 2.13$; $p = 0,16$) на этот признак. В условиях стандартного светового дня время неподвижности было больше у мышей B6-1473G чем у животных B6-1473C ($p = 0.001$). При содержании в условиях короткого дня время неподвижности увеличивалось только у животных B6-1472C ($p = 0.015$). (Рис. 8).

Таблица 5: Средние значения характеристик поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G, содержащихся при стандартном (14 L : 10 D) и коротком (4 L : 20 D) световом дне.

Показатель	B6-1473C		B6-1473G		P
	14:10	4:20	14:10	4:20	
“Открытое поле”					
Пройденный путь, м	18,3 ± 1,8	19,5 ± 2,1	22,5 ± 0,5	18,2 ± 1,3	F _{3,28} = 1,76 p > 0,05
Время в центре, %	11,4 ± 1,8	8,3 ± 1,7	8,2 ± 0,6	6,9 ± 0,8	F _{3,28} = 1,98 p > 0,05
Исследованная площадь, %	88,9 ± 2,1	84,2 ± 4,4	91,3 ± 0,6	84,7 ± 2	F _{3,28} = 1,68 p > 0,05
Число стоек	41,6 ± 6,2	50 ± 8	63,4 ± 1,7	46,1 ± 4,5	F _{3,28} = 2,8 p > 0,05
Число актов умыывания	8,4 ± 1,6	7,6 ± 1,2	9,5 ± 1,2	8,3 ± 1,3	F _{3,28} < 1
“Приподнятый крестообразный лабиринт”					
Пройденный путь, м	5,7 ± 0,3	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,3	5 ± 0,2 *	F _{3,28} = 4,24 p > 0,05
Время в центре, %	14,4 ± 1,1	12,9 ± 2	10,3 ± 0,4	10,4 ± 1,5	F _{3,28} = 2,05 p > 0,05
Время в закрытых рукавах, %	72,2 ± 3	72 ± 3,9	81,3 ± 1	80,4 ± 3,7	F _{3,28} = 2,6 p > 0,05
Время в открытых рукавах, %	13,3 ± 2,1	15,1 ± 2,1	8,3 ± 0,7	9,2 ± 2,3	F _{3,28} = 2,9 p > 0,05
Число выглядываний из закрытых рукавов	20,5 ± 1,4	17,5 ± 1,5	21 ± 1,6	14,1 ± 1,8 *	F _{3,28} = 3,93 p < 0,05
Число заглядываний вниз	21,6 ± 2,5	27 ± 4	16,9 ± 1,7	17 ± 3,5	F _{3,28} = 2,6 p > 0,05

*p < 0.01 по сравнению с мышами того же генотипа, содержащимися при стандартном световом дне.

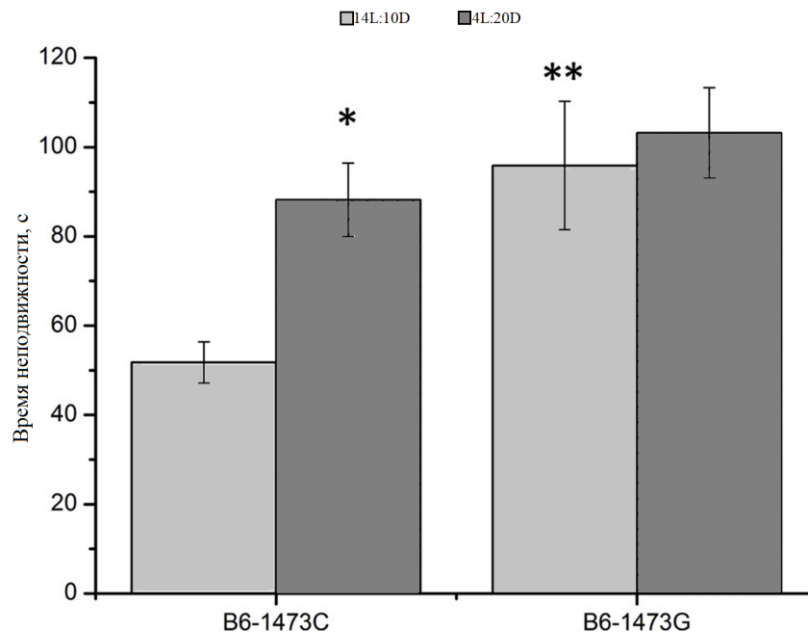


Рис.8: Влияние длины светового дня на время неподвижности в тесте “принудительное плавание” у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G, содержащихся при стандартном (14 L : 10 D) и коротком (4 L : 20 D) световом дне.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ – по сравнению с животными B6-1473C, содержащимися при стандартном световом дне.

3.3.3. Влияние мутации C1473G и длины светового дня на уровень 5-НТ, 5-Н1АА и соотношение 5-Н1АА/5-НТ в мозге мышей.

Мыши четырех экспериментальных групп не различались по уровню 5-НТ, 5-Н1АА и соотношению 5-Н1АА/5-НТ в коре головного мозга (5-НТ, $F_{3,28} < 1$; 5-Н1АА, $F_{3,28} < 1$; 5-Н1АА/5-НТ, $F_{3,28} < 1$; Рис.9). В то же время, эти группы мышей существенно различались по уровню 5-НТ, 5-Н1АА и соотношению 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе (5-НТ, $F_{3,28} = 5.98$, $p = 0.0028$; 5-Н1АА, $F_{3,28} = 11.05$, $p < 0.001$; 5-Н1АА/5-НТ, $F_{3,28} = 11.76$, $p < 0.001$), стриатуме (5-НТ, $F_{3,28} = 4.39$, $p = 0.012$; 5-Н1АА, $F_{3,28} = 3.74$, $p = 0.023$; 5-Н1АА/5-НТ, $F_{3,28} = 5.44$, $p = 0.005$) и среднем мозге (5-НТ, $F_{3,27} = 4.74$, $p = 0.0088$; 5-Н1АА, $F_{3,27} = 3.8$, $p = 0.022$; 5-Н1АА/5-НТ, $F_{3,27} = 22.17$, $p < 0.001$).

Двухфакторный ANOVA выявил существенное влияние фактора «фотопериод» на уровень 5-НТ в стриатуме и среднем мозге (Табл. 6).

Содержание при коротком световом дне снижало уровень 5-НТ в стриатуме только у мышей В6-1473G, тогда как в гиппокампе снижение уровня медиатора наблюдалось у мышей обоих генотипов (Рис.9). Выявлено влияние взаимодействия «генотип» x «фотопериод» на уровень 5-НТ в гиппокампе (Табл.6): содержание при коротком световом дне снижало уровень данного биогенного амина в данной структуре только у мышей В6-1473G (Рис.9).

Выявлен существенный вклад фактора «генотип» на уровень 5-Н1АА в гиппокампе и стриатуме (Табл.6): концентрация этого метаболита в данных структурах была ниже у мышей В6-1473G по сравнению с животными В6-1473С (Рис.9). Показан существенный вклад фактора «фотопериод» на уровень 5-Н1АА в гиппокампе и среднем мозге (Табл.6): содержание при коротком дне увеличивало уровень 5-Н1АА в гиппокаме только у мышей В6-1473G, а в среднем мозге только у мышей В6-1473С (Рис.9).

Показан статистически значимый вклад фактора «генотип» на отношение 5-Н1АА/5-НТ в стриатуме (Табл.6): этот показатель был меньше у мышей В6-1473G (Рис.9). Выявлен эффект фактора «фотопериод» на отношение 5-Н1АА/5-НТ в среднем мозге (Табл.6): содержание при коротком дне увеличивало данный показатель у мышей обоих генотипов (Рис.9). Обнаружен эффект взаимодействия факторов на отношение 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе (Табл.6): в данной структуре у мышей генотипа В6-1473G этот показатель был ниже, но при содержании при коротком дне он значительно увеличивался (Рис.9).

Таким образом, уровень 5-Н1АА и отношение 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе и стриатуме было снижено у мышей В6-1473G. Содержание при коротком дне снижает уровень 5-НТ, увеличивает уровень 5-Н1АА и отношение 5-Н1АА/5-НТ. Наличие взаимодействия факторов «генотип» и «фотопериод» свидетельствует о том, что аллель 1473G влияет на реакцию метаболизма 5-НТ в мозге у мышей. Содержание при коротком световом дне смещает

динамику сна и бодрствования в домашней клетке, но не влияет на поведение мышей обоих генотипов в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Аллель 1473G увеличивает время депрессивно-подобной неподвижности в тесте «принудительное плавание». Содержание при коротком дне также увеличивает этот показатель, но только у мышей В6-1473С. В то же время, не выявлено влияния факторов «генотип» и «фотопериод» на депрессивно-подобную неподвижность в тесте «принудительное плавание». Это свидетельствует о том, что аллель 1473G и короткий световой день увеличивают выраженность депрессивно-подобного поведения с помощью независимых механизмов.

Таблица 6. Двухфакторный ANOVA изменений в уровне 5-НТ, 5-Н1АА и отношения 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе, стриатуме и среднем мозге у мышей линий В6-1473С и В6-1473G при содержании их в условиях стандартного (14 L : 10 D) и короткого (4 L : 20 D) светового дня.

Структура	«генотип»	«фотопериод»	взаимодействие
5-НТ			
гиппокамп	$F_{1,28}=8.99, p=0.006$	$F_{1,28}=2.49, p=0.13$	$F_{1,28}=6.45, p=0.017$
стриатум	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}=9.17, p=0.005$	$F_{1,28}=2.16, p=0.15$
средний мозг	$F_{1,27}<1$	$F_{1,27}=13.77, p<0.001$	$F_{1,27}<1$
5-Н1АА			
гиппокамп	$F_{1,28}=14.04, p<0.001$	$F_{1,28}=15.95, p<0.001$	$F_{1,28}=3.15, p=0.087$
стриатум	$F_{1,28}=11.95, p=0.002$	$F_{1,28}<1$	$F_{1,28}<1$
средний мозг	$F_{1,27}=2.95, p=0.097$	$F_{1,27}=7.61, p=0.01$	$F_{1,27}<1$
5-Н1АА/5-НТ			
гиппокамп	$F_{1,28}=2.04, p=0.16$	$F_{1,28}=23.63, p<0.001$	$F_{1,28}=9.61, p=0.004$
стриатум	$F_{1,28}=10.94, p=0.003$	$F_{1,28}=3.82, p=0.061$	$F_{1,28}=1.21, p=0.28$
средний мозг	$F_{1,27}=8.69, p=0.007$	$F_{1,27}=54.86, p<0.001$	$F_{1,27}=1.74, p=0.20$

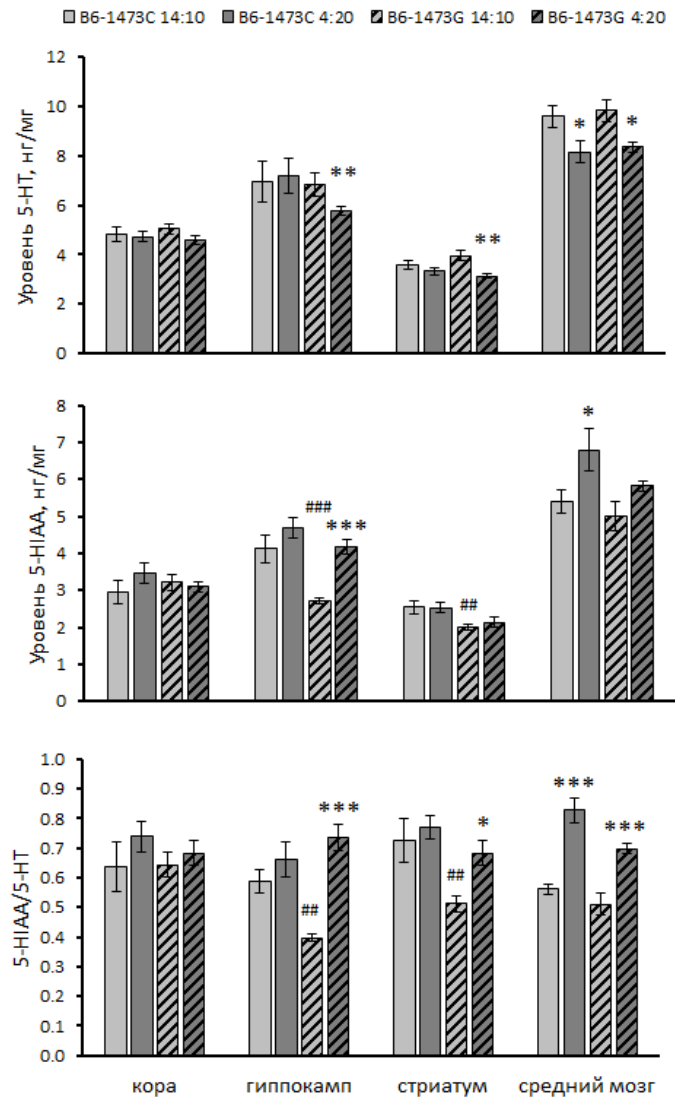


Рис.9. Уровни 5-НТ, 5-НТ (нг/мг) и отношение 5-НІАА/5-НТ в структурах мозга мышей В6-1473С и В6-1473G при содержании в условиях стандартного (14 L : 10 D) и короткого (4 L : 20 D) светового дня.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ в сравнении с мышами того же генотипа, содержащихся при стандартном световом дне; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ в сравнении с мышами В6-1473С, содержащихся при стандартном световом дне.

3.2. Влияние пола и длины светового дня на рыб вида *D. rerio* (Эксперимент 2)

3.2.1. Влияние длины светового дня на пол рыб

Результаты посмертных исследований гонад показали, что среди 58 рыб, содержащихся в течении 60 дней при стандартном световом дне

(12L:12D) было 35 самцов и 23 самки, что хорошо соответствует ожидаемому отношению 1:1 ($\chi^2 = 1.24$, $p > 0.05$). В то же время, среди 59 рыб, содержащихся в течении 60 дней при коротком световом дне (4L:20D), не обнаружено ни одной самки – все они были самцами, что свидетельствует о нарушении ожидаемого отношения 1:1 ($\chi^2 = 29.5$, $p < 0.001$).

3.2.2. Влияние пола и длины светового дня на массу тела рыб

Выявлено значительное влияние пола на массу тела рыб, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D) ($F_{1,56} = 28.9$, $p < 0.001$). Масса тела самок была больше, чем у самцов (Рис.10).

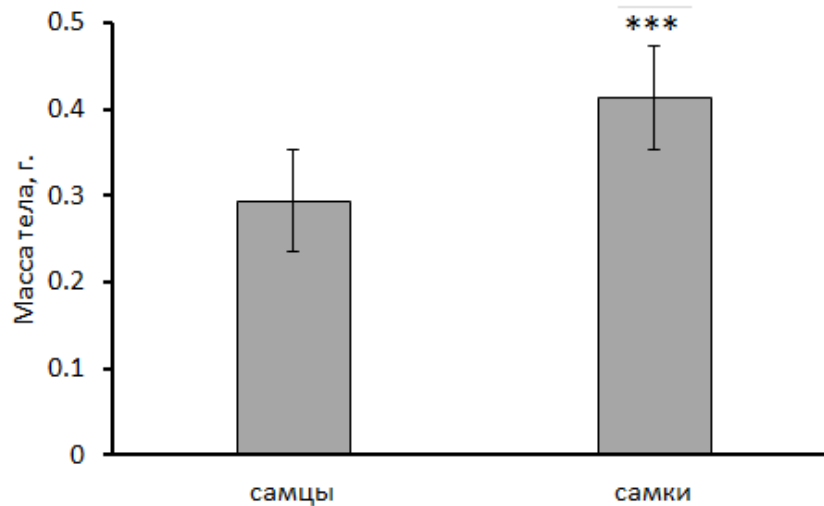


Рис.10. Масса тела (г) самцов и самок *D. rerio*, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D).

*** $p < 0.001$ в сравнении с самцами.

Было показано значительное снижение массы тела рыб, содержащихся 60 дней при коротком световом дне (4L:20D), по сравнению с содержащимися при стандартном световом дне (12L:12D) ($F_{1,115} = 18.6$, $p < 0.001$, Рис.11).

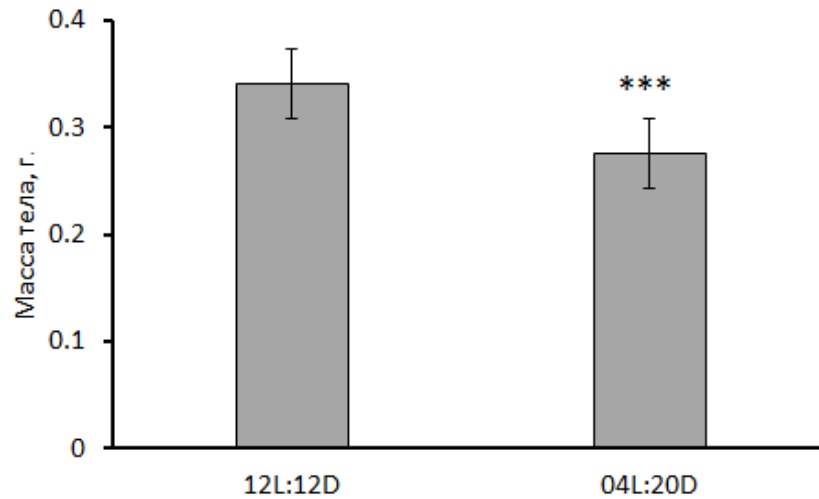


Рис.11. Масса тела *D. rerio*, содержащихся 60 дней при стандартном (12L:12D) и коротком (04L:20D) световом дне. Данные по самцам и самкам объединены, т.к. среди рыб, содержащихся при коротком дне, не было ни одной самки.

