

ЭФФЕКТ АТИПИЧНЫХ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В МРТР-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2019 г. А. С. Цыбко^{1,2,*}, Т. В. Ильчибаева¹, Н. В. Хоцкин¹,
А. И. Коветская¹, В. С. Науменко¹, Н. К. Попова¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2018 г.

После доработки 11.10.2018 г.

Принята к публикации 18.10.2018 г.

Атипичные антипсихотические препараты (ААП) используются в терапии болезни Паркинсона для устранения психотических симптомов. Поскольку нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor (BDNF)), глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) и дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)) играют значительную роль в лечении паркинсонизма, целью данного исследования стало изучение эффектов длительного введения широко используемых ААП, клозапина и кветиапина, на двигательную активность и экспрессию генов, кодирующих BDNF, GDNF и CDNF в мозге мышей линии C57Bl/6 с болезнью Паркинсона, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)). Введение клозапина и кветиапина (1 мг/кг в. б.) было осуществлено через 48 ч после последней инъекции МРТР и продолжалось в течение последующих 16 дней. После этого оценивалась двигательная активность животных в тестах “открытое поле” и “рота-род”. По завершении тестов животных усыпляли, извлекали черную субстанцию, стриатум и гиппокамп для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализа уровня тирозин гидроксилазы (ТН). Введение МРТР привело к 50% снижению уровня ТН в стриатуме животных. Также МРТР вызвал снижение уровня мРНК BDNF и GDNF в гиппокампе и стриатуме соответственно. В то же время было выявлено усиление экспрессии GDNF в черной субстанции мышей из группы МРТР + клозапин. МРТР вызвал значительное снижение уровня мРНК CDNF в черной субстанции с одновременным повышением в стриатуме. Как клозапин, так и кветиапин снизили уровень мРНК CDNF в стриатуме до нормального уровня. Таким образом впервые был показан эффект АПП клозапина и кветиапина на экспрессию генов GDNF и CDNF в фармакологической модели болезни Паркинсона.

Ключевые слова: атипичные антипсихотики, клозапин, кветиапин, BDNF, GDNF, CDNF, болезнь Паркинсона, МРТР модель

DOI: 10.1134/S1027813319020122

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона является тяжелым прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, приводящим к инвалидизации и потере трудоспособности. Среди не моторных симптомов болезни Паркинсона – психоз, наблюдаемый в 20–40% случаев, чаще всего связан с ухудшением состояния и качества жизни пациентов [1]. Психотические симптомы при паркинсонизме могут быть вызваны различными факторами, такими как дофамин-замещающая терапия, нейро-

химические и структурные нарушения, генетические факторы, нарушения сна, недостаток визуальной обработки стимулов и глубокая стимуляция мозга [2]. Атипичные антипсихотические препараты (ААП), особенно клозапин и кветиапин, хорошо себя зарекомендовали в различных клинических испытаниях [3, 4] и были одобрены для эффективного лечения психоза без ухудшения двигательных функций у пациентов с болезнью Паркинсона.

Известно, что нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor (BDNF)) и глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) важны для выживания дофаминергических (ДА) нейро-

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10; e-mail: antoncybko@mail.ru.

нов [5–7]. Многие статьи, основанные на животных моделях болезни Паркинсона, сообщают о положительных эффектах лечения данными нейротрофическими факторами поврежденных nigrostriальных нейронов (см. обзоры Nagahara and Tuszynski, [8] и d'Anglemont de Tassigny et al., [9]). Кроме того, растет число свидетельств, указывающих на то, что недавно открытый дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)) также может защищать и восстанавливать ДА нейроны *in vivo* [10]. Хотя механизм нейропротекторного действия CDFN по большей части остается неизвестен, эксперименты на животных моделях болезни Паркинсона многообещающие [10, 11]. В то же время, поскольку экзогенный GDNF не показал значительного и воспроизводимого эффекта в клинических испытаниях [9], важно исследовать фармакологические подходы к усилению продукции эндогенных нейротрофических факторов.

Существует ряд исследований, демонстрирующий эффект ААП на экспрессию нейротрофических факторов *in vitro* и *in vivo*. Кветиапин эффективно устраняет вызванное иммобилизационным стрессом снижение экспрессии BDNF в гиппокампе и фронтальной коре крыс [12]. Показано, что клозапин увеличивает уровень мРНК BDNF в гиппокампе [13] или фронтальной коре [14] интактных крыс. Во всех случаях как кветиапин, так и клозапин продемонстрировали эффект на экспрессию BDNF только когда вводились хронически. Кроме того, в мета-аналитическом исследовании Fernandes и др., [15], основанном на анализе 41 исследования, показано, что уровень периферического BDNF существенно повышается после лечения ААП (включая клозапин и кветиапин), вне зависимости от ответа пациентов на лечение шизофрении. В отношении GDNF накоплено намного меньше данных. В одном исследовании было показано, что клозапин и кветиапин усиливают секрецию GDNF из клеток глиомы С6 в среду время- и дозозависимым образом [16]. В другом исследовании [17] на культуре клеток глиомы С6 также был показан сходный эффект кветиапина и норкветиапина (основного метаболита кветиапина). Хотя CDFN становится важной мишенью в терапии болезни Паркинсона, эффект ААП на экспрессию CDFN остается неизвестен. Более того, эффект ААП на экспрессию генов BDNF и GDNF в контексте болезни Паркинсона также не был исследован прежде.

