

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

Куварзин Савелий Ростиславович

Исследование рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, в качестве новых мишеней  
для лечения расстройств центральной нервной системы

Научная специальность 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
кандидат медицинских наук,  
Гайнетдинов Рауль Радикович

Санкт-Петербург – 2023

## Оглавление

1. Введение.....	4
Актуальность темы исследования .....	4
Теоретическая и практическая значимость работы .....	4
Цели и задачи исследования.....	5
Научная новизна исследования.....	6
Положения, выносимые на защиту.....	6
Личный вклад автора .....	7
Публикации и апробация работы.....	7
2. Обзор литературы.....	8
Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами.....	8
Эктопическая локализация обонятельных рецепторов .....	12
Исследование TAAR1-агонистов как потенциальных лекарственных средств .....	14
3. Исследование <i>in vivo</i> активности новых синтезированных TAAR1-агонистов.....	27
Исследование действия вещества LK00764 на двигательную гиперактивность мышей, вызванную введением ингибитора дофаминавого транспортера GBR 12909 .....	28
Исследование гипотермического действия LK00764 на крысах .....	31
Исследование воздействия на поведение мышей вещества LK00764 при остром введении в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тест вынужденного плавания» .....	33

Исследование воздействия на поведение мышей вещества LK00764 при субхроническом 14-дневном введении в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тест вынужденного плавания».....	43
Исследование активности веществ AP161-AP164 на крысиной модели двигательной гиперактивности, вызванной нокаутом гена дофаминавого транспортера (DAT).....	52
4. Поведенческая характеристика мышей, мутантных по гену TAAR6 .....	59
5. Оценка содержания моноаминов в структурах мозга TAAR6-мутантных мышей .....	74
6. Поведенческая характеристика мышей, нокаутных по гену TAAR2.....	80
7. Оценка содержания моноаминов в структурах мозга TAAR2-нокаутных мышей.....	90
8. Обсуждение результатов .....	96
9. Заключение.....	101
Выводы .....	101
Благодарности.....	102
Список использованной литературы .....	103

## 1. Введение

### Актуальность темы исследования

Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами (TAAR), были открыты в 2001 году [1,2]. С тех пор накапливается всё больше данных о локализации данных рецепторов в центральной нервной системе и их функциональной роли в головном мозге. Наиболее изученным на момент написания работы рецептором является TAAR1: в литературе описано модулирующее действие TAAR1 на серотониновые, дофаминовые нейроны и глутаматную нейротрансмиссию в коре головного мозга [3,4]. По этой причине активно изучаются соединения, обладающие агонистической активностью в отношении TAAR1, в качестве антиаддиктивных, антипсихотических, анксиолитических и антидепрессивных средств. На поздних стадиях клинических исследований находятся два TAAR1-агониста: улотаронт от компании Sunovion (США) и ралмитаронт от компании Hoffmann-La Roche (Швейцария). Улотаронт при успешном прохождении третьей фазы клинических исследований может стать первым антипсихотическим препаратом в клинической практике с пятидесятых годов прошлого столетия, не влияющим напрямую на D2-подобные и 5HT<sub>2A</sub> рецепторы [5]. Разработка новых агонистов TAAR1 является одним из перспективных направлений в современной фармакологии. Функции остальных рецепторов семейства TAAR остаются малоизученными, хотя недавно появились данные о локализации рецептора TAAR5 в центральной нервной системе, а также наличии изменений в поведении и физиологии у животных, нокаутных по гену TAAR5 [6]. Эти данные меняют сложившиеся представления, так как ранее считалось, что все TAAR, за исключением рецепторов 1-го подтипа, играют преимущественно обонятельную роль [7–9]. Исследование физиологического значения активации других подтипов TAAR в ЦНС может стать такой же фундаментальной базой, какой в своё время стало исследование рецепторов к другим моноаминам. Результатом этой деятельности могут оказаться новые знания о физиологии ЦНС, патогенезе различных заболеваний, а также разработка нейрорепродуктивных препаратов с новыми механизмами действия, что является актуальной задачей современной фармакологии.

### Теоретическая и практическая значимость работы

В результате исследования выявлено два новых, активных *in vivo* соединения, AP163 и LK00764, обладающих агонизмом в отношении TAAR1. Оба вещества показали эффективность в *in vivo* моделях шизофрении и мании. У LK00764 также были обнаружены потенциальные анксиолитические свойства. Проведённые исследования могут стать началом дальнейшей разработки и внедрения в клиническую практику данных фармакологических препаратов и служить в качестве ранних этапов доклинической разработки антипсихотиков и анксиолитиков

с новым механизмом действия. Так же на базе структуры изученных молекул возможно создание других соединений путём их химической модификации. Полученные данные о влиянии нокаута гена TAAR2 на двигательную активность животных помогут в дальнейшей идентификации функциональной роли данного гена в физиологии грызунов и человека. Выявление изменений в поведении и ответе на фармакологические препараты, вызванных мутацией гена TAAR6, станет отправной точкой в дальнейших исследованиях функций этого гена. В совокупности наличие изменений в поведении, нейрохимии и ответе на препараты нейротропного действия у животных, нокаутных по гену TAAR2 и мутантных по гену TAAR6 по всей видимости говорят о наличии дополнительных ролей этих генов в центральной нервной системе, помимо уже известных обонятельных функций. Появляется первое теоретическое обоснование использования рецепторов TAAR2 и TAAR6 в качестве новых мишеней для нейротропных фармакологических препаратов.