*** $p < 0.001$ в сравнении с содержанием рыб при стандартном световом дне.

3.2.3. Влияние пола и длины светового дня на поведение рыб в тесте «новый аквариум»

В эксперименте 2 для рыб, содержащихся при стандартном фотопериоде (12L:12D), не выявлено половых различий по длине пройденного пути ($F_{1,56} = 2.8$, $p = 0.1$, Рис.12), времени неподвижности ($F_{1,56} = 1.97$, $p = 0.17$, Рис.12), времени, проведенном в нижней ($F_{1,56} < 1$, Рис.12) и верхней ($F_{1,56} < 1$, Рис.12) третях аквариума.

Ввиду отсутствия половых различий по выраженности поведенческих показателей в тесте «новый аквариум», а также отсутствие самок среди рыб, содержащихся при коротком световом дне, данные по самкам и самцам были объединены. Содержание при коротком световом дне существенно уменьшало пройденный путь ($F_{1,115} = 10.02$, $p = 0.002$, Рис.13), но не влияло на время неподвижности ($F_{1,115} = 2.42$, $p = 0.12$, Рис.13), время, проведенное в нижней ($F_{1,115} = 2.7$, $p = 0.11$, Рис.13) и верхней ($F_{1,115} = 1.86$, $p = 0.18$, Рис.13) третях аквариума.

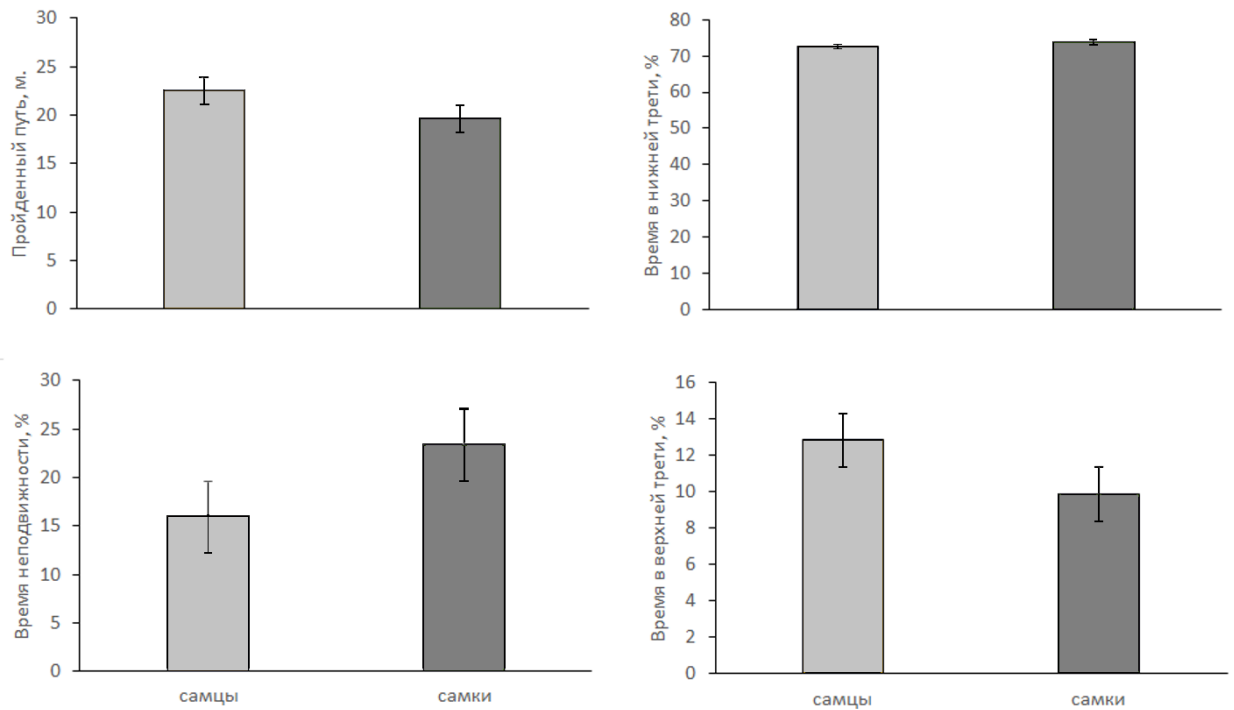


Рис.12. Пройденный путь (м), время неподвижности (%), время (%), проведенное в верхней и нижней третях аквариума в тесте «новый аквариум» у самцов и самок *D.rerio*, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D).

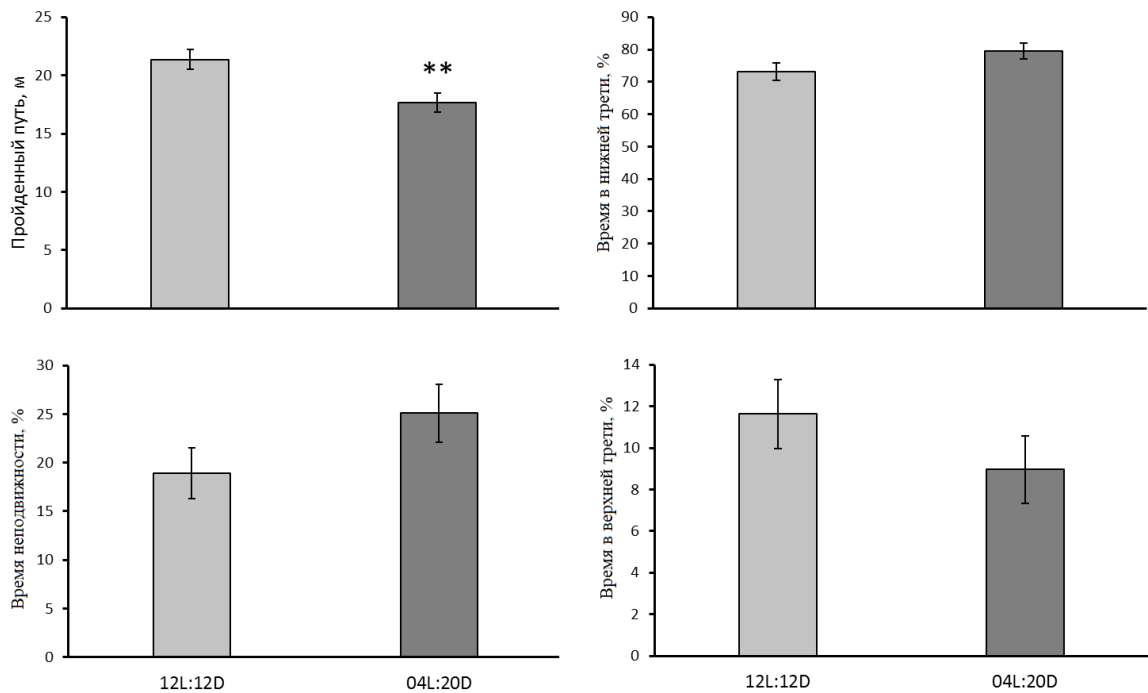


Рис.13. Пройденный путь (м), время неподвижности (%), время (%), проведенное в верхней и нижней третях аквариума в тесте «новый аквариум» у *D.rerio*, содержащихся 60 дней при стандартном (12L:12D) и коротком (04L:20D) световом дне.

** $p < 0.01$ по сравнению с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне;

3.2.4. Влияние пола и, длины светового дня на уровень 5-НТ, 5-НІАА, отношение 5-НІАА/5-НТ в мозге рыб

У рыб, содержащихся при нормальном световом дне, не выявлено половых различий по уровню 5-НТ ($F_{1,18} = 3.6$, $p = 0.07$, Рис.14), 5-НІАА ($F_{1,18} < 1$, Рис.14), однако отношение 5-НІАА/5-НТ выше в мозге самцов, чем у самок ($F_{1,18} = 5.36$, $p = 0.03$, Рис.14).

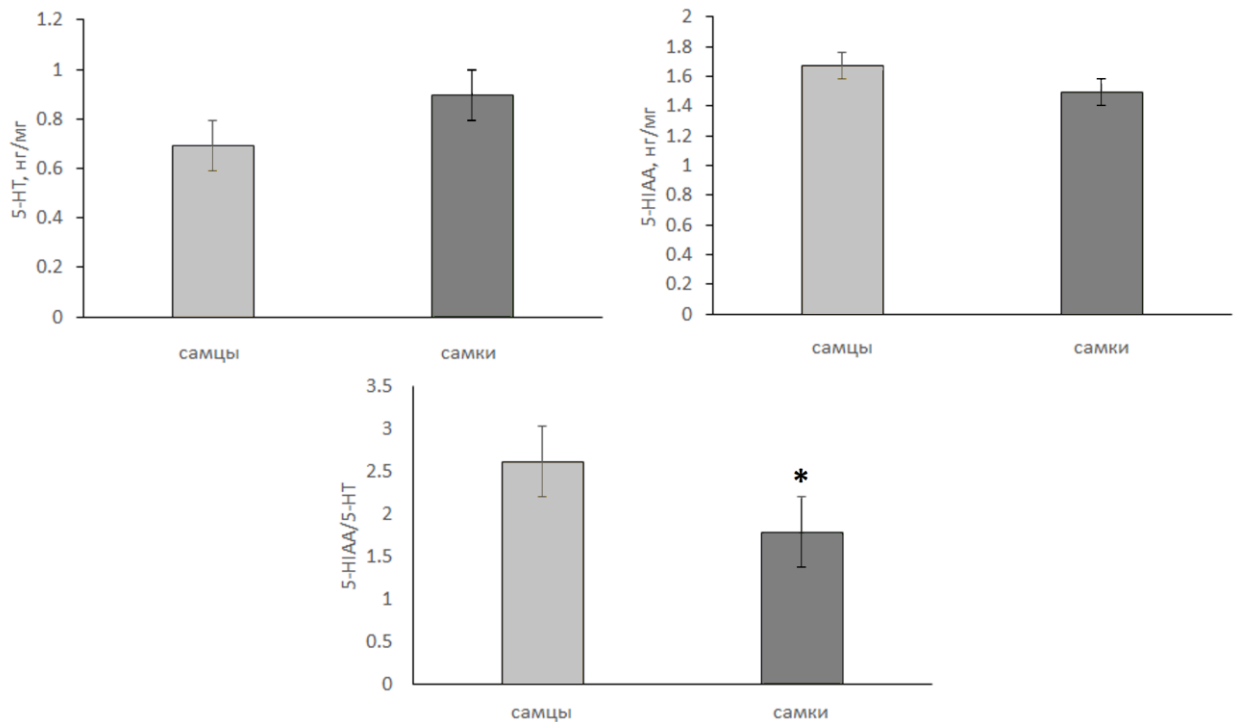


Рис.14. Содержание 5-НТ, 5-НІАА и отношение 5-НІАА/5-НТ в целом мозге у самцов и самок *D. rerio*, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D).

* $p < 0.05$ по сравнению с самцами.

Ввиду отсутствия половых различий по выраженности поведенческих показателей в тесте «новый аквариум», а также отсутствие самок среди рыб, содержащихся при коротком световом дне, данные по самкам и самцам были объединены. Содержание при коротком световом дне не изменяет 5-НТ ($F_{1,38} = 1.51$, $p = 0.23$, Рис.15) и отношение 5-НІАА/5-НТ ($F_{1,38} < 1$, Рис.15). В то же время, обнаружено увеличение уровня 5-НІАА в мозге рыб, содержащихся при коротком световом дне ($F_{1,38} = 4.89$, $p = 0.03$, Рис.15).

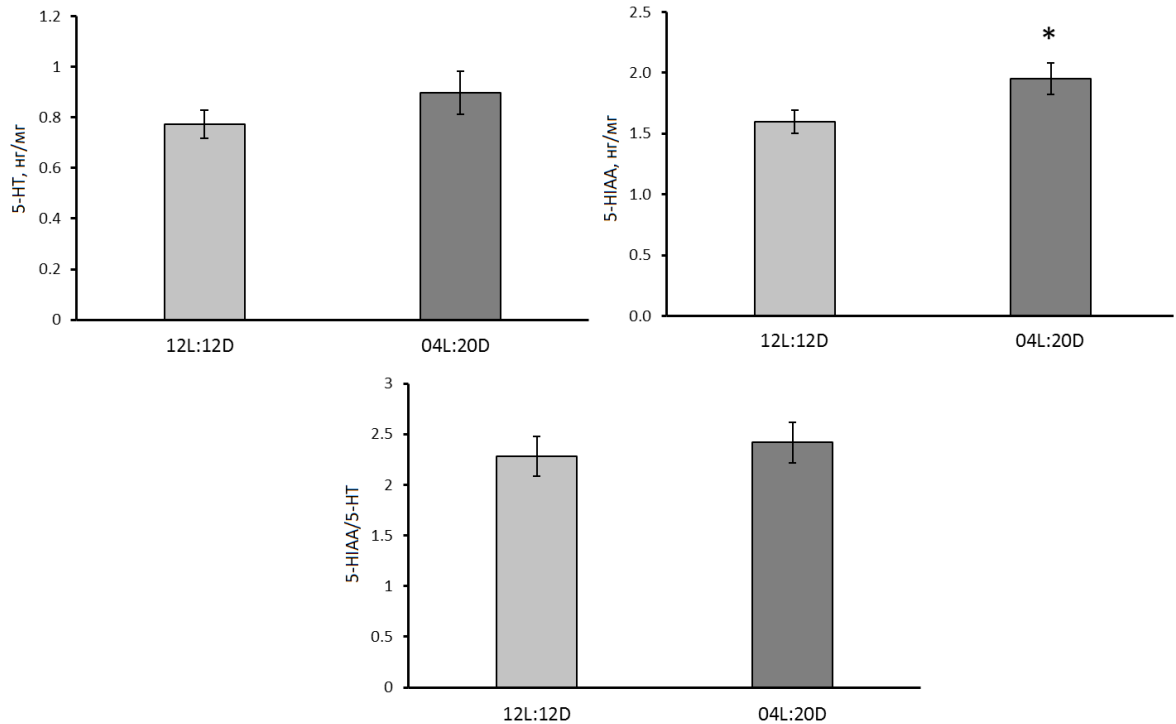


Рис.15. Содержание 5-НТ, 5-НІАА и отношение 5-НІАА/5-НТ в целом мозге у *D.rerio*, содержащихся при стандартном (12L:12D) и коротком (04L:20D) световом дне.

* $p < 0.05$ по сравнению с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне.

3.2.5. Влияние пола и длины светового дня на активности ТПГ и МАО в мозге рыб.

У рыб, содержащихся при нормальном световом дне, не выявлено половых различий по активности ТПГ ($F_{1,18} = 2.5$, $p = 0.13$, Рис.16) и МАО ($F_{1,18} < 1$, Рис.16).

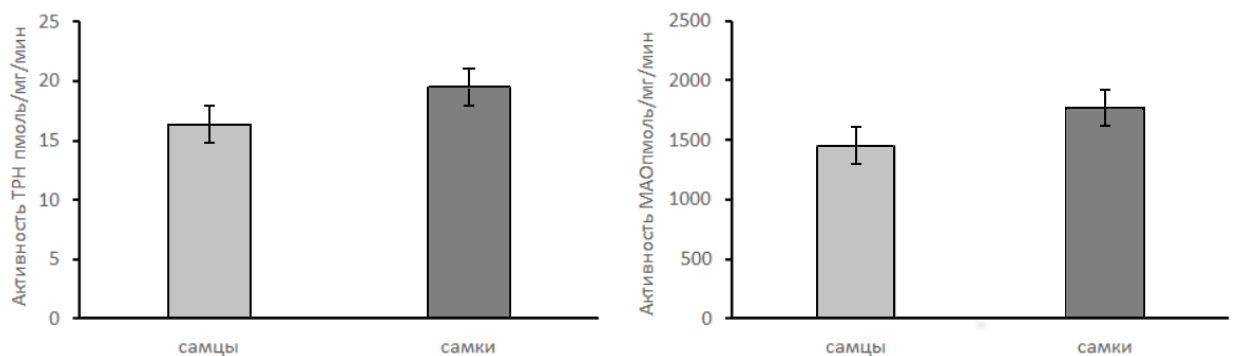


Рис.16. Активности ТПГ и МАО в целом мозге у самцов и самок *D.rerio*, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D)

Содержание при коротком световом дне также не изменяет активность ТПГ ($F_{1,38} = 2.14$, $p = 0.15$, Рис.17) и MAO ($F_{1,38} < 1$, Рис.17).

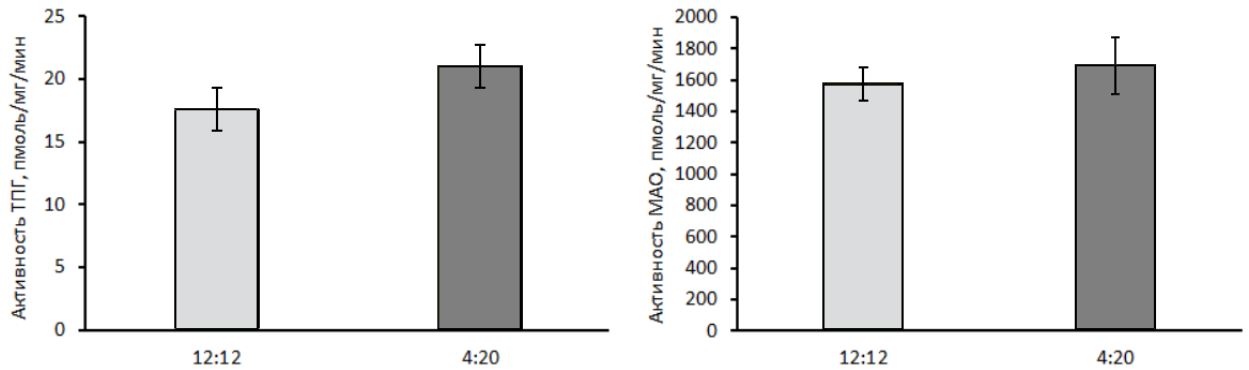


Рис.17. Активности ТПГ и MAO в целом мозге у *D. rerio*, содержащихся при стандартном (12L:12D) и коротком (04L:20D) световом дне.