Таким образом, целью данного исследования стало изучение эффектов длительного введения широко используемых ААП, клозапина и кветиапина, на двигательную активность и экспрессию генов, кодирующих BDNF, GDNF и CDFN в мозге мышей с болезнью Паркинсона, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТР).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и препараты. В эксперименте использовали взрослых самцов мышей линии C57Bl/6 (The Jackson Laboratory, возраст 10–11 нед., вес 23–26 г). Содержание экспериментальных животных и все процедуры соответствовали Международным правилам обращения с животными в нейробиологических исследованиях (the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research (2010)) и были одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (разрешение № 27 от 12 мая 2015 г.). Были предприняты все попытки минимизировать число использованных животных и их страдания. Исследование проводилось на базе ЦКП “SPF виварий” ИЦиГ СО РАН (RFMEFI62117X0015).

Причина, по которой нами был использован МРТР, заключается в том, что данный препарат остается одним из наиболее используемых средств создания токсической модели болезни Паркинсона и позволяет сымитировать многие аспекты заболевания, предоставляя модельную платформу для проверки нейропротекторных препаратов [18]. МРТР (Sigma Aldrich) вводили в дозе 17 мг/кг в. б., четырежды с двухчасовым интервалом в соответствии с протоколом Jackson-Lewis и Przedborski [19]. Данная доза была выбрана по причине высокой смертности животных получавших более высокую дозу (24 мг/кг) в предварительном эксперименте. Мы использовали 4 группы животных: NaCl (в качестве контроля), МРТР + NaCl, МРТР + клозапин и МРТР + кветиапин. Клозапин и кветиапин (Sigma Aldrich) в дозе 1 мг/кг в. б., начинали вводить через 48 ч после последней инъекции МРТР.

Оценка двигательной активности. Двигательную активность животных исследовали на 16-й и 17-й дни введения ААП (рис. 1). *Тест открытого поля* проводили с использованием открытой арены (40 см в диаметре) сделанной из белого пластика и подсвеченной через полупрозрачный пол двумя галогеновыми лампами по 12 Вт каждая, размещенных в 40 см под полом арены [20]. Каждое животное помещали поблизости от стенки арены и тестировали в течение 5 мин. Видеопоток с цифровой камеры (Sony, Japan) анализировался с использованием программного пакета EthoStudio [20]. Горизонтальную двигательную активность (пройденный путь) и время в центре определяли автоматически. Число и тип вертикальных стоек (с опорой или без опоры на стенку арены) измеряли вручную. В тесте *rota-rod* каждую мышь помещали в отдельный отсек установки (Ugo Basile, Italy) на поворачивающийся цилиндр диаметром 5 см. Вначале мышей помещали на цилиндр на 30 с без ротации для привыкания. После начала цилиндра медленно раскручивался и достигал скорости 5 об./мин. Выполнение теста фиксировали в

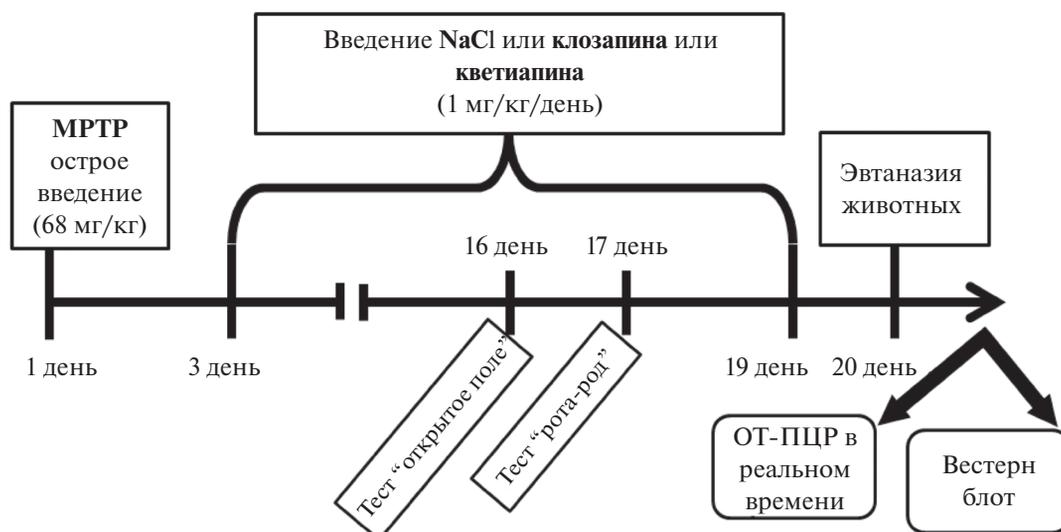


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

четырёх последовательных повторах с 5 мин периодом отдыха между каждым подходом и измеряли как среднее латентное время падения с цилиндра (до 300 с).

ОТ-ПЦР. Для подготовки образцов мозга, мыши были декапитированы; гиппокамп, стриатум и черная субстанция были извлечены, заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80°C до процедуры выделения РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Общую РНК обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RQ1RNase-Free DNase, Promega Corporation, США) в соответствии с протоколами производителей. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [21]. РНК разво-

дили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при -80°C . Один микрограмм суммарной РНК в смеси с случайными гексануклеотидами был взят для синтеза кДНК [21, 22]. Число копий кДНК генов *Bdnf*, *Gdnf*, *Cdnf* а также ДНК-зависимой РНК полимеразы II (*rPol II*) определяли с помощью количественного ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I, специфических праймеров (табл. 1) и 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 и 6400 копий геномной ДНК в качестве внешнего стандарта для всех исследованных генов. Калибровочная кривая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 (Roche Applied Science). Экспрессию генов представляли как отношение количества копий кДНК анализируемого гена к 100 копиям гена *rPol II*, выполняющего функцию внутреннего стандарта [21, 22].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген/область	Последовательность	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>Bdnf</i>	F5'-tagcaaaaagagaattggctg-3'	59	255
	R5'-tttcaggatcatgatattgtcc-3'		
<i>Gdnf</i>	F5'-tttgaagacgccagggaatg-3'	62	242
	R5'-tgtccagaatcaaccaccaag-3'		
<i>Cdnf</i>	F5'-cttgggctcagggatttgg-3'	60	207
	R5'-ttggggaaactgtgaggtgg-3'		
<i>rPol II</i>	F5'-gttgcgggcagcagaatgtag-3'	63	188
	R5'-tcaatgagaccttctcgtcctcc-3'		

Вестерн-блот анализ. Цитозольный белок выделяли, гомогенизируя образцы стриатума в буфере, содержащем 10 мМ Трис HCl, pH 7.2, 1 мМ EDTA, 5 мМ β -меркаптоэтанол и ингибиторы протеаз (GE Healthcare, США). Центрифугировали на 2000 об./мин 15 мин при 4°C, отбирали супернатант и центрифугировали на 14000 об./мин при 4°C в течение часа.

Концентрацию общего белка оценивали с помощью BCA метода, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и спектрофотометр Eppendorf (BioPhotometer plus, Eppendorf, США). В дальнейшем образцы приводили к равной концентрации (1 мг/мл) с помощью 4-кратного Лемли буфера, содержащего 62 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 10% сахарозы, 2% SDS, 5% β -меркаптоэтанол и денатурировали с помощью нагрева в течение 10 минут при 95°C. Образцы (10 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-го SDS-PAGE гель-электрофореза и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), используя полусухой электроблоттинг, в течение ночи при силе тока 50 мА. Для переноса использовали буфер, содержащий 190 мМ глицина, 25 мМ Трис-HCl pH 8.3 и 20% метанола. В качестве маркера использовали смесь Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали с 5%-ным сухим обезжиренным молоком Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), разведенном в TBS-T буфере (Tris Buffered Saline, Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с добавлением 0.05% Tween 20), в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. Были использованы первичные поликлональные антитела кролика к тирозингидроксилазе (ТН; 1 : 200, ab112, Abcam, UK). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к GAPDH, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 500; Santa Cruz Biotechnology Inc., США). Отмывали мембрану 5 \times 5 мин буфером TBS-T, добавляли вторичные поликлональные антитела козы, направленные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc., США), и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Повторяли отмывку мембраны. Все связанные антитела визуализировали с помощью Super Signal TM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя и гельдокументирующей системы Fusion FX7-820 System (Vilber Lourmat, Франция). Полученное изображение денситометрировали, и количественно оценивали содержание белка при помощи программы Scion Image (Scion Corporation, www.scioncorp.com). Экспрессию белка вы-

ражали в относительных единицах и нормировали на экспрессию GAPDH, которая конститутивна для клеток мозга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Двигательная активность животных, получавших только NaCl, как и тех, кто получил МРТР, не была изменена во всех повторах в тесте ротаход (латентное время падения с цилиндра во всех случаях равно 300 с). МРТР также не вызвал значительного ухудшения двигательной активности в тесте открытого поля. Более того, у животных получивших МРТР значительно возросла пройденная дистанция (рис. 2а). Напротив, ААП снизили пройденную дистанцию до уровня животных из контрольной группы. Время, проведенное в центре арены, было значительно ниже в группе МРТР + NaCl по сравнению с контрольной группой (рис. 2б). Введение МРТР в комбинации с кветиапином вызвало значительное снижение вертикальной активности (рис. 2в), в то время как число вертикальных стоек с опорой на стенку арены (рис. 3а) или без опоры (рис. 3б) не изменялось во всех группах животных.

Не смотря на отсутствие значительных изменений в двигательной активности, мы обнаружили 50% снижение уровня белка ТН в стриатуме мышей, получивших МРТР (рис. 4). Ни клозапин, ни кветиапин достоверно не увеличили уровень белка ТН у животных, которым вводился МРТР.