3.2.6. Влияние пола и, длины светового дня на экспрессию генов *Trp1a*, *Trp1b*, *Trp2*, *Maо*, *Slc6a4*, *Htr1aa*, *Htr2aa* в мозге рыб

Не выявлено различий в уровнях мРНК генов *Trp1a*, *Trp1b*, *Trp2*, *Maо*, *Slc6a4*, *Htr1aa*, *Htr2aa* в головном мозге самцов и самок, содержащихся при нормальном световом дне (Табл. 7).

Содержание при коротком световом дне снижает уровень мРНК гена *Maо* ($F_{1,36} = 4.95$, $p = 0.03$) (Табл. 8). В то же время, длина светового дня не влияла на уровень мРНК генов *Trp1a*, *Trp1b*, *Trp2*, *Slc6a4a*, *Htr1aa*, *Htr2aa*, в мозге рыб (Табл. 8).

Таблица 7. Уровень мРНК генов *Tph1a*, *Tph1b*, *Tph2*, *Slc6a4a*, *Mao*, *Htr1aa*, *Htr2aa*, в целом мозге самцов и самок *D. rerio*, содержащихся при стандартном (12L:12D) световом дне.

Ген	Самцы	Самки	F
<i>Tph1a</i>	19.40 ± 2.30	20.63 ± 3.31	F(1,18) < 1
<i>Tph1b</i>	8.587 ± 1.23	11.17 ± 3.82	F(1,18) < 1
<i>Tph2a</i>	13.92 ± 2.10	12.64 ± 2.30	F(1,18) < 1
<i>Slc6a4a</i>	9.08 ± 0.91	10.75 ± 2.08	F(1,18) < 1
<i>Mao</i>	10.46 ± 1.71	8.33 ± 1.03	F(1,18) < 1
<i>Htr1aa</i>	8.93 ± 0.50	9.20 ± 1.43	F(1,18) < 1
<i>Htr2aa</i>	34.04 ± 2.32	38.62 ± 7.63	F(1,18) < 1

Таблица 8. Уровень мРНК генов *Tph1a*, *Tph1b*, *Tph2*, *Slc6a4a*, *Mao*, *Htr1aa*, *Htr2aa* в целом мозге *D. rerio*, содержащихся при стандартном (12L:12D) и коротком (4L:20D) световом дне.

Ген	12L:12D	4L:20D	F
<i>Tph1a</i>	19.83 ± 1.84	20.59 ± 1.90	F(1,36) < 1
<i>Tph1b</i>	9.48 ± 1.52	9.18 ± 1.57	F(1,36) < 1
<i>Tph2a</i>	13.47 ± 1.55	13.89 ± 1.86	F(1,36) < 1
<i>Slc6a4a</i>	9.67 ± 0.92	9.96 ± 1.07	F(1,36) < 1
<i>Mao</i>	9.72 ± 1.17	6.24 ± 1.01	F(1,36) = 4.95, p = 0.03
<i>Htr1aa</i>	9.03 ± 0.57	9.96 ± 1.07	F(1,36) < 1
<i>Htr2aa</i>	35.64 ± 2.98	39.99 ± 4.57	F(1,36) < 1

3.3. Влияние длины светового дня и рСРА на рыб вида *D.rerio* (Эксперимент 3)

3.3.1. Влияние длины светового дня и рСРА на пол рыб

Среди 18 рыб, содержащихся при коротком световом дне (4L:20D), не было ни одной самки, тогда как в группе рыб, содержащихся при стандартном световом дне (12L:12D), было 9 самок и 10 самцов (p=0.0011). Хроническое воздействие рСРА не влияло на пол. Среди рыб, содержавшихся

при стандартном световом дне (12L:12D), в контрольной группе было 5 самок и 5 самцов, а в группе, получавшей рСРА, было 4 самки и 5 самцов ($p=1.0$). Таким образом, в двух независимых экспериментах показана полная маскулинизация самок рыб, содержащихся длительное время при коротком световом дне.

3.3.2. Влияние длины светового дня и рСРА на массу тела рыб

Выявлено влияние фактора «фотопериод» ($F_{1,32}=8.05$, $p=0.009$), но не фактора «рСРА» ($F_{1,32}<1$) или взаимодействия факторов ($F_{1,32}<1$) на массу тела рыб. Масса тела рыб, содержащихся при коротком световом дне была меньше по сравнению с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне (Рис.18).

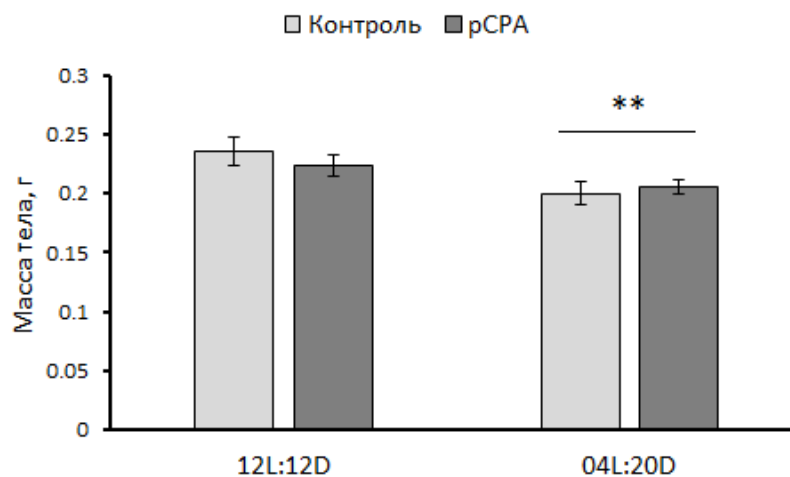


Рис.18. Масса тела *D. rerio*, содержащихся 30 дней при стандартном (12L:12D), коротком (04L:20D) световом дне, в присутствии и отсутствии рСРА (5 мг/л). Данные по самцам и самкам объединены, т.к. среди рыб, содержащихся при коротком дне, не было ни одной самки.

** $p<0.001$ в сравнении с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне.

Таким образом, в двух независимых эксперимента показано снижение массы тела у рыб, содержащихся длительное время при коротком световом дне.

3.5.3. Влияние длины светового дня и рСРА на активность рыб в домашнем аквариуме.

Для уменьшения влияния случайных отклонений в двигательной активности (скорость изменения силуэта), время нахождения в верхней и нижней третях домашнего аквариума эти значения по каждому аквариуму усреднялись в течении всего периода регистрации за 7 дней. Ни для одного из этих показателей не было выявлено влияния факторов «фотопериод», «рСРА», их взаимодействия, «время экспозиции» (неделя экспозиции), взаимодействий «время экспозиции» x «фотопериод», «время экспозиции» x «рСРА» и «время экспозиции» x «фотопериод» x «рСРА» (Табл.9, Рис.19).

Таким образом, ни длительное содержание рыб при коротком световом дне ни воздействие рСРА не влияет на среднюю двигательную активность и пространственное предпочтение группы рыб в домашнем аквариуме.

Таблица 9. Двухфакторный ANOVA динамики двигательной активности (средняя скорость изменения силуэта), время нахождения в верхней и нижней третях домашнего аквариума у рыб, содержащихся 30 дней при стандартном (12L:12D), коротком (04L:20D) световом дне, в присутствии или отсутствии рСРА (5 мг/л).

Фактор	F	P
Средняя скорость изменения силуэта		
«фотопериод»	$F_{1,4} < 1$	
«рСРА»	$F_{1,4} < 1$	
«фотопериод» x «рСРА»	$F_{1,4} < 1$	
«время экспозиции»	$F_{3,12} = 1.03$	0.41
«время» x «фотопериод»	$F_{3,12} < 1$	
«время» x «рСРА»	$F_{3,12} < 1$	
«время» x «фотопериод» x «рСРА»	$F_{3,12} = 1.59$	0.24
Время в верхней трети		
«фотопериод»	$F_{1,4} < 1$	0.36
«рСРА»	$F_{1,4} < 1$	
«фотопериод» x «рСРА»	$F_{1,4} 1.04$	
«время экспозиции»	$F_{3,12} = 1.80$	0.20
«время» x «фотопериод»	$F_{3,12} < 1$	
«время» x «рСРА»	$F_{3,12} < 1$	
«время» x «фотопериод» x «рСРА»	$F_{3,12} = 2.93$	0.077
Время в нижней трети		
«фотопериод»	$F_{1,4} = 1.51$	0.29
«рСРА»	$F_{1,4} < 1$	
«фотопериод» x «рСРА»	$F_{1,4} < 1$	
«время экспозиции»	$F_{3,12} = 3.01$	0.072
«время» x «фотопериод»	$F_{3,12} = 1.91$	0.18
«время» x «рСРА»	$F_{3,12} = 2.79$	0.085
«время» x «фотопериод» x «рСРА»	$F_{3,12} = 1.96$	0.17

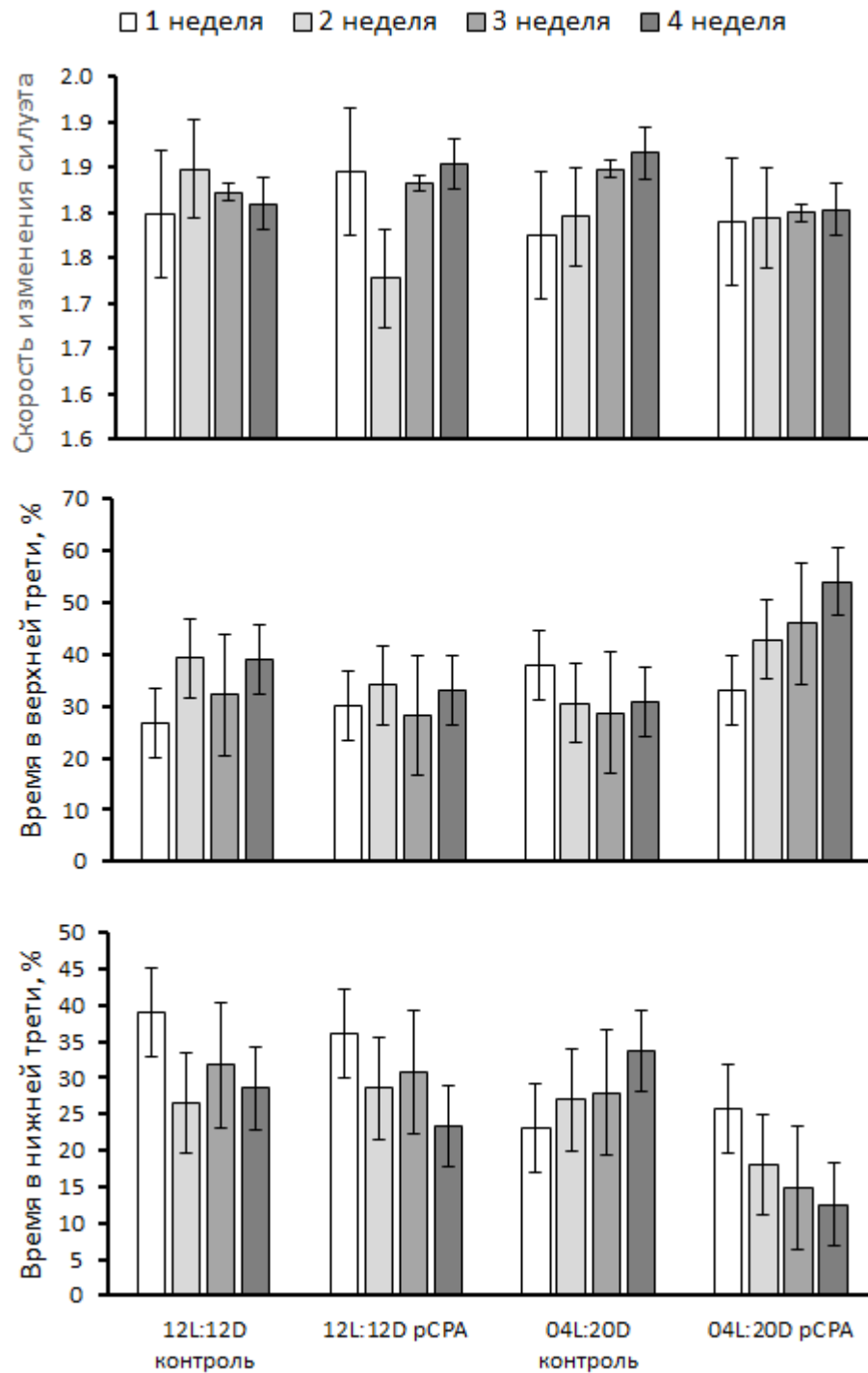


Рис.19. Динамика изменений средней двигательной активности (средняя скорость изменения силуэта), времени в верхней и нижней третях аквариума для группы рыб при их содержании при стандартном (12L:12D), коротком (04L:20D) световом днем в отсутствие (контроль) и в присутствии рСРА (5 мг/л).

3.3.4. Влияние длины светового дня и рСРА на поведение рыб в тесте «новый аквариум»

Было показано, что рыбы в 4 экспериментальных группах не различались по времени неподвижности ($F_{3,33}<1$), времени в верхней ($F_{3,33}<1$) и нижней ($F_{3,33}<1$) третях кюветы (Рис.20). В то же время, экспериментальные группы различались по величине пройденного расстояния ($F_{3,33} = 5.39$, $p=0.004$). Двухфакторный ANOVA выявил существенные эффекты факторов «фотопериод» ($F_{1,33}=7.9$, $p=0.008$) и «рСРА» ($F_{1,33}=8.4$, $p=0.007$), но не их взаимодействия ($F_{1,33}<1$) на пройденное расстояние. Содержание при коротком световом дне уменьшало (-13.7%), тогда как рСРА увеличивал (+16,5%) этот показатель у рыб (Рис.20). При этом, рСРА увеличивал пройденный путь только у рыб, содержащихся при стандартном световом дне

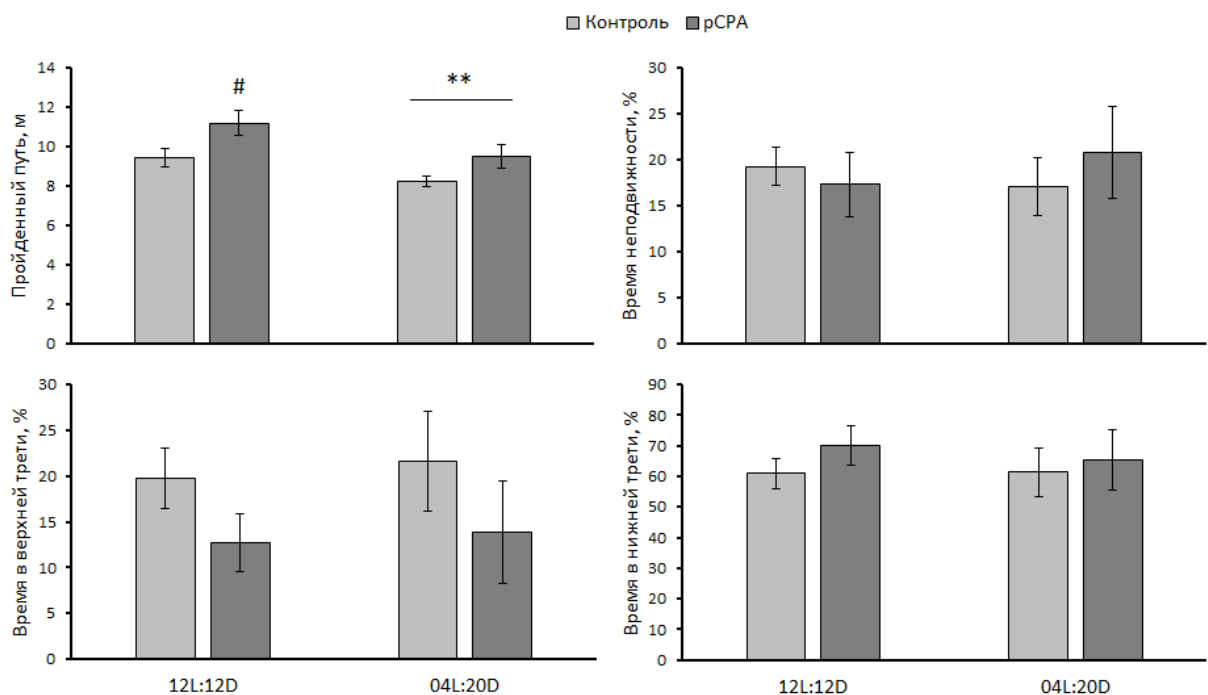


Рис.20. Пройденный путь (м), время неподвижности (%), время (%), проведенное в верхней и нижней третях аквариума в тесте «новый аквариум» у самцов и самок *D.rerio*, содержащихся 30 дней при стандартном (12L:12D), коротком (04L:20D) световом дне, в отсутствии (контроль) и присутствии рСРА (5 мг/л).

** $p<0.01$ в сравнении с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне (12L:12D); # $p<0.05$ в сравнении с соответствующим контролем.

Таким образом, в двух независимых экспериментах, проведенных на рыбах разного возраста (6 недель и 12 недель), содержащихся при стандартном и коротком световом дне в течении разного времени (60 и 30 дней) выявленное сходное снижение двигательной активности у рыб, содержащихся при коротком световом дне. Длительное воздействие рСРА увеличивает двигательную активность в тесте «новый аквариум».

3.3.5. Уровень рСРА в мозге рыб

Длительно воздействие рСРА увеличивало концентрацию данного вещества в мозге рыб, содержащихся при стандартном и коротком дне до 12.97 ± 0.87 мкг/мг и 11.30 ± 0.57 мкг/мг, соответственно.