В гиппокампе выявлено значительное ($p < 0.001$) снижение уровня мРНК *Bdnf* после введения МРТР (рис. 5а). Введение клозапина и кветиапина не оказало влияния на уровень мРНК *Bdnf*. МРТР вызвал значительное снижение уровня мРНК *Gdnf* в стриатуме ($p < 0.001$; рис. 5б). В стриатуме также был обнаружен сниженный уровень ($p < 0.001$) мРНК *Gdnf* в группах МРТР + клозапин и МРТР + кветиапин. В черной субстанции, напротив, введение кветиапина привело к повышению мРНК *Gdnf* ($p < 0.05$). Значительное снижение уровня мРНК *Cdnf* было обнаружено в черной субстанции мышей из групп МРТР + NaCl, МРТР + клозапин и МРТР + кветиапин ($p < 0.001$; рис. 5в). В то же время, в стриатуме уровень мРНК *Cdnf* был повышен после введения МРТР ($p < 0.001$), тогда как хроническое введение клозапина и кветиапина снизило уровень мРНК до уровня контрольной группы ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как ААП, так и МРТР не вызвали существенных изменений в двигательной активности мышей. Данный результат не является неожиданным, так как спонтанное восстановление двигательных функций после МРТР — это часто наблюдаемое

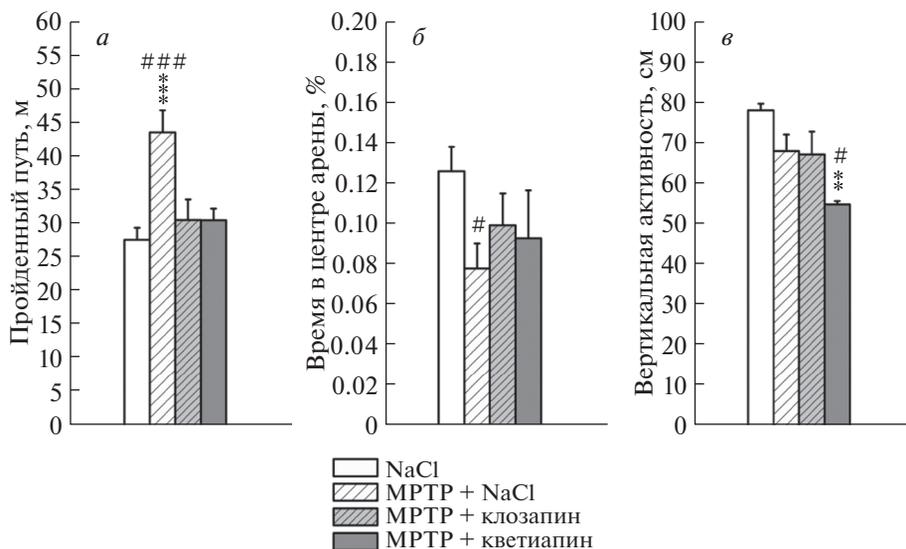


Рис. 2. Двигательная активность в тесте открытого поля после МРТР, хронического введения ААП или NaCl. Введение МРТР увеличило общую пройденную дистанцию (а). Только МРТР + NaCl вызвал значительное снижение времени пребывания в центре арены (б). МРТР + кветиапин, но не клозапин и NaCl, снизил вертикальную активность (в). $n \geq 6$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с контролем; # $p < 0.05$ – по сравнению с группой МРТР + NaCl и МРТР + клозапин; ### $p < 0.001$ – по сравнению с группой МРТР + клозапин и МРТР + кветиапин.

явление [23, 24]. В этом отношении, выявленное нами снижение уровня TH в стриатуме животных получивших МРТР, является более надежным свидетельством эффекта МРТР. Увеличение длины пройденного пути и снижение времени нахождения в центре арены в тесте “открытое поле” в группе МРТР + NaCl указывает на анксиогенный эффект МРТР. Этот эффект согласуется с литературными данными [23]. Введение ААП подавило вызванную МРТР гиперлокомоцию. Известно, что дефицит ДА в стриатуме компенсируется усилением серотонинергической активности [25], которая может повышать двигательную активность. Таким образом, ААП могут действовать как антагонисты серотониновых рецепторов [26] и снижать уровень серотонина, что приводит к отмене гиперлокомоции.

Мы выявили значительное снижение экспрессии BDNF в гиппокампе животных, получивших МРТР. Хорошо известно, что BDNF может усиливать дифференцировку и созревание [27, 28] ДА нейронов и регулировать секрецию ДА в стриатуме [29, 30]. BDNF широко экспрессируется и хранится в мезенцефалических нейронах и считается важнейшим фактором в модуляции потока информации в черной субстанции в нормальном состоянии и при повреждении дофаминергических нейрональных путей [31]. В то время как в ряде работ сообщается о повышении экспрессии BDNF после 6-ОНДА [31], данные об эффекте МРТР противоречивы. Cunha и соавт. [32] сообщили о повышении уровня стриатального BDNF после МРТР, хотя подобный эффект не был обна-

ружен в черной субстанции [33] и гиппокампе [34]. По-видимому, расхождения между различными исследованиями может быть объяснено различными дозами, временем и режимом введения МРТР.

Ни один из использованных ААП не вызвал изменений в экспрессии мРНК BDNF. Стоит отметить, что в большинстве исследований [13, 14, 35–39] были использованы дозы ААП соответствующие тем, что применяются для лечения шизофрении (10 мг/кг/день или больше). Это эквивалентно дозировке, применяемой для лечения шизофрении у человека (300–900 мг/день), в то время как терапия психоза при болезни Паркинсона подразумевает более низкие дозы (25–35 мг/день или ниже [1, 4]). Таким образом, использованная нами дозировка (1 мг/кг/день) более соответствует той, что применяется при лечении психоза, ассоциированного с паркинсонизмом. Вероятно, при такой дозировке ААП не способны модулировать экспрессию BDNF.

Значительное снижение экспрессии GDNF в стриатуме мышей получивших МРТР указывает на значительное повреждение стриатальных нейронов (что подтверждается и низким уровнем белка TH в данной структуре). Однако существует ряд противоречивых данных, показывающих, что токсическое поражение может и усиливать, и ослаблять экспрессию GDNF в nigrostriальных нейронах [40]. В основе противоречивых результатов могут лежать чисто методические различия (например выбор 6-ОНДА или МРТР в качестве токсической модели). Следует отметить, что уси-

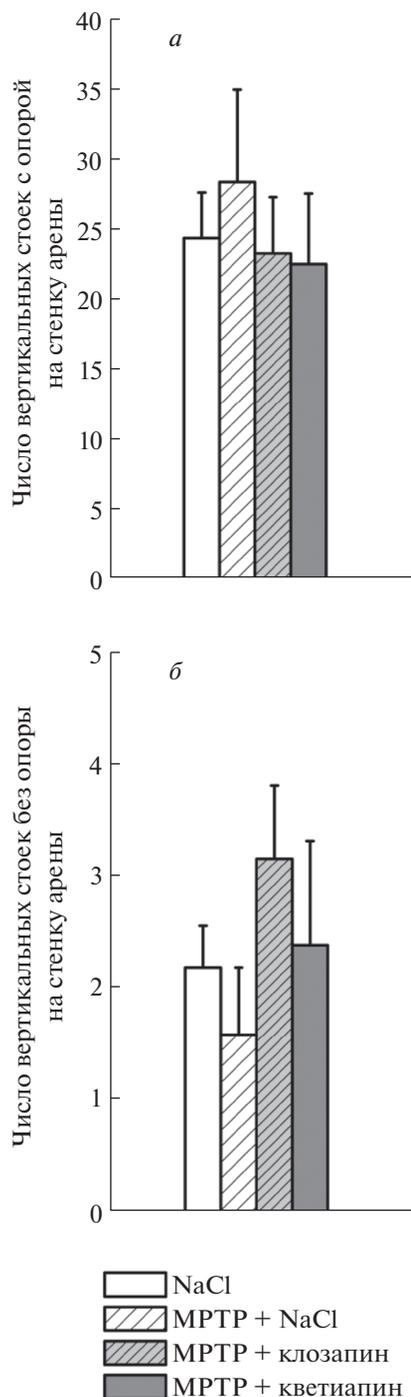


Рис. 3. МРТР, а также АРР, не повлияли на число вертикальных стоек с опорой на стенку арены (а) или без таковой (б). $n \geq 6$.

ление экспрессии GDNF, часто сообщаемое как результат активации астроцитов при nigrostriальном повреждении, может зависеть от тяжести поражения ДА нейронов. В соответствии с этим, обширное повреждение не может индуцировать усиление экспрессии GDNF [41].

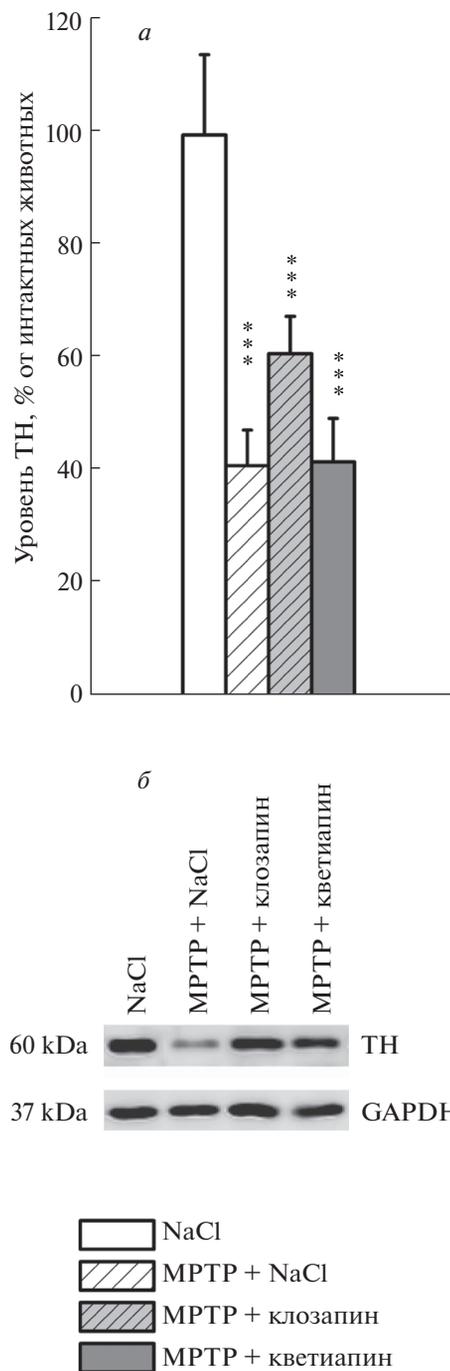


Рис. 4. Уровень белка тирозин гидроксилазы в стриатуме мышей, получивших МРТР или МРТР + ААП. (а) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала; (б) результат иммуноблота на мембране. Уровень белка ТН представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH. $n \geq 6$, *** $p < 0.001$ – по сравнению с контролем.