3.3.6. Влияние длины светового дня и рСРА на уровень 5-НТ, 5-НИАА, отношение 5-НИАА/5-НТ в мозге рыб

Рыбы 4 групп не различались по уровню 5-НТ в их мозге ($F_{3,33} < 1$), однако они различались по уровню 5-НИАА ($F_{3,33} = 157.07$, $p < 0.001$) и по отношению 5-НИАА/5-НТ ($F_{3,33} = 25.24$, $p < 0.001$). Выявлено существенное влияние фактора «рСРА» (5-НИАА, $F_{1,33} = 470.3$, $p < 0.001$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{1,33} = 72.0$, $p < 0.001$), но не фактора «фотопериод» (5-НИАА, $F_{1,33} < 1$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{1,33} = 1.15$, $p = 0.29$) и взаимодействия факторов (5-НИАА, $F_{1,33} = 1.98$, $p = 0.17$; 5-НИАА/5-НТ, $F_{1,33} = 1.4$, $p = 0.25$) на уровень 5-НИАА и отношение 5-НИАА/5-НТ. Хроническое воздействие рСРА не влияло на уровень 5-НТ, но драматически снижало уровень 5-НИАА ($p < 0.001$) и отношение 5-НИАА/5-НТ ($p < 0.001$) у рыб содержащихся как при стандартном, так и при коротком световом дне (Рис.21). В то же время, наблюдалась тенденция к увеличению уровня 5-НИАА ($p = 0.1$) и отношения 5-НИАА/5-НТ ($p = 0.1$) у рыб, содержащихся при коротком световом дне (Рис.21).

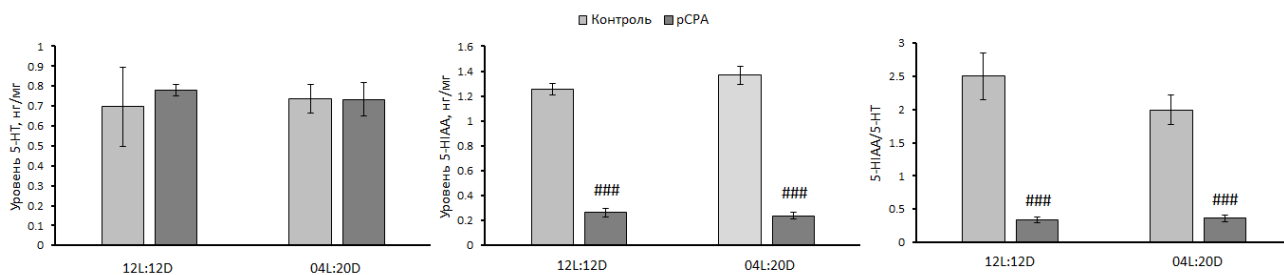


Рис.21. Содержание 5-НТ, 5-НИАА и отношение 5-НИАА/5-НТ в целом мозге у *D.rerio*, содержащихся 30 дней при стандартном (12L:12D), коротком (04L:20D) световом дне, в отсутствии (контроль) и присутствии pCPA (5 мг/л). (Эксперимент 5).

$p < 0.1$ в сравнении с соответствующим контролем.

3.3.7. Влияние длины светового дня и pCPA на экспрессию генов *Trh1a*, *Trh1b*, *Trh2*, *Mao*, *Htr1aa*, *Htr2aa* в мозге рыб

Рыбы 4 групп не различались по уровню мРНК генов *Trh1b* ($F_{3,33}=2.02$, $p=0.13$), *Mao* ($F_{3,33}<1$), *Htr1aa* ($F_{3,33}=2.06$, $p=0.13$), *Htr2aa* ($F_{3,33}=1.3$, $p=0.29$). В то же время, они существенно отличаются по экспрессии генов *Trh1a* ($F_{3,33}=5.45$, $p=0.004$), и *Trh2* ($F_{3,33}=5.52$, $p=0.004$). Двухфакторный ANOVA выявил существенное влияние факторов «фотопериод» ($F_{1,33}=9.01$, $p=0.005$) и «pCPA» ($F_{1,33}=5.21$, $p=0.029$), но не их взаимодействия ($F_{1,33}=2.12$, $p=0.16$) на экспрессию гена *Trh1a* в мозге. Содержание при коротком дне (короткий день, 25.39 ± 2.51 ; стандартный день, 17.08 ± 1.6 , $p=0.005$; +48.6%) и pCPA (pCPA, 24.4 ± 2.54 ; контроль, 18.08 ± 1.81 , $p=0.029$; +35%) увеличивают уровень мРНК данного гена (Рис.22). Показано влияние фактора «pCPA» ($F_{1,33}=15.63$, $p<0.001$), но не фактора «фотопериод» ($F_{1,33}<1$) и их взаимодействия ($F_{1,33}<1$) на экспрессию гена *Trh2*. Длительное введение pCPA почти вдвое увеличивает уровень мРНК гена *Trh2* (+97.5%, Рис.22).

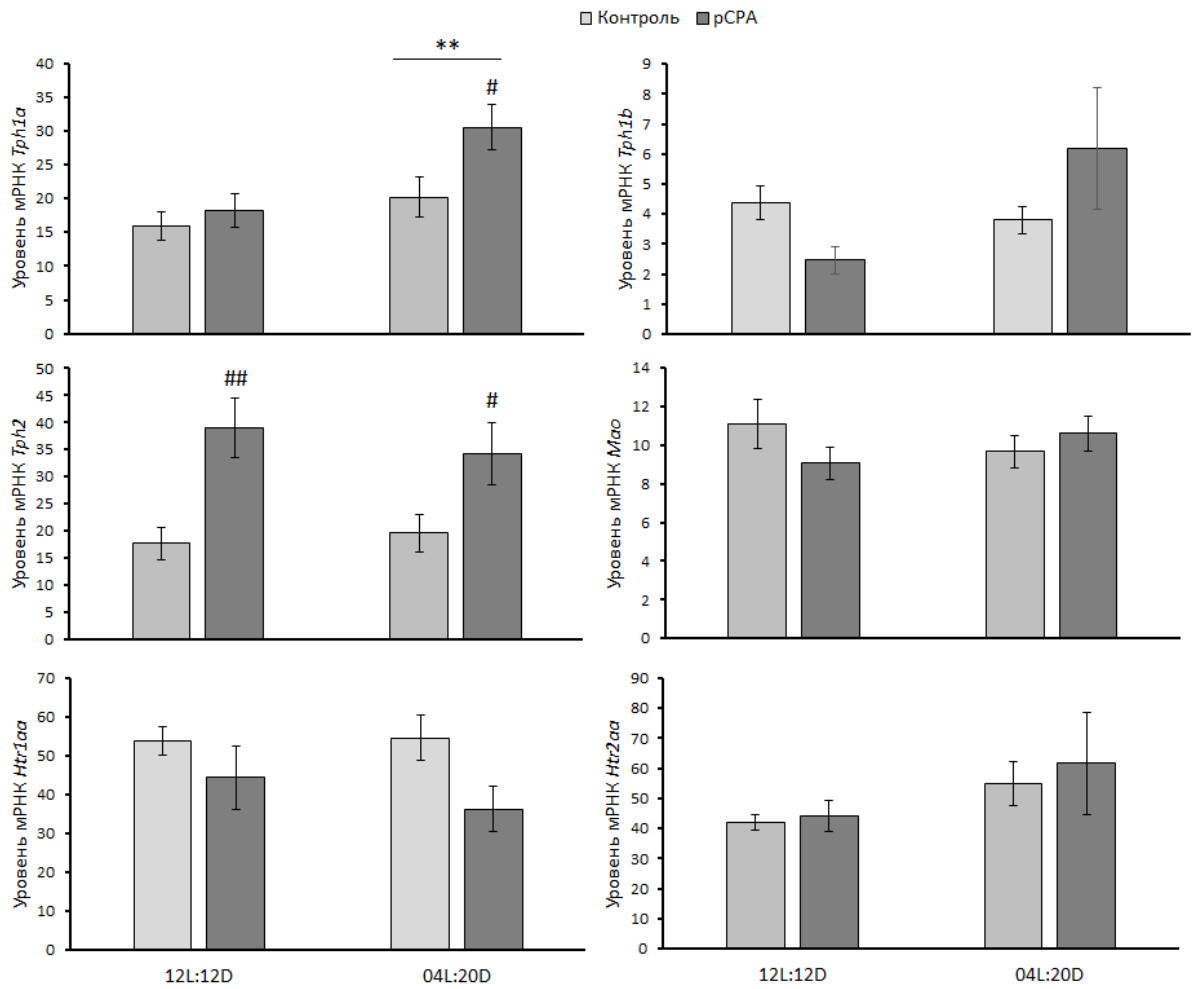


Рис.22. Экспрессия генов *Trh1a*, *Trh1b*, *Trh2*, *Mao*, *Htr1aa*, *Htr2aa* в мозге рыб *D. rerio*, содержащихся 30 дней при стандартном, коротком световом дне, в отсутствии (контроль) и присутствии pCPA (5 мг/л).

** $p < 0.01$ в сравнении с рыбами, содержащимися при стандартном световом дне;
 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ в сравнении с соответствующим контролем.

Глава 4. Обсуждение результатов

Основной целью данного исследования было экспериментальное изучение влияния длительного воздействия короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и регулируемые ею формы поведения. В качестве модельных организмов были выбраны лабораторные мыши линии C57BL/6, для которых были выявлены нарушения поведения и 5-НТ системы при их содержании при коротком световом дне (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015), и лабораторные рыбы вида *D. rerio*, 5-НТ система которых имеет высокую гомологию с таковой млекопитающих (Gaspar, Lillesaar, 2012; Panula et al., 2010; Herculeano et al., 2014). В качестве регулируемых 5-НТ форм поведения в исследовании на мышах были выбраны двигательная активность и тревожность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», а также депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание», которые регулируются 5-НТ (Bourin, 2015; Cryan, Holmes, 2005a; Ennaceur, Chazot, 2016; Holmes et al., 2002; Kara et al., 2018; McDevitt, Naumaier, 2011; Milner, Crebbe, 2008; Treit et al., 2010). В исследованиях на рыбах в качестве регулируемого 5-НТ поведения были выбраны двигательная активность и тревожность в тесте «новый аквариум» (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014; Maximino et al., 2013; Herculeano et al., 2014).

Второй, но не менее значимой целью было выяснение влияния активности ключевого фермента синтеза 5-НТ, триптофангидроксилазы, на выраженность реакции 5-НТ системы мозга и поведения на содержание при коротком световом дне. В качестве модели снижения активности ТПГ в эксперименте на мышах была выбрана мутация *C1473G* в гене *Trh2*, а в опытах на рыбах – хроническое введение ингибитора ТПГ, рСРА. Предполагалось, что снижение активности ТПГ будет усугублять (усиливать)

негативное влияние содержания при коротком дне на 5-НТ систему и поведение.

Были проведены три абсолютно оригинальных, но связанных между собой исследований: (1) сравнение влияния длительного содержания при коротком световом дне на поведение и 5-НТ систему мозга мышей с наследственными различиями по активности ТПГ2 в мозге, вызванными мутацией *C1473G* в гене *Tph2* и (2-3) влияние длительного содержания при коротком световом дне в отсутствии или присутствии ингибитора ТПГ, рСРА, на поведение и 5-НТ систему мозга рыб вида *D. rerio*.

Мы исходили из общепринятого представления о том, что САР является разновидностью депрессивных нарушений и, следовательно, нарушения функциональной активности 5-НТ системы мозга (Maes, Meltzer, 1995; Van Praag, 2004) способны усиливать риск депрессивных психозов. Однако клинические наблюдения и экспериментальные исследования связи между нарушениями 5-НТ системы мозга и САР достаточно противоречивы и не позволяют сделать однозначного вывода по данным вопросам (Kulikov, Porova, 2015). Следует учесть, что САР рассматриваются как атипичные депрессивные расстройства (Levitan, 2007) и поэтому влияние недостатка 5-НТ на выраженность САР и типичной (major) депрессии могут существенно различаться.

Существуют определенные трудности при моделировании механизмов депрессивных расстройств и САР на лабораторных грызунах: (1) невозможность полностью воспроизвести депрессивную симптоматику и (2) проявления «депрессивной» симптоматики и тревожности у грызунов не имеют однозначной интерпретации. Так, увеличение неподвижности в тесте «принудительное плавание», который является основным тестом на антидепрессантную активность, одни авторы интерпретируют как признак депрессивного отчаяния мотивируя это тем, что большинство

антидепрессантов снижают время неподвижности (Porsolt et al., 1977; Kara et al., 2018), тогда как другие исследователи, напротив, рассматривают это увеличение неподвижности как адаптивную реакцию на неизбежную стрессорную ситуацию (Commons et al., 2017).

До недавнего времени основным препятствием экспериментального изучения механизмов САР является отсутствие корректных моделей этого заболевания на организмах, физиология, генетика и молекулярная биология которых достаточно полно изучена. Ситуация изменилась, когда было показано, что длительное (3 недели) содержание при коротком световом дне (08L:16D) увеличивает тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», депрессивно-подобную неподвижность в тесте «принудительное плавание» и снижает уровень 5-НТ в некоторых структурах мозга у молодых (возраст до момента эксперимента 5-6 недель) мышей линии C57BL/6 (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015). Поскольку физиология, генетика и молекулярная биология мышей этой линии изучены хорошо, результаты данных авторов открывают большие перспективы для экспериментального исследования физиологических, генетических и молекулярных механизмов САР.

Работы этих авторов (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015) были положены в основы настоящего исследования. На момент начала наших исследований по данной модели имелось только две эти публикации, причем выполненные в одной и той же лаборатории, стояла проблема воспроизводимости этой модели. Поэтому вспомогательной, но необходимой, задачей нашего исследования была верификация модели Otsuka. Мы несколько изменили протокол воздействия: вдвое уменьшили время световой фазы (до 04L:20D) и увеличили время воздействия с 3 (как у Otsuka et al., 2014) до 4 недель (Vazhenova et al., 2017; Vazhenova et al., 2019a,b; Хоцкин и др., 2019; Фурсенко и др., 2019). Такая продолжительность светового дня

соответствует зимнему периоду на 60-64 параллели, где расположены экономически важные зоны (Петрозаводск, Савтывкар, Мирный, Сургут, Нижневартовск и др.). Выбор стандартного фотопериода 14L:10D определяется принятым режимом SPF вивария и он соответствует летнему периоду на широте 30-40 (Средиземноморье, Средняя Азия). Следующим изменением модели Otsuka было использование половозрелых самцов мышей в нашем исследовании. Обоснованием этого изменения служит то, что мы хотели промоделировать развитие САР у взрослых особей при переезде их (на работу или жительство) в высокие широты.

В данном исследовании эта модифицированная модель воздействия коротким световым днем была впервые применена для выявления вопроса о влиянии генетически детерминированного снижения активности ТПГ2, вызванного мутацией *C1473G* в гене *Tph2*, на риск и тяжесть симптоматики САР.

Было показано, аллель *1473G*, снижающая активность ТПГ2, увеличивает время депрессивно-подобного замирания в тесте «принудительное плавание» (Bazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019) у мышей В6-1473G по сравнению с животными В6-1473С при их содержании при стандартном световом дне. Следует подчеркнуть, что связь активности ТПГ2 с выраженностью депрессивно-подобного поведения довольно противоречива. Некоторые авторы сообщают об увеличении (Mosienko et al., 2012), тогда как другие, напротив, об уменьшении (Savelieva et al., 2008) времени неподвижности в тесте «принудительное плавание» у мышей с нокаутом гена *Tph2*. Мутация *G1449A* в гене *Tph2*, вызывающая пятикратное снижение активности ТПГ2, увеличивает депрессивно-подобную неподвижность в тесте «подвешивание за хвост» (Beaulieu et al., 2008; Jacobsen et al., 2012a,b). Японские исследователи не обнаружили влияния мутации *C1473G* в гене *Tph2* на выраженность депрессивно-подобного

поведения в тесте «принудительное плавание» (Koshimizu et al., 2019). По видимому, связь депрессивно-подобного поведения с активностью ТПГ2 зависит также от других генетических факторов.

В работе был полностью подтвержден результат японских коллег (Otsuka et al., 2014) и установлено, что содержание мышей C57BL/6 (в данном исследовании это B6-1473C) при коротком световом дне увеличивает депрессивно-подобную неподвижность в тесте «принудительное плавание» (Bazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019). Важно отметить, что этот результат был нами подтвержден в другом эксперименте, который не вошел в диссертацию, по содержанию молодых мышей линий C57BL/6 и C57BL/6-AY с мутацией lethal yellow (Bazhenova et al., 2019; Фурсенко и др., 2019), вызывающей ожирение (Boston et al., 1997; Bazhan et al., 2013) и нарушения поведения (Khotskin et al., 2019).

Ранее было показано, что содержание при коротком световом дне усиливает тревожность у молодых самцов (6 недель в начале эксперимента), что выражается в уменьшении времени в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (Otsuka et al., 2014). Настоящий эксперимент проводился на половозрелых мышах (возраст 11 недель) и не было обнаружено вызванного увеличения тревожности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (Bazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019). Однако в другом эксперименте, который не включен в данную диссертацию, было показано, что содержание молодых мышей (6 недель) при коротком световом дне увеличивает их тревожность в данных тестах (Bazhenova et al., 2019; Фурсенко и др., 2019). По-видимому, влияние короткого дня на тревожность проявляется только на молодых мышах.

Японские исследователи показали снижение уровня 5-НТ в среднем мозге и амигдале у мышей, содержащихся при коротком световом дне по сравнению с содержащимися при длинном дне (Goda et al., 2015). В

настоящем исследовании было показано, что содержание при коротком световом дне снижает уровень 5-НТ, но повышает уровень 5-Н1АА в гиппокампе и среднем мозге (Vazhenova et al., 2017).