Мы показали, что только клозапин вызвал значительное повышение продукции GDNF в черной субстанции мышей получивших МРТР. Shao и соавт. [16] и Di Benedetto и соавт. [17] сообщают об

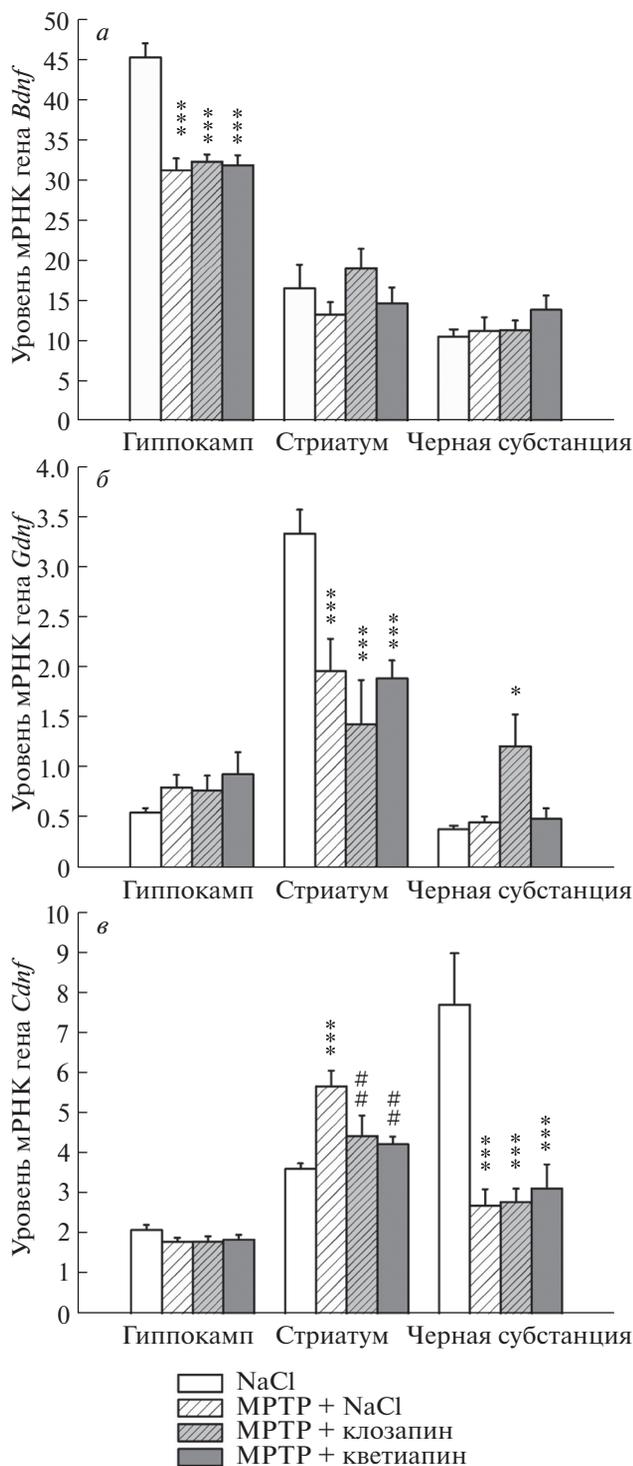


Рис. 5. Экспрессия генов, кодирующих BDNF (а), GDNF (б) и CDNF (в) после введения МРТР или в комбинации с ААП или NaCl. Экспрессия генов представлена как число копий кДНК гена, отнесенное на 100 копий кДНК rPо1 II. $n \geq 6$, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ — по сравнению с контролем; ## $p < 0.01$ — по сравнению с группой МРТР + NaCl.

индуцированном клозапином повышении секреции, но не содержания GDNF в клетках глиомы С6. Таким образом, мы впервые сообщили об усилении экспрессии гена, кодирующего GDNF *in vivo* после хронического введения клозапина. Стоит также помнить, что индуцированная клозапином секреция GDNF в значительной степени дозозависимая [16, 17] и в меньшей дозировке клозапин менее эффективен. Для того чтобы определить точное отношение между дозировкой и эффектом клозапина в различных структурах мозга требуются дополнительные исследования.