Таким образом, полученные нами результаты полностью верифицируют и развивают модель CAP, предложенную японскими исследователями (Otsuka et al., 2014). Полученные нами (Vazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019; Vazhenova et al., 2019; Фурсенко и др., 2019) и нашими коллегами (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015) результаты однозначно свидетельствуют об усилении тревожности, депрессивно-подобного поведения и нарушения метаболизма 5-НТ в мозге при содержании мышей при коротком световом дне, что соответствует *face, predict* и *construct validity* данной модели CAP.

В работе мы использовали эту модифицированную модель для изучения влияния сниженной активности ТПГ2, вызванной полиморфизмом *C1473G* в гене *Trph2* на устойчивость/чувствительность к содержанию при коротком дне. Как было сказано выше, сниженная активность 5-НТ являются факторами риска депрессивных расстройств. Поэтому, было предположено, что аллель *1473G* будет усиливать нарушения 5-НТ системы мозга и регулируемого 5-НТ поведения, вызванные содержанием при коротком дне.

Единственным строгим доказательством этого предположением является статистически значимый эффект взаимодействия «генотип» x «фотопериод». В нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимого влияния этого взаимодействия на выраженность депрессивно-подобного поведения (Хоцкин и др., 2019). В то же время, во всех случаях достоверное повышение депрессивности (увеличение времени неподвижности в тесте «принудительное плавание») при воздействии коротким световым днем наблюдалось только у мышей с активностью ТПГ2 дикого типа, но не у животных со сниженной мутацией *C1473G* активностью

фермента. Это можно объяснить тем, что у животных с мутацией *C1473G* выраженность депрессивного поведения и так высока, практически на максимуме, и дальнейшее ее увеличение за счет короткого светового дня уже невозможно. Подтверждением этой точки зрения служит то, что содержание мышей *C57BL/6-A^Y* при коротком световом дне не может дополнительно увеличить высокое время неподвижности, вызванное мутацией *lethal yellow* (Vazhenova et al., 2019; Фурсенко и др., 2019). Данное обстоятельство позволяет интерпретировать отсутствие статистически значимого взаимодействия не как строгое доказательство отсутствия влияния сниженной активности ТПГ2 на риск САР, а, скорее всего, как невозможность доказать эти положения в рамках используемой модели, когда эффект одного из факторов (мутация) достаточно силен и способен экранировать эффект взаимодействия.

В то же время, был выявлен статистически значимый эффект взаимодействия «генотип» x «фотопериод» на уровень 5-НТ и отношение 5-Н1АА/5-НТ в гиппокампе: содержание при коротком световом дне снижало уровень 5-НТ, но увеличивало уровень 5-Н1АА и отношение 5-Н1АА/5-НТ в этой структуре только у мышей *B6-1473G*. Иными словами 5-НТ система гиппокампа у мышей с наследственным снижением активности ТПГ2 более чувствительна к содержанию при коротком дне, чем у животных с активностью ТПГ2 дикого типа.

Моделирование САР на мышах линии *C57BL/6* сталкивается с двумя существенными проблемами: (1) это сумеречные и ночные животные и, следовательно, укорочение продолжительности светлой фазы дня для них не будет сильно травмирующим фактором по сравнению с дневными животными и (2) у мышей данной линии нарушен синтез мелатонина в эпифизе вследствие нокаута гена, кодирующего ключевой фермент синтеза меланина, арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы, и поэтому у данной линии

не существует суточной и сезонной ритмики уровня данного гормона в крови (Roseboom et al., 1998; Otsuka et al., 2014). Последнее обстоятельство не позволяет использовать данных мышей в качестве адекватной модели САР в рамках фотопериодической гипотезы и гипотезы сдвига фазы. Поэтому актуальным является поиск лабораторного организма, который был бы более адекватен для моделирования механизмов САР. Этот модельный организм должен (1) быть хорошо изученным с позиций физиологии, генетики и молекулярной биологии лабораторным организмом; (2) иметь высокую нейрональную и молекулярную гомологию с человеком; (3) вести дневной образ жизни и (4) иметь циркадную ритмику мелатонина.

Из всех известных лабораторных организмов этим требованиям соответствует только один – рыбы вида *D. rerio*. Физиология, генетика и молекулярная биология этих рыб изучены так же хорошо, как и у мыши. Их 5-НТ система мозга гомологична 5-НТ системе мозга млекопитающих (Panula et al., 2010; Lillesaar, 2011; Gaspar, Lillesaar, 2012; Maximino et al., 2013; Herculano et al., 2014). Наконец, мелатонин играет у данных рыб ту же роль в регуляции циркадных ритмов, как и у млекопитающих (Levitas-Djerbi, Appelbaum, 2017; Elbaz et al., 2013; Lima-Cabello et al., 2014; Genario et al., 2019; Aranda-Martínez et al., 2022). Более того, рыбы этого вида широко используются для моделирования механизмов различных психопатологий (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014).

В данном исследовании *D. rerio* впервые были применены для моделирования САР и изучения роли 5-НТ мозга в механизме САР. Было проведено два эксперимента (эксперименты 2 и 3). Эксперимент 2 проведен на большом количестве особей ($n = 120$), что позволило исследовать влияние длины светового дня не только на физиологию и поведение, но и на уровень и метаболизм 5-НТ, активности ТПГ и МАО, экспрессию генов, кодирующих разные формы ТПГ, МАО, транспортер и основные типы рецепторов

медиатора. Эксперимент 3 был проведен на малом числе особей ($n = 40$) с целью уточнения и верификации изменений физиологических характеристик, поведения, уровня и метаболизма 5-НТ, обнаруженных в эксперименте 2, а также для выяснения роли активности ТПГ в развитии изменений в поведении и 5-НТ системе мозга при содержании рыб при коротком световом дне. Кроме того, в данном эксперименте впервые исследовано влияние длительного (30 дней) введения ингибитора ТПГ, рСРА, на поведение и 5-НТ систему мозга. В эксперименте 3 мы впервые применили разработанную нами методику непрерывной регистрации и анализа поведения группы рыб в домашнем аквариуме (Куликов и др., 2023), что позволило нам выявить динамику изменений поведения рыб в процессе содержания их при коротком световом дне и при длительном воздействии рСРА.

Несмотря на то, что в обоих экспериментах режимы короткого и стандартного светового дня были одинаковы 04L:20D и 12L:12D, соответственно, дизайн этих экспериментов существенно различался. Эксперимент 2 проводили на молодых (6 недель) рыбах, которых содержали в течение 60 дней в аквариумах на 20 литров в группах по 30 особей. Эксперимент 3 проводили на более взрослых рыбах (12 недель), которых содержали в течение 30 дней в аквариумах на 6.3 литров в группах по 5 особей.

Несмотря на различие условий проведения экспериментов 2 и 3 в обоих экспериментах было однозначно показано, что содержание в течение 30 или 60 дней при коротком световом дне приводит к маскулинизации самок: у них исчезают яичники и появляются семенники (Сорокин и др., 2022; 2023). Поскольку этот факт был однозначно воспроизведен дважды в двух независимых экспериментах, его можно считать доказанным. У рыб вида *D. rerio* нет половых хромосом и пол у особей этого вида формируется в онтогенезе под действием ряда внешних факторов. Было показано, что такие

неблагоприятные факторы, как высокая (30°C и выше) температура и гипоксия вызывают маскулинизацию *D. rerio* (Aharon, Marlow, 2021; Santos et al., 2017). В нашем исследовании мы выявили еще один неблагоприятный фактор, вызывающий маскулинизацию у *D. rerio*, - короткий световой день. Можно предположить, что причиной маскулинизации является длительная секреция мелатонина у рыб при их содержании в условиях короткого дня. Однако в единственной работе по изучению влияния экзогенного мелатонина (0.232 мг/л) не было отмечено смены пола у самок (Genario et al., 2020). Возможно, что мелатонин не приводит к маскулинизации или, что более вероятно, доза гормона была мала или возраст рыб был достаточно большим. Авторы не контролировали сколько мелатонина проникало из воды в рыбу. В специальном эксперименте мы показали, что содержание взрослых самок (1 год и более) при коротком световом дне не вызывает их маскулинизацию (не опубликованные материалы). В любом случае этот вопрос остается открытым и ожидает дальнейших исследований.

Важно отметить значительные различия в средней массе тела и в двигательной активности в тесте «новый аквариум» у рыб в двух экспериментах: в эксперименте 2 рыбы были в среднем крупнее и их подвижность в тесте «новый аквариум» была вдвое больше, чем у рыб в эксперименте 3. Разумным объяснением такой разницы является различия в условиях содержания рыб во время эксперимента. Известно, что размер рыб прямо пропорционально зависит от объема аквариума. Поэтому рыбы, содержащиеся в течение 60 дней в больших (20 литров) аквариумах вырастали до больших размеров по сравнению с особями, содержащимися в течение 30 дней в маленьких аквариумах (6.3 литров).

Более того, в больших аквариумах рыбы двигаются больше, чем в маленьких и, поэтому, рыбы из большого аквариума проходят больший путь в новой обстановке, чем рыбы из маленького аквариума.

Вне зависимости от вызванных условиями содержания изменений средних значений массы тела и двигательной активности, в экспериментах 2 и 3 было показано снижение массы рыб, содержащихся при коротком световом дне, по сравнению с содержащимися при длинном световом дне. Это явление можно отчасти объяснить тем, что при содержании при коротком световом дне все самки превращаются в самцов, которые имеют меньшую массу, чем самки (Сорокин и др., 2022; 2023).

Исследование динамики двигательной активности и пространственного предпочтения в группе рыб не выявило изменения данных показателей в процессе экспозиции. Более того, ни содержание при коротком световом дне, ни снижение активности ТПГ с помощью рСРА не влияли на динамику данных показателей за все время наблюдения (30 дней). По-видимому, содержание в группе своих сородичей смягчает травмирующее действие данных неблагоприятных факторов на двигательную активность рыб.

Другая картина наблюдается при изъятии рыбы из знакомой группы сородичей и помещении ее в стрессирующие условия. В двух независимых экспериментах было однозначно показано снижение двигательной активности в тесте «новый аквариум» у рыб, содержащихся при коротком световом дне, по сравнению с особями, содержащимися при стандартном световом дне. Тест «новый аквариум» - самый распространенный тест на тревожность у *D. rerio* (Kalueff et al., 2014; Stewart et al., 2014). Попав в незнакомый и потенциально опасный аквариум, рыба демонстрирует защитную реакцию и пытается спрятаться на дне. В то же время, исследовательская мотивация понуждает ее обследовать новый аквариум. Поэтому поведение в данном тесте является конфликтом между стремлением спрятаться и исследовать новое окружение. Это приводит к увеличению времени в нижней трети аквариума и снижению пройденного пути. Следовательно, повышенная тревожность должна сопровождаться

увеличением времени в нижней трети и снижение пройденного пути. Поскольку рыбы, содержащиеся при стандартном фотопериоде, попав в новый аквариум уже проводят около 70% времени у его дна и дополнительное увеличение тревожности, вызванное содержанием при коротком световом дне, не способно еще более увеличить этот показатель. Однако, содержание при коротком дне резко снижает пройденный путь, что можно рассматривать как проявление повышенной тревожности.

В эксперименте 2 было показано увеличение уровня 5-Н1АА в головном мозге рыб, содержащихся при коротком световом дне по сравнению с содержащимися при стандартном световом дне. При этом уровень 5-НТ и индекс метаболизма, 5-Н1АА/5-НТ, одинаковы у двух экспериментальных групп рыб. Механизм увеличения уровня 5-Н1АА не ясен: его нельзя объяснить увеличением синтеза и окисления 5-НТ, поскольку содержание при коротком световом дне не влияет на основные ферменты синтеза и окисления медиатора, ТПГ и МАО. Более того, экспрессия гена *Maо* даже снижается у рыб, содержащихся при коротком световом дне (Сорокин и др., 2022). В эксперименте 3 мы не обнаружили увеличение уровня 5-Н1АА в мозге рыб, содержащихся при коротком дне (Сорокин и др., 2023). Возможно, что 30 дней экспозиции недостаточно для статистически значимого увеличения этого показателя.

Основной целью эксперимента 3 было проверить как зависит реакция *D. rerio* на короткий световой день от активности ТПГ. В отличие от млекопитающих, у которых в мозге экспрессируется один ген *Tph2*, в мозге *D. rerio* экспрессируются три гена *Tph1a*, *Tph1b*, *Tph2* (Сорокин и др., 2022), которые могут кодировать активный фермент и, следовательно, определять уровень 5-НТ. Поэтому фармакологическое ингибирование всех трех ферментов с помощью рСРА будет наиболее эффективным способом снижения активности ТПГ в мозге *D. rerio*. Уровень 5-Н1АА в мозге *D. rerio*

снижается через 3 суток непрерывного воздействия рСРА, добавленного в воду аквариума (Куликова и др., 2021; Evsiukova et al., 2021).

В данном исследовании *D. rerio* впервые содержались 30 суток при контролируемой концентрации рСРА 5 мг/л в воде. Было показано, что данное соединение проникает в мозг и накапливается там в концентрации около 12 мкг/мг белка. Несмотря на такую большую концентрацию ингибитора, не было отмечено снижение уровня 5-НТ в мозге *D. rerio* (Сорокин и др., 2023). Это не выглядит парадоксальным: ранее было показано, что воздействие в течении 3 суток рСРА в концентрации 2 мг/л вызывает небольшое и плохо воспроизводимое снижение уровня 5-НТ в мозге *D. rerio* (Evsiukova et al., 2021).

Однако рСРА вызывает пятикратное снижение уровня основного метаболита медиатора, 5-Н1АА, и отношения 5-Н1АА/5-НТ, отражающего интенсивность его обмена (Сорокин и др., 2023). Это хорошо согласуется с результатами предыдущих исследований, в которых рСРА всегда и устойчиво снижал уровень 5-Н1АА и отношение 5-Н1АА/5-НТ в мозге *D. rerio* (Куликова и др., 2021; Evsiukova et al., 2021). Это позволяет утверждать, что рСРА эффективно блокирует синтез 5-НТ, а постоянная концентрация медиатора по-видимому поддерживается за счет компенсаторных механизмов. Одни из таких механизмов может быть усиления синтеза ТПГ. Действительно, в данном исследовании мы впервые показали, что длительное воздействие рСРА значительно увеличивает экспрессию гена *Tph1a* и двукратно увеличивает экспрессию гена *Tph2*. В то же время, рСРА не влияет на экспрессию генов *Mao* и *Htr1aa*, кодирующих MAO – ключевой фермент разрушения медиатора, и 5-НТ1аа рецептор, который регулирует секрецию медиатора на пресинаптическом уровне (Сорокин и др., 2023).

Воздействие в течении 3 дней рСРА в дозе 2 мг/л не влияло общую двигательную активность *D. rerio* в тесте «новый аквариум» (Evsiukova et al.,

2021). В данном эксперименте впервые было показано, что воздействие в течении 30 дней рСРА в дозе 5 мг/л увеличивает общую двигательную активность *D. rerio* в тесте «новый аквариум» (Сорокин и др., 2023). Можно предположить, что 5-НТ тормозит двигательную активность рыб данного вида. Действительно, увеличение уровня медиатора в мозге после блокады его разрушения паргилином существенно снижало двигательную активность *D. rerio* в тесте «новый аквариум» (Evsiukova et al., 2021).

Результаты по влиянию короткого светового дня на 5-НТ систему мозга и регулируемое 5-НТ поведение и мышей и рыб вида *D. rerio* суммированы в таблице 10. Следует отметить значительную аналогию изменений в поведении и 5-НТ системе мозга мышей и рыб, содержащихся при коротком световом дне: это, прежде всего, увеличение тревожности у мышей, наблюдаемое нами (Vazhenova et al., 2019; Фурсенко и др., 2019) и нашими коллегами (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015), и у рыб (Сорокин и др. 2022; 2023). Исследования, проведенные японскими авторами (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015) и в нашей лаборатории (Vazhenova et al., 2017) выявили снижение уровня 5-НТ и увеличение уровня 5-Н1АА в телах 5-НТ нейронов (в среднем мозге) у мышей, содержащихся при коротком световом дне. В данном исследовании мы также показали увеличение уровня 5-Н1АА в целом мозге рыб, содержащихся при коротком световом дне (Сорокин и др., 2022). Однако мы не увидели статистически значимых изменений в уровне 5-НТ в мозге рыб при их содержании при коротком дне. Возможно это обусловлено тем, что мы измеряли эти показатели в целом мозге, а не в телах 5-НТ нейронов.

Таблица 10. Вызванные содержанием при коротком дне изменения в 5-НТ системе мозга и регулируемом 5-НТ поведении у мышей и рыб вида *D. rerio*

Признак	Мыши	<i>D. rerio</i>
5-НТ система		
5-НТ	↓ (Goda et al., 2015; Bazhenova et al., 2017)	↔ (Сорокин и др., 2022; 2023)
5-Н1АА	↔(Goda et al., 2015), ↑(Bazhenova et al., 2017)	↑(Сорокин и др., 2022), ↔ (Сорокин и др., 2023)
Поведение		
Двигательная активность	↔(Otsuka et al., 2014; Хоцкин и др., 2019), ↓(Bazhenova et al., 2019)	↓(Сорокин и др., 2022; 2023)
Тревожность	↔(Otsuka et al., 2014; Хоцкин и др., 2019), ↑(Bazhenova et al., 2019)	↑(Сорокин и др., 2022; 2023) (снижение двигательной активности в НА)
Депрессивно-подобное поведение	↑(Otsuka et al., 2014; Хоцкин и др., 2019)	Нет теста

↔ нет изменений, ↓ снижение, ↑ увеличение

Таким образом, имеется значительная аналогия в изменениях поведения и 5-НТ системе мозга у рыб вида *D. rerio* и мышей при длительном содержании их в условиях короткого светового дня. Это, прежде всего, усиление тревожности, которое наиболее сильно проявляется на молодых животных. Вторая аналогия – увеличение уровня 5-Н1АА в телах 5-НТ нейронов. Это говорит о том, что на этих двух столь различных видов моделируются действительно фундаментальные механизмы реагирования позвоночных организмов на смену фотопериода.

Нами не было выявлено влияния взаимодействия факторов «фотопериод» и «С1473G», (Хоцкин и др., 2019; Bazhenova et al., 2019) а также «фотопериод» и «pCRA» (Сорокин и др., 2023) ни на один из

исследованных поведенческих признаков у мышей и рыб, соответственно. Это позволяет утверждать, что умеренное снижение активности ТПГ и синтеза 5-НТ, по-видимому, не способно усилить негативный эффект короткого дня на поведение мышей и рыб. Эти результаты позволяют сделать один практический вывод: факторы, умеренно снижающие активность ТПГ2 в мозге, не способны увеличить риск и/или тяжесть САР.

Есть, конечно, и особенности этих двух видов как моделей САР. У мышей содержание при коротком световом дне также усиливает депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание» {Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015; Vazhenova et al., 2017; 2019; Фурсенко и др., 2019; Хоцкин и др., 2019). К сожалению, для рыб не разработано теста на выраженность депрессивного поведения и, поэтому, на данном виде пока невозможно моделировать депрессивную симптоматику САР. Данное обстоятельство в настоящее время - единственный недостаток рыб вида *D. rerio* как потенциальной модели САР.

В то же время, рыбы имеют определенные преимущества перед мышами в качестве модели САР: (1) содержание при коротком световом дне сильнее травмирует рыб, чем мышей, что отражается в снижении веса, маскулинизации самок и нарушениях поведения; (2) рыбам можно непрерывно и неинвазивно вводить контролируемые дозы различных препаратов через воду; (3) стоимость эксперимента на рыбах значительно ниже, чем на мышах, что позволяет получить значительный научный эффект при сравнительно небольших денежных затратах.

Заключение

Была верифицирована и модифицирована методика моделирования САР на мышах линии C57BL/6, предложенная японскими исследователями (Otsuka et al., 2014): время световой фазы при коротком дне было вдвое сокращено с 8 ч до 4 ч, а при стандартном дне с 16 ч до 14 ч. Содержание мышей в течение 28 дней (месяц) при коротком световом дне увеличивает тревожность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание». Было показано снижение уровня 5-НТ и увеличение уровня 5-Н1АА в ряде структур головного мозга мышей при их длительном содержании при коротком световом дне. Результаты опубликованы (Vazhenova et al., 2017; 2019; Фурсенко и др., 2019; Хоцкин и др., 2019). Полученные нами и японскими коллегами результаты позволяют утверждать, что предложенная японскими исследователями и модифицированная нами модель соответствует критериям *face*, *predictive* и *construct validity*, предъявляемым к модели САР.

Модифицированная модель САР была впервые использована для выяснения влияния сниженной активности ключевого фермента синтеза 5-НТ, триптофангидроксилазы 2, вызванной мутацией *C1473G*, на риск и выраженность нарушений поведения при содержании мышей при коротком световом дне. Не было показано статистически значимого эффекта взаимодействия «фотопериод» x «C1473G» на выраженность депрессивно-подобного поведения в тесте «принудительное плавание». Результаты опубликованы (Vazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019). Это не позволяет утверждать, что дефицит синтеза 5-НТ способны увеличить риск или тяжесть САР.

Впервые некоторая симптоматика САР была смоделирована на рыбах вида *Danio rerio* содержанием их в течении 60 и 30 дней при коротком световом дне (4 ч свет: 20 ч темнота). Было установлено, что длительное содержание при коротком световом дне вызывает маскулинизацию самок, снижает массу тела, увеличивает тревожность в тесте «новый аквариум», увеличивает уровень 5-Н1АА в головном мозге. Однако содержание при коротком световом дне не повлияло на уровень 5-НТ, активность триптофангидроксилаз и моноаминоксидазы, а также на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма, транспортер и рецепторы 5-НТ. Результаты опубликованы (Сорокин и др., 2022; 2023). Полученные на рыбах результаты по влиянию короткого светового дня на поведение и 5-НТ систему рыб хорошо совпадают с данными о влиянии короткого дня на поведение и 5-НТ систему мышей (Otsuka et al., 2014; Goda et al., 2015; Vazhenova et al., 2017; Хоцкин и др., 2019). По-видимому, они отражают фундаментальные процессы реакции нервной системы позвоночных на сезонное изменение освещенности.

Было исследовано влияние хронического снижения активности ТПГ с помощью ее ингибитора рСРА на поведение и 5-НТ систему мозга рыб. Впервые было показано, что длительное воздействие рСРА увеличивает двигательную активность в тесте «новый аквариум», пятикратно снижает уровень 5-Н1АА и увеличивает экспрессию генов *Tph1a* и *Tph2* в мозге рыб. Более того на рыбах была смоделировано взаимодействие «фотопериод» и «активность ТПГ». Было показано, что рСРА не способен усилить/ослабить выраженность изменений в поведении и в 5-НТ системе мозга рыб, вызванных содержанием при коротком световом дне. Таким образом, рыбы вида *D. rerio* являются перспективным лабораторным объектом для моделирования нервных механизмов САР.

В ходе выполнения работы были получены следующие практически значимые результаты (1) модифицирована и улучшена модель САР на мышах, (2) создана модель САР на рыбах *D. rerio*, (3) разработан алгоритм длительной автоматической регистрации и анализа поведения группы рыб в домашнем аквариуме.

Выводы

1. Длительное содержание самцов мышей при коротком световом дне усиливает их депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание», снижает уровень 5-НТ и увеличивает уровень 5-НІАА в гиппокампе и среднем мозге.
2. У самцов мышей не выявлено статистически значимого эффекта взаимодействия длины светового дня и мутации *C1473G* в гене *Tph2*, снижающей активность фермента в мозге, на выраженность депрессивно-подобное поведение в тесте «принудительное плавание».
3. Выявлен статистически значимый эффект взаимодействия длины светового дня и мутации *C1473G* на уровень и метаболизм 5-НТ в гиппокампе: содержание мышей при коротком световом дне снижает уровень 5-НТ, увеличивает уровень 5-НІАА и отношение 5-НІАА/5-НТ в данной структуре мозга только у мышей, несущих аллель 1473G.
4. Длительное содержание при коротком световом дне вызывает маскулинизацию самок, снижает массу тела и двигательную активность в тесте «новый аквариум», а так же увеличивает уровень 5-НІАА в мозге у молодых рыб вида *D. rerio*.
5. Длительное воздействие ингибитором триптофангидроксилазы, рСРА (5 мг/л, 30 дней) увеличивало двигательную активность в тесте «новый аквариум», экспрессию генов *Tph1a*, *Tph2*, но снижало уровень 5-НІАА в мозге *D. rerio*.
6. Не выявлено влияния взаимодействия длины светового дня и вызванного рСРА снижения активности ТПГ на выраженность поведенческих характеристик и 5-НТ систему мозга *D. rerio*

Список литературы

1. Куликов А.В., Попова Н.К. Генетический контроль активности триптофангидроксилазы в головном мозге мышей // Генетика. – 1983(а). Т.19. – С. 784-788.
2. Куликов А.В., Попова Н.К. Активность триптофангидроксилазы в головном мозгу мышей // Нейрохимия. – 1983(б). Т.2. – С.421-425
3. Куликова Е.А., Фурсенко Д.В., Баженова Е.Ю., Куликов А.В. Паргилин и п-хлорфенилаланин снижают экспрессию гена *Ptpn5*, кодирующего стриатумспецифичную протеинтирозинфосфатазу (STEP) в стриатуме мышей // Мол биол. – 2020. №54. – С. 313-320
4. Куликова Е. А., Фурсенко Д. В., Баженова Е. Ю., Куликов А.В. Снижение активности стриатумспецифической протеин-тирозинфосфатазы (STEP) в головном мозге *Danio rerio* под воздействием п-хлорфенилаланина и паргилина // Мол. Биол. – 2021. № 55. – С. 660-666.
5. Науменко В.С., Куликов А.В. Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге // Мол. Биол. – 2006. №.40. – С.37-44.
6. Попова Н.К., Науменко Е.В., Колпаков В.Г. Серотонин и поведение. – Новосибирск: Наука, 1978. – С. 304.
7. Сидоров П.И, Гудков А.Б. Экология человека на Европейском Севере России // Экология человека. – 2004. №6. – С. 15-21.
8. Синякова Н.А., Куликова Е.А., Енглеvский Н.А., Куликов А.В. Эффекты флуоксетина и потенциального антидепрессанта гидрохлорида 8-трифторметил-1,2,3,4,5-пентатиепин-6-амина (ТС-2153) на поведение в тесте “новый резервуар”, биогенные амины и их метаболиты в мозге рыбок *Danio rerio* // Бюлл экспер биол мед. – 2017. – С. 573-576.

9. Сорокин И.Е., Евсюкова В.С., Куликов А.В. Влияние короткого светового дня на поведение и серотониновую систему головного мозга рыб вида *Danio rerio* // Бюлл Эксп Биол Мед. – 2022. – № 173. С. 279-284.
10. Сорокин И.Е., Евсюкова В.С., Арефьева А.Б., Сачкова В.В., Куликов П.А., Куликов А.В. Длительное воздействие короткого светового дня и ингибитора триптофангидроксилазы на поведение и серотониновую систему мозга *Danio rerio* // Бюлл. exper. биол. Мед. – 2023. – № 175 (6). С. 778-785.
11. Ушкалова А.В. Депрессии у соматических больных // Трудный пациент. Журнал для врачей. – 2006. – № 11. С. 44-47.
12. Фурсенко Д. В., Баженова Е. Ю., Хоцкин Н. В., Сорокин И. Е., Куликова Е. А., Куликов А. В. Влияние длины светового дня и мутации *lethal yellow* на депрессивно-подобное поведение и экспрессию провоспалительных цитокинов в гипоталамусе у мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. № 167. – С.108-112.
13. Хананашвили М.М. Особенности течения эндогенных заболеваний, протекающих с сезонными депрессиями // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. – 2000. – №7. – С. 18-22.
14. Хоцкин Н.В., Куликов В.А., Завьялов Е.Л., Фурсенко Д.В., Куликов А.В. Проведение и автоматизация теста «водный лабиринт Морриса» в условиях SPF-вивария // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. №19. – С. 388-393.
15. Хоцкин Н.В., Баженова Е.Ю., Куликова Е.А., Сорокин И.Е., Куликов А.В. Влияние С1473G полиморфизма в гене триптофангидроксилазы 2 и длины светового дня на поведение мышей // Журнал высшей нервной деятельности им ИП Павлова. – 2019. № 69. – С. 85-94

16. Aharon D., Marlow F.L. Sexual determination in zebrafish // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – Vol. 79. – P. 8.
17. Albert P. R., Vahid-Ansari F. The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior // *Biochimie.* – 2019. – Vol. 161. – P. 34-45
18. Alenina N., Kikic D., Todiras M., Mosienko V., Qadri F., Plehm R., Boyé P., Vilianovitch L., Sohr R., Tenner K., Hörtnagl H., Bader M. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – Vol. 106. – P. 10333-10337.
19. Anguelova M., Benkelfat C., Turecki G. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders // *Mol Psychiatry.* – 2003. – Vol. 8(6). – P. 574-591.
20. Anderson E.J, Çakir I., Carrington S.J., Cone R.D., Ghamari-Langroudi M., Gillyard T., Gimenez L.E., Litt M.J. 60 YEARS OF POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH // *J Mol Endocrinol.* – 2016. – Vol. 56(4). – P. 157-174.
21. Aranda-Martínez P., Fernández-Martínez J., Ramírez-Casas Y., Guerra-Librero A., Rodríguez-Santana C., Escames G., Acuña-Castroviejo D. The Zebrafish, an Outstanding Model for Biomedical Research in the Field of Melatonin and Human Diseases // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23(13):7438.
22. Arias B., Gutiérrez B., Pintor L., Gastó C., Fañanás L. Variability in the 5-HT_{2A} receptor gene is associated with seasonal pattern in major depression // *Mol Psychiatry.* – 2001. – Vol. 6(2). – P. 239-42.
23. Arunachalam M., Raja M., Vijayakumar C., Malaiammal P., Mayden R.L. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India // *Zebrafish.* – 2013. – Vol. 10(1). – P. 1-14.

24. Audet M.A., Descarries L., Doucet G. Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of the adult cerebral cortex // *J. Chem Neuroanat.* – 1989. – Vol. 2. – P. 29-44.
25. Bains R.S., Wells S., Sillito R.R., Armstrong J.D., Cater H.L., Banks G., Nolan P.M. Assessing mouse behaviour throughout the light/dark cycle using automated in cage analysis tools // *J. Neurosci. Methods.* – 2017. – Vol. 300. – P. 37-47.
26. Barker E., Blakey R. Norepinephrine and serotonin transporters. Molecular targets of antidepressant drugs // Bloom E., Kupfer N. *Psychopharmacology. The fourth generation of progress.* – New York: Raven Press, 1995. – P. 321-333.
27. Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function // *Neuropharmacology.* – 1999. – Vol. 38(8). – P. 1083-1152.
28. Barnes N.M., Ahern G.P., Becamel C., Bockaert J., Camilleri M., Chaumont-Dubel S., Claeysen S., Cunningham K.A., Fone K.C., Gershon M., Di Giovanni G., Goodfellow N.M., Halberstadt A.L., Hartley R.M., Hassaine G., Herrick-Davis K., Hovius R., Lacivita E., Lambe E.K., Leopoldo M., Levy F.O., Lummis S.C.R., Marin P., Maroteaux L., McCreary A.C., Nelson D.L., Neumaier J.F., Newman-Tancredi A., Nury H., Roberts A., Roth B.L., Roumier A., Sanger G.J., Teitler M., Sharp T., Villalón C.M., Vogel H., Watts S.W., Hoyer D. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function // *Pharmacol Rev.* – 2021. – Vol. 73(1). – P. 310-520.
29. Bazhan N.M., Yakovleva T.V., Kazantseva A.Y., Makarova E.N. Exaggerated anorexigenic response to restraint stress in A(y) mice is associated with elevated CRFR2 mRNA expression in the hypothalamus // *Physiol. Behav.* – 2013. – Vol. 120. – P. 19-25.

30. Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Sorokin I.E., Kulikov A.V. Effect of lethal yellow (AY) mutation and photoperiod alterations on mouse behavior // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2019(a). – Vol. 22(1). – P. 55-61.
31. Bazhenova E.Y., Khotskin N.V., Sorokin I.E., Fursenko D.V., Kulikov A.V. The role of C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the response of brain serotonergic system and behavior to short photoperiod // *Europ. Neuropsychopharmacol.* – 2017. – Vol. 27 (Suppl. 4). – P. 760-761.
32. Bazovkina D.V., Lichman D.V., Kulikov A.V. The C1473G polymorphism in the tryptophan hydroxylase-2 gene: involvement in ethanol related behavior in mice // *Neurosci Lett.* – 2015. – Vol. 589. – P. 79-82.
33. Beaulieu J.M., Zhang X., Rodriguiz R.M., Sotnikova T.D., Cools M.J., Wetsel W.C., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Role of GSK3 β in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 1333-1338.
34. Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review // *Behavioural Brain Research*. - 2001. – Vol. 125(1-2). – P. 141-149.
35. Bhagwagar Z., Hinz R., Taylor M., Fancy S., Cowen P., Grasby P. Increased 5-HT(2A) receptor binding in euthymic, medication-free patients recovered from depression: a positron emission study with [(11)C]MDL 100,907 // *Am J Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163. – P. 1580-1587.
36. Blazer D.G., Kessler R.C., Swartz M.S. Epidemiology of recurrent major and minor depression with a seasonal pattern. The National Comorbidity Survey // *Br J Psychiatry*. – 1998. – Vol. 172. – P. 164-167.

37. Boston B.A., Blaydon K.M., Varnerin J., Cone R.D. Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity // *Science*. – 1997. – Vol. 278. – P. 1641-1644.
38. Bourin M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective // *Dialogues Clin Neurosci*. – 2015. – Vol. 17. – P. 295-303.
39. Brewerton T.D. Seasonal variation of serotonin function in humans: research and clinical implications // *Ann. Clin. Psychiatry*. – 1989. – Vol. 1. – P. 153-164.
40. Brunner H.G., Nelen M., Breakefield X.O., Ropers H.H., van Oost B.A. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A // *Science*. – 1993. – Vol. 262(5133). – P. 578-580.
41. Can A., Dao D.T., Terrillion C.E., Piantadosi S.C., Bhat S., Gould T.D. The Tail Suspension Test // *J. Vis. Exp*. – 2012. – Vol. (59):e3769
42. Carlsson A., Svennerholm L., Winblad B. Seasonal and circadian monoamine variations in human brains examined post mortem. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl*. – 1980. – Vol. 280. – P. 75-85.
43. Cases O., Seif I., Grimsby J., Gaspar P., Chen K., Pournin S., Müller U., Aguet M., Babinet C., Shih J.C., et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA // *Science*. – 1995. – Vol. 268(5218). – P. 1763-1766.
44. Chen J., Okimura K., Yoshimura T. Light and Hormones in Seasonal Regulation of Reproduction and Mood // *Endocrinology*. – 2020. – 161(9).
45. Cervo L., Canetta A., Calcagno E., Burbassi S., Sacchetti G., Caccia S., Fracasso C., Albani D., Forloni G., Invernizzi R.W. Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression // *J Neurosci*. – 2005. – Vol. 25(36). – P. 8165-8172.