CDNF имеет уникальный принцип действия, поскольку он не оказывает эффекта на нативные, здоровые клетки и нейроны, но активизируется при наличии какого-либо повреждения [10]. Известно, что CDNF это ЭПР-резидентный белок, который может секретироваться при определенных условиях, например поражении. Кроме того, важно, что CDNF оказывает селективный эффект на нигростриальные ДА нейроны, которые являются мишенью для его действия [10, 11]. Хотя ожидаемо, что экспрессия CDNF может усиливаться после токсического поражения вызванного МРТР, такой эффект ранее не был показан *in vivo*. Нами наблюдалось повышение экспрессии CDNF в стриатуме животных получивших МРТР. В то же время, МРТР вызвал значительное снижение экспрессии CDNF в черной субстанции. Интересно, что в черной субстанции CDNF обнаружен только в солитарных клетках, но не ДА нейронах [42]. Тот факт, что CDNF эффективно транспортируется ретроградно из стриатума в черную субстанцию [43], указывает на черную субстанцию как на мишень для CDNF, производимого в стриатуме. Это подтверждается значительным восстановлением нейронов черной субстанции, когда CDNF вводился интратриатально в 6-ОНДА и МРТР моделях [10]. Возможно, стриатальный CDNF может быть вовлечен в выживание нейронов черной субстанции, что не требует усиления в ней экспрессии CDNF. Интересно отметить, что оба примененных ААП снизили экспрессию CDNF в стриатуме и вернули ее к уровню контрольных животных.

Таким образом, нами впервые показан эффект ААП клозапина и кветиапина на экспрессию генов, кодирующих GDNF и CDNF в МРТР модели болезни Паркинсона. Низкие дозы ААП не вызвали изменений в экспрессии BDNF и ограничено повлияли на экспрессию GDNF. В то же время был показан супрессивный эффект ААП на экспрессию CDNF.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-15-01021). Содержание лабо-

раторных животных поддержано бюджетным проектом (№ 0324-2019-0041).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Friedman J.H.* // *Behav. Neurol.* 2013. V. 27. P. 469–477.
2. *Zahodne L.B., Fernandez H.H.* // *Drugs Aging.* 2008. V. 25. P. 665–682.
3. *Seppi K., Weintraub D., Coelho M., Perez-Lloret S., Fox S.H., Katzenschlager R., Hametner E.M., Poewe W., Rascol O., Goetz C.G., Sampaio C.* // *Mov. Disord.* 2011. V. 26. P. 42–80.
4. *Hack N., Fayad S.M., Monari E.H., Akbar U., Hardwick A., Rodriguez R.L., Malaty I.A., Romrell J., Shukla A.A., McFarland N., Ward H.E., Okun M.S.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. e91545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091545>.
5. *Bustos G., Abarca J., Campusano J., Bustos V., Noriega V., Aliaga E.* // *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2004. V. 47. P. 126–144.
6. *Guillin O., Demily C., Thibaut F.* // *Int. Rev. Neurobiol.* 2007. V. 78. P. 377–395.
7. *Pascual A., Hidalgo-Figueroa M., Gómez-Díaz R., López-Barneo J.* // *J. Mol. Endocrinol.* 2011. V. 46. P. 83–92.
8. *Nagahara A.H., Tuszynski M.H.* // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. V. 10. P. 209–219.
9. *d'Anglemont de Tassigny X., Pascual A., López-Barneo J.* // *Front. Neuroanat.* 2015. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00010>.
10. *Voutilainen M.H., Arumäe U., Airavaara M., Saarma M.* // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. P. 3739–3748.
11. *Tang T., Li Y., Jiao Q., Du X., Jiang H.* // *Neurosci. Bull.* 2017. V. 33. P. 568–575.
12. *Miranda A.S., Moreira F.A., Teixeira A.L.* // *Expert Opin. Drug Discov.* 2017. V. 12. P. 525–535.
13. *Bai O., Chlan-Fourney J., Bowen R., Keegan D., Li X.M.* // *J. Neurosci. Res.* 2003. V. 71. P. 127–131.
14. *Balu D.T., Hoshaw B.A., Malberg J.E., Rosenzweig-Lipson S., Schechter L.E., Lucki I.* // *Brain Res.* 2008. V. 1211. P. 37–43.
15. *Fernandes B.S., Steiner J., Berk M., Molendijk M.L., Gonzalez-Pinto A., Turck C.W., Nardin P., Gonçalves C.A.* // *Mol. Psychiatry.* 2015. V. 20. P. 1108–1119.
16. *Shao Z., Dyck L.E., Wang H., Li X.M.* // *J. Psychiatry Neurosci.* 2006. V. 31. P. 32–37.
17. *Di Benedetto B., Kühn R., Nothdurfter C., Rein T., Wurst W., Rupprecht R.* // *Neuropharmacology.* 2012. V. 62. P. 209–216.
18. *Blesa J., S. Przedborski S.* // *Front. Neuroanat.* 2014. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>.
19. *Jackson-Lewis V., Przedborski S.* // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 141–151.
20. *Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A.* // *J. Neurosci. Methods.* 2008. V. 170. P. 345–351.
21. *Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K.* // *J. Neurosci. Methods.* 2005. V. 141. P. 97–101.
22. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V.* // *J. Neurosci. Methods.* 2008. V. 170. P. 197–203.
23. *Sedelis M., Schwarting R.K., Huston J.P.* // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. P. 109–125.
24. *Hutter-Saunders J.A., Gendelman H.E., Mosley R.L.* // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012. V. 7. P. 279–288.
25. *Chia L.G., Ni D.R., Cheng F.C., Ho Y.P., Kuo J.S.* // *Neurochem. Res.* 1999. V. 24. P. 719–722.
26. *Amato D.* // *Behav. Brain Res.* 2015. V. 277. P. 125–135.
27. *Zhou J., Bradford H.F., Stern G.M.* // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1997. V. 100. P. 43–51.
28. *Riaz S.S., Jauniaux E., Stern G.M., Bradford H.F.* // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2002. V. 136. P. 27–34.
29. *Narita M., Aoki K., Takagi M., Yajima Y., Suzuki T.* // *Neuroscience.* 2003. V. 119. P. 767–775.
30. *Goggi J., Pullar I.A., Carney S.L., Bradford H.F.* // *Brain Res.* 2003. V. 968. P. 156–161.
31. *Bustos G., Abarca J., Campusano J., Bustos V., Noriega V., Aliaga E.* // *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2004. V. 47. P. 126–144.
32. *Cunha M.P., Pazini F.L., Lieberknecht V., Budni J., Oliveira A., Rosa J.M., Mancini G., Mazzardo L., Colla A.R., Leite M.C., Santos A.R.S., Martins D.F., de Bem A.F., Gonçalves C.A.S., Farina M., Rodrigues A.L.S.* // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 6356–6377.
33. *Mocchetti I., Bachis A., Nosheny R.L., Tanda G.* // *Neurotoxicol. Res.* 2007. V. 12. P. 135–143.
34. *Lesemann A., Reinel C., Hühnchen P., Pilhatsch M., Hellweg R., Klaisle P., Winter C., Steiner B.* // *Brain Res.* 2012. V. 1457. P. 51–69.
35. *Fumagalli F., Molteni R., Bedogni F., Gennarelli M., Perez J., Racagni G., Riva M.A.* // *Neuroreport.* 2004. V. 15. P. 2109–2112.
36. *Xu H., Chen Z., He J., Haimanot S., Li X., Dyck L., Li X.M.* // *Hippocampus.* 2006. V. 16. P. 551–559.
37. *Park S.W., Lee S.K., Kim J.M., Yoon J.S., Kim Y.H.* // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 402. P. 25–29.
38. *Kim H.W., Cheon Y., Modi H.R., Rapoport S.I., Rao J.S.* // *Psychopharmacology (Berl.).* 2012. V. 222. P. 663–674.
39. *Rizig M.A., McQuillin A., Ng A., Robinson M., Harrison A., Zvelebil M., Hunt S.P., Gurling H.M.* // *J. Psychopharmacol.* 2012. V. 26. P. 1218–1230.
40. *Saavedra A., Baltazar G., Duarte E.P.* // *Prog. Neurobiol.* 2008. V. 86. P. 186–215.
41. *Saavedra A., Baltazar G., Santos P., Carvalho C.M., Duarte E.P.* // *Neurobiol. Dis.* 2006. V. 23. P. 533–542.
42. *Lindholm P., Voutilainen M.H., Laurén J., Peränen J., Leppänen V.M., Andressoo J.O., Lindahl M., Janhunen S., Kalkkinen N., Timmusk T., Tuominen R.K., Saarma M.* // *Nature.* 2007. V. 448. P. 73–77.
43. *Voutilainen M.H., Bäck S., Peränen J., Lindholm P., Raasmaja A., Männistö P.T., Saarma M., Tuominen R.K.* // *Exp. Neurol.* 2011. V. 228. P. 99–108.