46. Commons K.G., Cholani A.B., Babb J.A., Ehlinger D.G. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior // *ACS Chem Neurosci.* – 2017. – Vol. 8(5). – P. 955-960.
47. Cryan J.F., Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety // *Nat Rev Drug Discov.* – 2005a. – Vol. 4(9). – P. 775-790.
48. Cryan J.F., Mombereau C., Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2005b. – Vol. 29(4-5). – P. 571-625.
49. Diaz S.L., Maroteaux L. Implication of 5-HT(2B) receptors in the serotonin syndrome // *Neuropharmacology.* – 2011. – Vol. 61. – P. 495-502.
50. Eagles J.M. Seasonal affective disorder: a vestigial evolutionary advantage? // *Med. Hypotheses.* – 2004. – Vol. 63. – P. 767-772.
51. Eastman C.I., Gallo L.C., Lahmeyer H.W., Fogg L.F. The circadian rhythm of temperature during light treatment for winter depression // *Biol Psychiatry.* – 1993. – Vol. 34(4). – P. 210-20.
52. Einat H., Kronfeld-Schor N., Eilam D. Sand rats see the light: short photoperiod induces a depression-like response in a diurnal rodent // *Behav. Brain Res.* – 2006. – Vol. 173. – P. 153-157.
53. Elbaz I., Foulkes N.S., Gothilf Y., Appelbaum L. Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish // *Front Neural Circuits.* – 2013. – Vol. 7. – P. 9.
54. Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field // *Zebrafish.* – 2007. – Vol. 4(1). – P. 21-40.
55. Enoch M.A., Goldman D., Barnett R., Sher L., Mazzanti C.M., Rosenthal N.E. Association between seasonal affective disorder and the 5-HT2A

- promoter polymorphism, -1438G/A // *Mol Psychiatry*. – 1999. – Vol. 4(1). – P. 89-92.
56. Ennaceur A., Chazot P.L. Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices // *Pharmacol Res Perspect*. – 2016. – Vol. 4:e00223.
57. Evsiukova V.S., Bazovkina D., Bazhenova E., Kulikova E.A., Kulikov A.V. Tryptophan Hydroxylase 2 Deficiency Modifies the Effects of Fluoxetine and Pargyline on the Behavior, 5-HT and BDNF-Systems in the Brain of Zebrafish (*Danio rerio*) // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – Vol. 22:12851.
58. Fernández-Sánchez A., Madrigal-Santillán E., Bautista M., Esquivel-Soto J., A. Morales-González, Esquivel-Chirino C., Durante-Montiel I., Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C., Morales-González J.A. Inflammation, oxidative stress, and obesity // *Int. J. Mol. Sci*. – 2011. – Vol. 12. – P. 3117–3132.
59. Fisher S.P., Godinho S.I., Potheary C.A., Hankins M.W., Foster R.G., Peirson S.N. Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice // *J. Biol. Rhythms*. – 2012. – Vol. 27. – P. 48-58.
60. Fitzpatrick P.F. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases // *Annu Rev Biochem*. – 1999. – Vol. 68. – P. 355-381.
61. Fitzpatrick P.F. The aromatic amino acid hydroxylases: Structures, catalysis, and regulation of phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and tryptophan hydroxylase // *Arch Biochem Biophys*. – 2023. – Vol. 735. – P. 109518.
62. Garriock H.A., Allen J.J., Delgado P., Nahaz Z., Kling M.A., Carpenter L., Burke M., Burke W., Schwartz T., Marangell L.B., Husain M., Erickson R.P., Moreno F.A. Lack of association of TPH2 exon XI polymorphisms with major depression and treatment resistance // *Mol Psychiatry*. – 2005. – Vol. 10. – P. 976-977.
63. Gaspar P., Lillesaar C. Probing the diversity of serotonin neurons // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. – 2012. – Vol. 367(1601). – P. 2382-2394.

64. Genario R., Giacomini ACVV, Demin K.A., Dos Santos B.E., Marchiori N.I., Volgin A.D., Bashirzade A., Amstislavskaya T.G., de Abreu M.S., Kalueff A.V. The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2019. – Vol. 99. – P. 117-127.
65. Genario R., Giacomini ACVV, de Abreu M.S., Marcon L., Demin K.A., Kalueff A.V. Sex differences in adult zebrafish anxiolytic-like responses to diazepam and melatonin // *Neurosci Lett.* – 2020. – Vol. 714. – P. 134548.
66. Goda R., Otsuka T., Iwamoto A., Kawai M., Shibata S., Furuse M., Yasuo S. Serotonin levels in the dorsal raphe nuclei of 546 both chipmunks and mice are enhanced by long photoperiod, but brain dopamine level response to photoperiod is species-specific // *Neurosci. Lett.* – 2015. – Vol. 593. – P. 95-100.
67. Gray J.A., Roth B.L. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists // *Brain Research Bulletin.* – 2001. – Vol. 56. – P. 441-451.
68. Grouleff J., Ladefoged L.K., Koldsø H., Schiøtt B. Monoamine transporters: insights from molecular dynamics simulations // *Front Pharmacol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 235.
69. Guiard B.P., Di Giovanni G. Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: the missing link? // *Front Pharmacol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 46.
70. Gupta D., Kurhe Y., Radhakrishnan M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: modulation of brain serotonin system // *Physiol. Behav.* – 2014. – Vol. 129. – P. 73-78.
71. Gutknecht L., Waider J., Kraft S., Kriegebaum C., Holtmann B., Reif A., Schmitt A., Lesch K.P. Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic

- neuron formation in Tph2 knockout mice // *J Neural Transm.* – 2008. – Vol. 115. – P. 1127-1132.
72. Hagsäter S.M., Pettersson R., Holmäng A., Eriksson E. Serotonin depletion reduces both acquisition and expression of context-conditioned fear // *Acta Neuropsychiatr.* – 2021. – Vol. 33. – P. 148-155.
73. Halberstadt A.L. Recent advances in the neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens // *Behav Brain Res.* – 2015. – Vol. 277. – P. 99-120.
74. Hamon M., Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2013. – Vol. 45. – P. 54–63.
75. Hanks J.B., Gonzalez-Maeso J. Animal models of serotonergic psychedelics // *ACS Chem Neurosci.* – 2013. – Vol. 4. – P. 33–42.
76. Harrison S.J., Tyrer A.E., Levitan R.D., Xu X., Houle S., Wilson A.A., Nobrega J.N., Rusjan P.M., Meyer J.H. Light therapy and serotonin transporter binding in the anterior cingulate and prefrontal cortex // *Acta Psychiatr. Scand.* – 2015. – Vol. 132. – P. 379-388.
77. Heisler L.K., Chu H.M., Brennan T.J., Danao J.A., Bajwa P., Parsons L.H., Tecott L.H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95(25). – P. 15049–15054
78. Herculano A.M., Maximino C. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: towards a paradox // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2014. – Vol. 55. – P. 50-66.
79. Hjorth S., Sharp T. Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT_{1A} receptors: Behavioural and in vivo brain microdialysis studies. *Life Sciences.* – 1990. – Vol. 46(13). – P. 955-963.

- 80.Hjorth S., Sharp T. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis // *Life Sci.* 1991. – Vol. 48(18). – P. 1779-86
- 81.Holmes A., Yang R.J., Murphy D.L., Crawley J.N. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter // *Neuropsychopharmacology.* – 2002. – Vol. 27(6). – P. 914-923.
- 82.Jacobs B.L., Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system // *Physiol Rev.* – 1992. – Vol. 72(1). – P. 165-229.
- 83.Jacobs B.L., Fornal C.A. Serotonin and behaviour : A general hypothesis // Bloom F.E., Kupfer D.J., In *Psychopharmacology.* – Raven Press Ltd, New York, 1995. – P. 461-469.
- 84.Johansson C., Smedh C., Partonen T., Pekkarinen P., Paunio T., Ekholm J., Peltonen L., Lichtermann D., Palmgren J., Adolfsson R., Schalling M. Seasonal affective disorder and serotonin-related polymorphisms // *Neurobiol Dis.* – 2001. – Vol. 8(2). – P. 351-357.
- 85.Johansson C., Willeit M., Levitan R., Partonen T., Smedh C., Del Favero J., Bel Kacem S., Praschak-Rieder N., Neumeister A., Masellis M., Basile V., Zill P., Bondy B., Paunio T., Kasper S., Van Broeckhoven C., Nilsson L.G., Lam R., Schalling M., Adolfsson R. The serotonin transporter promoter repeat length polymorphism, seasonal affective disorder and seasonality // *Psychol Med.* 2003. – Vol. 33(5). – P. 785-792.
- 86.Kalueff A.V., Gallagher P.S., Murphy D.L. Are serotonin transporter knockout mice ‘depressed’?: hypoactivity but no anhedonia // *Neuroreport.* – 2006. – Vol. 17(12). – P. 1347–1351.
- 87.Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2014. – Vol. 35. – P. 63–75.

88. Kara N.Z., Stukalin Y., Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2018. – Vol. 84. – P. 1-11.
89. Koe B.K., Weissman A. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1966. – Vol. 154(3). – P. 499-516.
90. Komleva P.D., Bazhenova E.Y., Khotskin N.V., Kulikova E.A., Kulikov A.V. C1473G Polymorphism in Tph2 Gene Affects Activation of Serotonin Metabolism in Mouse Brain 24 h after LPS Administration // *Bull Exp Biol Med.* – 2023. – Vol. 174(2). – P. 199-204.
91. Koshimizu H., Hirata N., Takao K., et al. Comprehensive behavioral analysis and quantification of brain free amino acids of C57BL/6J congenic mice carrying the 1473G allele in tryptophan hydroxylase 2 // *Neuropsychopharmacol Rep.* – 2019. – Vol. 39(1). – P. 56 -60.
92. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. Quantitative RT-PCR of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an standard // *Journal of Neuroscience Methods.* – 2005. – Vol. 141(a). – P. 97-101.
93. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K. Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains // *Genes Brain Behav.* – 2005. – Vol. 4(b). – P. 482-485.
94. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Terenina E., Mormède P., Popova N.K. A pharmacological evidence of positive association between mouse intermale aggression and brain serotonin metabolism // *Behav Brain Res.* – 2012. – Vol. 233(1). – P. 113-119.
95. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting // *J. Neurosci. Methods.* – 2008. – Vol. 170. – P. 345-351.

96. Kulikov A.V., Morozova M.V., Kulikov V.A., Kirichuk V.S., Popova N.K. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test // *J. Neurosci. Methods.* – 2010. – Vol. 191. – P. 26-31.
97. Kulikov V.A., Khotskin N.V., Nikitin S.V., Lankin V.S., Kulikov A.V., Trapezov O.V. Application of 3-D imaging sensor for tracking mini pigs in the open field test // *J. Neurosci. Methods.* – 2014. – Vol. 235. – P. 219-225,
98. Kulikov A.V., Popova N.K. Tryptophan hydroxylase 2 in seasonal affective disorder: underestimated perspectives? // *Rev Neurosci.* – 2015. – Vol. 26(6). – P. 679-690.
99. Kulikova E.A., Kulikov A.V. Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* – 2019. – Vol. 23. – P. 655-667.
100. Kulikov A.V., Sinyakova N.A., Kulikova E.A., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Kulikov V.A., Volcho K.P. Effects of acute and chronic treatment of novel psychotropic drug, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), on the behavior of zebrafish (*Danio rerio*): A comparison with fluoxetine // *Lett. Drug Des. Discov.* – 2019. – Vol. 16. – P. 1321-1328.
101. Kunugi H., Hattori M., Kato T., Tatsumi M., Sakai T., Sasaki T. et al. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder // *Mol Psychiatry.* – 1997. – Vol. 2. – P. 457-462.
102. Lam R.W., Gorman C.P., Michalon M., Steiner M., Levitt A.J., Corral M.R., Watson G.D., Morehouse R.L., Tam W., Joffe R.T. Multicenter, placebo-controlled study of fluoxetine in seasonal affective disorder // *Am. J. Psychiatry.* – 1995. – Vol. 152. – P. 1765-1770.
103. Lam R.W., Levitt A.J., Levitan R.D., Enns M.W., Morehouse R., Michalak E.E., Tam E.M. The Can-SAD study a randomized controlled

- trials of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients with winter seasonal affective disorder // *Am. J. Psychiatry.* – 2006. – Vol. 163. – P. 805-812.
104. Lanfumey L., Mongeau R., Hamon M. Biological rhythms and melatonin in mood disorders and their treatments // *Pharmacol Ther.* – 2013. – Vol. 138(2). – P. 176-184.
105. Leach G., Ramanathan C., Langel J., Yan L. Responses of brain and behavior to changing day-length in the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*) // *Neuroscience.* – 2013. – Vol. 234. – P. 31-39.
106. Lenzinger E., Neumeister A., Praschak-Rieder N., Fuchs K., Gerhard E., Willeit M., Sieghart W., Kasper S.F., Hornik K., Aschauer H.N. Behavioral effects of tryptophan depletion in seasonal affective disorder associated with the serotonin transporter gene? // *Psychiatry Res.* – 1999. – Vol. 85(3). – P. 241-246.
107. Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region // *Science.* – 1996. – Vol. 274(5292). – P. 1527-1531.
108. Levitan R.D. The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder // *Dialogues Clin. Neurosci.* – 2007. – Vol. 9. – P. 315-324.
109. Levitan R.D., Sqapi M., Atkinson L., Murphy K., Levitt A., Bocking A., Post M., Knight J.A., Matthews S.G. Seasonality of 1plasma tryptophan and kynurenine in pregnant mothers with a history of seasonal affective disorder: Vulnerability or adaptation? // *World J. Biol. Psychiatry.* – 2020. – Vol. 21. – P. 529-538.
110. Levitas-Djerbi T., Appelbaum L. Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish // *Curr Opin Neurobiol.* – 2017. – Vol. 44. – P. 89-93.

111. Levitt A.J., Boyle M.H. The impact of latitude on the prevalence of seasonal depression // *Can J Psychiatry*. – 2002. – Vol. 47(4). – P. 361-367.
112. Lewy A.J., Sack R.L., Miller L.S., Hoban T.M. Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light // *Science*. – 1987. – Vol. 235(4786). – P. 352-354.
113. Lillesaar C. The serotonergic system in fish // *Journal Chemical Neuroanatomy*. – 2011. – Vol.41. – P.294-308.
114. Lilliefors H. On the Kolmogorov–Smirnov test for normality with mean and variance unknown // *Journal of the American Statistical Association*. – 1967. – Vol. 62. – P. 399-402.
115. Lima-Cabello E., Díaz-Casado M.E., Guerrero J.A., Otalora B.B., Escames G, López L.C., Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D. A review of the melatonin functions in zebrafish physiology // *J Pineal Res*. – 2014. – Vol. 57(1). – P. 1-9.
116. Lin Y.M., Chao S.C., Chen T.M., Lai T.J., Chen J.S., Sun H.S. Association of functional polymorphisms of the human tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder in Han Chinese // *Arch Gen Psychiatry*. – 2007. – Vol. 64. – P. 1015-1024.
117. Lucki I. The spectrum of behavior influenced by serotonin // *Biol Psychiatry*. – 1998. – Vol. 44. – P. 151-162.
118. Maes M.H., Meltzer Y. The serotonin hypothesis of major depression // Bloom E.E., Kupfer N.N.. *Psychopharmacology. The fourth generation of progress*. – New York: Raven Press, 1995. – P. 933-944.
119. Magnusson A. An overview of epidemiological studies on seasonal affective disorder // *Acta. Psychiatr. Scand*. – 2000. – Vol. 101. – P. 176-184.
120. Maximino C., da Silva A.W., Gouveia A. Jr., Herculano A.M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2011. – Vol. 35(2). – P. 624-631.

121. Maximino C., Puty B., Benzecry R., Araújo J., Lima M.G., de Jesus Oliveira Batista E., Renata de Matos Oliveira K., Crespo-Lopez M.E., Herculano A.M. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels, and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and parachlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models // *Neuropharmacology*. – 2013. – Vol. 73. – P. 83-97.
122. McDevitt R.A., Neumaier J.F. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective // *J Chem Neuroanat*. 2011. – Vol. 41(4). – P. 234-246.
123. McKinney J., Johansson S., Halmoy A., Dramsdahl M., Winge I., Knappskog P.M., Haavik J. A loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase 2 segregating with attention deficit/hyperactivity disorder // *Mol Psychiatry*. – 2008. – Vol. 13. – P. 365-367.
124. McKinney J.A., Turel B., Winge I., Knappskog P.M., Haavik J. Functional properties of missense variants of human tryptophan hydroxylase 2 // *Hum. Mutat*. – 2009. – Vol. 30. – P. 787-794.
125. McMahon B., Nørgaard M., Svarer C., Andersen S.B., Madsen M.K., Baaré W.F.C., Madsen J., Frokjaer V.G., Knudsen G.M. Seasonality-resilient individuals downregulate their cerebral 5-HT transporter binding in winter - A longitudinal combined 11C-DASB and 11C-SB207145 PET study // *Eur. Neuropsychopharmacol*. – 2018. – Vol. 28. – P. 1151-1160.
126. Mersch P.P., Middendorp H.M., Bouhuys A.L., Beersma D.G., van den Hoofdakker R.H. Seasonal affective disorder and latitude: a review of the literature // *J Affect Disord*. – 1999. – Vol. 53(1). – P. 35-48.
127. Mestre T.A., Zurowski M., Fox S.H. 5-Hydroxytryptamine 2A receptor antagonists as potential treatment for psychiatric disorders // *Expert Opin Invest Drugs*. – 2013. – Vol. 22. – P. 411-421.

128. Marin P. M.J., Bockaert J., Mannoury la Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions // *Trends Pharmacol Sci.* – 2008. – Vol. 29. P. 454-464.
129. Miller A.L. Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder // *Altern. Med. Rev.* – 2005. – Vol. 10. – P. 5-13.
130. Miller BR, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol.* 2015;30:51–58
131. Milner L.C., Crabbe J.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparisons // *Genes Brain and Behavior.* - 2008. – Vol. 7(4). P. 496-505.
132. Molnar E., Lazary J., Benko A., Gonda X., Pap D., Mekli K., Juhasz G., Kovacs G., Kurimay T., Rihmer Z., Bagdy G. Seasonality and winter-type seasonal depression are associated with the rs731779 polymorphism of the serotonin-2A receptor gene // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2010. – Vol. 20(9). – P. 655-662.
133. Monti J.M. Serotonin control of sleep-wake behavior // *Sleep Med. Rev.* – 2011. – Vol. 15. – P. 269-281.
134. Murphy D.L., Fox M.A., Timpano K.R., et al. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems // *Neuropharmacology.* – 2008. – Vol. 55(6). – P. 932-960.
135. Nørgaard M., Ganz M., Svarer C., Fisher P.M., Churchill N.W., Beliveau V., Grady C., Strother S.C., Knudsen G.M. Brain 522 Networks Implicated in Seasonal Affective Disorder: A Neuroimaging PET Study of the Serotonin Transporter // *Front. Neurosci.* – 2017. – Vol. 11. – P. 614.
136. Nussbaumer-Streit B, Thaler K, Chapman A, Probst T, Winkler D, Sönnichsen A, Gaynes BN, Gartlehner G. Second-generation antidepressants

- for treatment of seasonal affective disorder // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2021. – 3(3):CD008591.
137. Odgerel Z., Talati A., Hamilton S.P., Levinson D.F., Weissman M.M. Genotyping serotonin transporter polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531 in European- and African-American subjects from the National Institute of Mental Health's Collaborative Center for Genomic Studies // *Transl Psychiatry.* – 2013. – Vol3(9). – P. 307.
138. Olivier B., Pattij T., Wood S.J., et al. The 5-HT(1A) receptor knockout mouse and anxiety // *Behav Pharmacol.* – 2001. – Vol. 12(6–7). – P. 439-450.
139. Oren D.A., Levendosky A.A., Kasper S., Duncan C.C., Rosenthal N.E. Circadian profiles of cortisol, prolactin, and thyrotropin in seasonal affective disorder // *Biol Psychiatry.* – 1996. – Vol. 39(3). – P. 157-170.
140. Osipova D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. C1473G polymorphism in mouse *tph2* gene is linked to tryptophan hydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test // *J Neurosci Res.* – 2009. – Vol. 87(5). 1168-1174.
141. Osipova D.V., Kulikov A.V., Mekada K., Yoshiki A., Moshkin M.P., Kotenkova E.V., Popova N.K. Distribution of the C1473G polymorphism in tryptophan hydroxylase 2 gene in laboratory and wild mice // *Genes Brain Behav.* – 2010. – Vol. 9. – P. 537-543.
142. Otsuka T., Kawai M., Togo Y., Goda R., Kawase T., Matsuo H., Iwamoto A., Nagasawa M., Furuse M., Yasuo S. Photoperiodic responses of depressionlike behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice // *Psychoneuroendocrinology.* – 2014. – Vol. 40. – P. 37-47.
143. Ottenhof K.W., Sild M., Levesque M.L., Ruhé H.G., Booij L. TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: asystematic

- review and meta-analysis // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2018. – Vol. 92. – P. 29-42.
144. Ozaki N., Rosenthal N.E., Pesonen U., Lappalainen J., Feldman-Naim S., Schwartz P.J., Turner E.H., Goldman D. Two naturally occurring amino acid substitutions of the 5-HT_{2A} receptor: similar prevalence in patients with seasonal affective disorder and controls // *Biol Psychiatry.* – 1996. – Vol. 40(12). – P. 1267-1272.
145. Pack A.I., Galante R.J., Maislin G., Cater J., Metaxas D., Lu S., Zhang L., Von Smith R., Kay T., Lian J., Svenson K., Peters L.L. Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice // *Physiol. Genomics.* – 2007. – Vol. 28. – P. 232-238.
146. Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M., Sallinen V. The comparative neuroanatomy 559 and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – Vol. 40. – P. 46-57.
147. Patten SB, Williams JV, Lavorato DH, Bulloch AG, Fiest KM, Wang JL, Sajobi TT. Seasonal variation in major depressive episode prevalence in Canada // *Epidemiol Psychiatr Sci.* – 2017. – Vol. 26(2). – P. 169-176.
148. Parks C.L., Robinson P.S., Sibille E., Shenk T., Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95(18). – P. 10734-10739.
149. Partonen T., Lonnqvist J. Moclobemide and fluoxetine in treatment of seasonal affective disorder // *J. Affect. Disord.* – 1996. – Vol. 41. – P. 93-99.
150. Perani D., Garibotto V., Gorini A., Moresco R.M., Henin M., Panzacchi A., Matarrese M., Carpinelli A., Bellodi L., Fazio F. In vivo PET study of 5HT_{2A} serotonin and D₂ dopamine dysfunction in drugnaive obsessive-compulsive disorder // *NeuroImage.* – 2008. – Vol. 42. – P. 306-314.

151. Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity // *Psychopharmacology*. – 2005. – 177(3). – P. 245-55.
152. Pjrek E, Baldinger-Melich P, Spies M, Papageorgiou K, Kasper S, Winkler D. Epidemiology and socioeconomic impact of seasonal affective disorder in Austria // *Eur Psychiatry*. – 2016. – Vol. 32. – P. 28-33.
153. Popova N.K. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system // *Bioessays*. – 2006. Vol. 28. – P. 495-503.
154. Popova N.K., Kulikov A.V. Targeting tryptophan hydroxylase 2 in affective disorder // *Expert Opin Ther Targets*. – 2010. – Vol. 14(11). – P. 1259-1271.
155. Popova N.K., Gilinsky M.A., Amstislavskaya T.G., Morosova E.A., Seif I., De Maeyer E. Regional serotonin metabolism in the brain of transgenic mice lacking monoamine oxidase A // *J Neurosci Res*. – 2001. – Vol. 66(3). – P. 423-427.
156. Popova N.K., Skrinskaya Y.A., Amstislavskaya T.G., Vishnivetskaya G.B., Seif I., De Meier E. Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A // *Neurosci Behav Physiol*. – 2001. – Vol. 31(6). – P. 597-602.
157. Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments // *Nature*. – 1977. – Vol. 266. – P. 730-732.
158. Potkin S.G., Zetin M., Stamenkovic V., Kripke D., Bunney W.E. Jr. Seasonal affective disorder: prevalence varies with latitude and climate // *Clin Neuropharmacol*. – 1986. – Vol. 9(4). – P. 181-183.
159. Praschak-Rieder N., Willeit M., Winkler D., Neumeister A., Hilger E., Zill P., Hornik K., Stastny J., Thierry N., Ackenheil M., Bondy B., Kasper S. Role of family history and 5-HTTLPR polymorphism in female seasonal

- affective disorder patients with and without premenstrual dysphoric disorder // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2002. – Vol. 12(2). – P. 129-134.
160. Prendergast B.J., Nelson, R.J. Affective responses to changes in day length in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) // *Psychoneuroendocrinology.* – 2005. – Vol. 30. – P. 438-452.
161. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur. J. Pharmacol.* - 2003. – Vol. 463(1-3). – P. 3-33.
162. Pytliak M., Vargova V., Mechirova V., Felšöci M. Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications // *Physiol Res.* – 2011. – Vol. 60(1). – P. 15-25.
163. Ramboz S., Oosting R., Amara D.A., Kung H.F., Blier P., Mendelsohn M., Mann J.J., Brunner D., Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 95(24). – P. 14476-14481.
164. Roseboom P.H., Namboodiri M.A., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Rodriguez I.R., Gastel J.A., Klein D.C. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 1998. – Vol. 63. – P. 189-197.
165. Rosen L.N., Targum S.D., Terman M., Bryant M.J., Hoffman H., Kasper S.F., Hamovit J.R., Docherty J.P., Welch B., Rosenthal N.E. Prevalence of seasonal affective disorder at four latitudes // *Psychiatry Res.* – 1990. – Vol. 31. – P. 131-144.
166. Rosenthal N.E., Sack D.A., Gillin J.C., Lewy A.J., Goodwin F.K., Davenport Y., Mueller P.S., Newsome D.A., Wehr T.A. Seasonal affective disorder: a description of the syndrome and preliminary finding with light therapy // *Arch. Gen. Psychiatry.* – 1984. – Vol. 41. – P. 72-80.

167. Rosenthal N.E., Mazzanti C.M., Barnett R.L., Hardin T.A., Turner E.H., Lam G.K., Ozaki N., Goldman D. Role of serotonin transporter promoter repeat length polymorphism (5-HTTLPR) in seasonality and seasonal affective disorder // *Mol Psychiatry*. – 1998. – Vol. 3(2). – P. 175-177.
168. Ruhrmann S., Kasper S., Hawellek B., Martinez B., Hoflich G., Nickelsen T., Möller H.J. Effect of fluoxetine versus bright light in the treatment of seasonal affective disorder // *Psychol. Med.* – 1998. – Vol. 28. – P. 923-933.
169. Sabol S.Z., Hu S., Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter // *Human. Genetics*. – 1998. – Vol. 103. – P. 273-279.
170. Santos D., Luzio A., Coimbra A.M., Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors // *Aquat Toxicol.* – 2017. – Vol. 191. – P. 141-163.
171. Savelieva K.V., Zhao S., Pogorelov V.M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T.H. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3(10). e3301.
172. Scheuch K., Lautenschlager M., Grohmann M., Stahlberg S., Kirchheiner J., Zill P., Heinz A., Walther D.J., Priller J. Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonin raphe neurons // *Biol Psychiatry*. – 2007. – Vol. 62. – P. 1288-1294.
173. Serretti A., Calati R., Mandelli L., De Ronchi D. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review // *Curr Drug Targets*. – 2006. – Vol. 7. – P. 1659-1669.
174. Shankar A, Williams CT. The darkness and the light: diurnal rodent

- models for seasonal affective disorder // *Dis Model Mech.* – 2021. – Vol. 14(1):dmm047217.
175. Sher L., Goldman D., Ozaki N., Rosenthal N.E. The role of genetic factors in the etiology of seasonal affective disorder and seasonality – *J Affect Disord.* – 1999. – Vol. 53(3). – P. 203-10.
176. Sher L., Hardin T.A., Greenberg B.D., Murphy D.L., Li Q., Rosenthal N.E. Seasonality associated with the serotonin transporter promoter repeat length polymorphism // *Am J Psychiatry.* – 1999. – Vol. 156(11). – P. 1837.
177. Shih J.C., Thompson R.F. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior // *Am J Hum Genet.* – 1999. Vol. 65(3). – P. 593-598.
178. Shih J.C., Wu J.B., Chen K. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes // *J Neural Transm.* – 2011. – 118 (7). – P. 979-986.
179. Siesser W.B., Zhang X., Jacobsen J.P., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6J and BALB/c congenic mice // *Neurosci Lett.* – 2010. – Vol. 481. – P. 6-11.
180. Smagula S.F., DuPont C.M., Miller M.A., Krafty R.T., Hasler B.P., Franzen P.L., Roecklein K.A. Rest-activity rhythms characteristics and seasonal changes in seasonal affective disorder // *Chronobiol Int.* – 2018. – Vol. 35(11). – P. 1553-1559.
181. Sohn C.H., Lam R.W. Update on the biology of seasonal affective disorder // *CNS Spectr.* – 2005. – Vol. 10(8). – P. 635-646.
182. Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* // *Biol Rev Camb Philos Soc.* – 2008. Vol. 83(1). – P. 13-34.
183. Stanford S.C. The Open Field Test: reinventing the wheel // *J Psychopharmacol.* – 2007. – Vol. 21(2). – P. 134-135

184. Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A.V. Zebrafish models for translational neuroscience research: 575 From tank to bedside // *Trends Neurosci.* – 2014. – Vol. 37. – P. 264-278.
185. Talvik-Lotfi M., Nyberg S., Nordstrom A.L., Ito H., Halldin C., Brunner F., Farde L. High 5HT_{2A} receptor occupancy in M100907- treated schizophrenic patients // *Psychopharmacology.* – 2000. – Vol. 148. – P. 400-403.
186. Tam, E.M., Lam, R.W., Levitt, A.J. Treatment of seasonal affective disorder: a review // *Can. J. Psychiatry.* – 1995. – Vol. 40. – P. 457-466.
187. Terman M., Terman J.S., Quitkin F.M., McGrath P.J., Stewart J.W., Rafferty B. Light therapy for seasonal affective disorder. A review of efficacy. // *Neuropsychopharmacology* – 1989. – Vol. 2(1). – P. 1-22.
188. Thierry N., Willeit M., Praschak-Rieder N., Zill P., Hornik K., Neumeister A., Lenzinger E., Stastny J., Hilger E., Konstantinidis A., Aschauer H., Ackenheil M., Bondy B., Kasper S. Serotonin transporter promoter gene polymorphic region (5-HTTLPR) and personality in female patients with seasonal affective disorder and in healthy controls // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2004. – Vol. 14(1). – P. 53-58.
189. Toth M. 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety // *Eur J Pharmacol.* – 2003. – Vol. 463(1-3). – P. 177-184.
190. Treit D., Engin E., McEown K. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action // Treit D. *Curr Top Behav Neurosci.* – Germany, 2010. – Vol. 2. – P. 121-160.
191. Tyrer A.E., Levitan R.D., Houle S., Wilson A.A., Nobrega J.N., Meyer J.H. Increased Seasonal Variation in Serotonin Transporter Binding in Seasonal Affective Disorder // *Neuropsychopharmacology.* – 2016. – Vol. 41(a). – P. 2447-2454.

192. Tyrer A.E., Levitan R.D., Houle S., Wilson A.A., Nobrega J.N., Rusjan P.M., Meyer J.H. Serotonin transporter binding is reduced in seasonal affective disorder following light therapy // *Acta Psychiatr. Scand.* – 2016. – 134(b). – P. 410-419.
193. Van Praag H.M. Can stress cause depression? // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2004. Vol. 28. – P. 891-907.
194. Voronova I.P., Naumenko V.S., Khramova G.M., Kozyreva T.V., Popova N.K. Central 5-HT₃ receptor-induced hypothermia is associated with reduced metabolic rate and increased heat loss // *Neurosci Lett.* – 2011. – Vol. 504(3). – P. 209-214.
195. Walther D.J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // *Biochem Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66(9). – P. 1673-1680.
196. Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // *Science.* – 2003. – Vol. 299 (5603). – P. 76.
197. Wehr T.A. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications // *J Biol Rhythms.* – 2001. – Vol. 16(4). – P. 348-364.
198. Wehr T.A., Duncan W.C. Jr., Sher L., Aeschbach D., Schwartz P.J., Turner E.H., Postolache T.T., Rosenthal N.E. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder // *Arch Gen Psychiatry* – 2001. – Vol. 58(12). – P. 1108-1114.
199. Welsh J.H. Distribution of serotonin in the nervous system of various animal species // *Adv Pharmacol.* (1962). – 1968. – Vol. 6(Pt A). – P. 171-188.
200. Willeit M., Praschak-Rieder N., Neumeister A., Zill P., Leisch F., Stastny J., Hilger E., Thierry N., Konstantinidis A., Winkler D., Fuchs K., Sieghart W., Aschauer H., Ackenheil M., Bondy B., Kasper S. A polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter promoter gene is

- associated with DSM-IV depression subtypes in seasonal affective disorder // *Mol Psychiatry*. – 2003. – Vol. 8(11). – P. 942-946.
201. Willette A.A., Kapogiannis D. Does the brain shrink as the waist expands? // *Ageing Res. Rev.* – 2015. – Vol. 20. – P. 86-97.
202. Willner P., Scheel-Krüger J., Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2013. – Vol.37. – P. 2331-2371.
203. Wirz-Justice A, Ajdacic V, Rössler W, Steinhausen HC, Angst J. Prevalence of seasonal depression in a prospective cohort study // *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* – 2019. – Vol. 269(7). – P. 833-839.
204. Wu W.H., Cooper R.L. Serotonin and synaptic transmission at invertebrate neuromuscular junctions // *Exp Neurobiol.* – 2012. – Vol. 21(3). – P. 101-112
205. Yan H.C., Cao X., Das M., Zhu X.H., Gao T.M. Behavioral animal models of depression // *Neurosci. Bull.* – 2010. – Vol. 26(4). – P. 327–337.
206. Zaniewska M., McCreary A.C., Wydra K., Filip M. Effects of serotonin (5-HT)₂ receptor ligands on depression-like behavior during nicotine withdrawal // *Neuropharmacology.* – 2010. – Vol. 58. – P. 1140-1146.
207. Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – P. 217.
208. Zhang X., Gainetdinov R.R., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Burch L.H., Williams R.B., Schwartz D.A., Krishnan K.R., Caron M.G. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression // *Neuron.* – 2005. – Vol. 45. – P. 11-16.
209. Zhang X., Nichols P.J., Laje G., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Albert P.R., Rajkowska G., Stockmeier C.A., Speer M.C., Steffens D.C.,

- Austin M.C., McMahon F.J., Krishnan K.R., Garcia-Blanco M.A. & Caron M.G. A functional alternative splicing mutation in human tryptophan hydroxylase 2 // *Mol Psychiatry*. – 2011. – Vol. 16. – P. 1169-1176
210. Zhang G., Stackman Jr. R.W. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition // *Front Pharmacol*. – 2015. – Vol. 6. – P. 225.
211. Zhou Z., Roy A., Lipsky R., Kuchipudi K., Zhu G., Taubman J., Enoch M.A., Virkkunen M., Goldman D. Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations // *Arch Gen Psychiatry*. – 2005. – Vol. 62. – P. 1109-1118.