The Effect of Atypical Antipsychotic Drugs on the Neurotrophic Factors Gene Expression in the MPTP Model of Parkinson's Disease

A. S. Tsybko^{a,b}, T. V. Ilchibaeva^a, N. V. Khotkin^a, A. I. Kovetskaya^a,
V. S. Naumenko^a, and N. K. Popova^a

^aThe Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Received September 26, 2018;

Revised October 11, 2018;

Accepted October 18, 2018

Atypical antipsychotics (AAP) are used in the therapy of Parkinson's disease (PD) for elimination of psychotic symptoms. As the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) play a crucial role in the PD treatment, the aim of our study was the investigation of the effects of chronic treatment with commonly used AAP, clozapine and quetiapine, on the motor behavior and the BDNF, GDNF and CDFN genes expression in the mouse brain in the PD model produced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Clozapine and quetiapine (1 mg/kg, i.p.) were administered 48 hours after the last MPTP injection, and treatment continued for the following 16 days. Then animals were euthanized, substantia nigra (SN), striatum (St) and hippocampus (Hc) were extracted for RT-PCR and tyrosine hydroxylase (TH) western blot assessment. MPTP treatment led to 50% depletion in the TH protein level in the St. MPTP caused significant decrease in both BDNF and GDNF mRNA level in the Hc and St, respectively. At the same time, increase in the GDNF expression in the MPTP+clozapine group in the SN was found. MPTP caused dramatic decrease in the CDFN mRNA level in the SN with simultaneous increase in the St. Both clozapine and quetiapine decreased it to a normal level in the St. The effect of AAP clozapine and quetiapine on the GDNF and CDFN genes expression in the pharmacological model of PD has been shown for the first time.

Keywords: atypical antipsychotics, clozapine, quetiapine, BDNF, GDNF, CDFN, Parkinson's disease, MPTP model