### **Цели и задачи исследования**

Цели исследования:

1. Изучить профиль фармакологической активности синтезированных в Институте химии СПбГУ TAAR1-агонистов на различных крысиных и мышинных моделях.
2. Изучить роль генов TAAR2 и TAAR6 в регуляции поведения и физиологии.

Задачи исследования:

1. Оценить эффекты агонистов TAAR1 AP161, AP162, AP163 и AP164 на двигательную активность крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера;
2. Оценить эффекты агониста TAAR1 LK00764 на повышенную двигательную активность у мышей, вызванную введением блокатора дофаминового транспортера GBR 12909
3. Оценить действие LK00764 на стресс-индуцированную гипертермию у крыс
4. Провести батарею поведенческих тестов после острого и субхронического введения вещества LK0074
5. Выполнить поведенческий скрининг мышей, нокаутных по гену TAAR2, и мышей, мутантных по гену TAAR6
6. Оценить влияние введения GBR 12909 на двигательную активность мышей, нокаутных по гену TAAR2

7. Изучить гипотермическое действие 5HT1A-агониста 8-ОН-DPAT на мышах, мутантных по гену TAAR6
8. Хроматографически проанализировать содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга у мышей, нокаутных по гену TAAR2, и мышей, мутантных по гену TAAR6.

### **Научная новизна исследования**

Впервые исследована *in vivo* активность целой группы новых TAAR1-агонистов, при этом выявлено несколько активных соединений, кодовые названия которых AP163 и LK00764. У обоих соединений обнаружены потенциальные антипсихотические и антиманиакальные свойства, у препарата LK0074 обнаружены также потенциальные анксиолитические свойства. Впервые охарактеризованы животные, нокаутные по гену TAAR2, и животные с мутацией в гене TAAR6. Обнаружено влияние нокаутирования по гену TAAR2 на двигательную активность мышей. Впервые установлено, что мутация в гене TAAR6 может оказывать влияние на некоторые параметры тревожного поведения мышей, также у TAAR6-мутантных животных выявлено повышение гипотермического ответа на введение 5HT1A-агониста 8-ОН-DPAT.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. LK00764 и AP163 как и их фармакофоры могут быть полезны для разработки новых TAAR1-агонистов для лекарственной коррекции заболеваний мозга
2. TAAR6 может стать потенциальной мишенью для нейротропных препаратов, модулирующих серотонинергическую систему
3. TAAR2 может использоваться как мишень для разработки препаратов, модулирующих дофаминергическую систему

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в работе, описанной в диссертации, а именно в разработке протоколов, проведении и статистическом анализе экспериментов, публикации, презентации и обсуждении полученных результатов. Автор также принимал участие в заборе образцов мозга и других тканей, выполнял генотипирование нескольких линий нокаутных животных, извлекал информацию из баз данных по экспрессии РНК, самостоятельно готовил растворы и выполнял инъекции/гаважирование, термометрию, осуществлял постановку методик и настройку оборудования, а также участвовал в организационной части работы, описанной в диссертации.

### **Публикации и апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 10 работ: 9 научных статей в журналах, индексирующихся в WoS и/или Scopus и РИНЦ, 1 обзор в журнале, входящем в перечень ВАК. Основные положения и научные итоги диссертации были изложены в докладах на 5 научных конференциях, в том числе 4 международных: 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference –“Stress and Behavior” 16-19 мая 2019; 32nd ECNP Congress, 7–10 сентября 2019, Копенгаген, Дания; 33rd ECNP Congress Hybrid, Virtual, 12–15 сентября 2020; 34th ECNP Congress Hybrid, 2–5 Октября 2021, Лиссабон, Португалия; Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2022, Ленинградская область, Россия, 25–26 июля 2022.

## 2. Обзор литературы

### Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами

Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами (TAAR) открыты в 2001 году двумя независимыми группами исследователей [1,2]. TAAR относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). GPCR являются трансмембранными рецепторами, функцией которых является передача сигнала через липидный слой [10]. У человека присутствует 6 функциональных рецепторов – TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9, у мышей их 15, у крыс – 17 [8]. К следовым аминам обычно относят такие вещества как бета-фенилэтиламин, октопамин, тирамин и триптамин, термин «следовые» употребляется в связи с низкими концентрациями этих веществ в тканях у млекопитающих [11,12]. Эндогенными лигандами TAAR1 являются тирамин и бета-фенилэтиламин, к остальным же рецепторам эндогенные лиганды на текущий момент неизвестны. У всех TAAR, кроме TAAR1, обнаружена экспрессия в обонятельном эпителии, поэтому ранее считалось, что основная их функция – обонятельная [8]. Далее последует краткое описание имеющихся на текущий момент знаний о каждом рецепторе семейства.

#### TAAR1

TAAR1 является наиболее изученным из рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами [13]. Экспрессия TAAR1 показана в различных областях мозга, таких как вентральная область покрышки (VTA), ядра шва (DRN), черная субстанция, прилежащее ядро перегородки, префронтальная кора и гипоталамус. Описано наличие рецептора и за пределами ЦНС: в клетках иммунной системы, желудочно-кишечном тракте, поджелудочной железе, жировой ткани и яичках [12].

Идентифицировано множество лигандов, обладающих агонизмом к TAAR1, среди них такие вещества как бета-фенилэтиламин, амфетамин, метамфетамин, клонидин, гуанфацин, m-CPP и апоморфин. К тому же синтезирован ряд соединений, относительно селективных в отношении рецептора: RO5263397, RO5166017, RO5203648 и другие экспериментальные препараты. Идентифицирован только один антагонист – EPPTB, использующийся в экспериментах на клеточных культурах и срезах тканей [14].

Имеется большое количество данных о взаимодействиях TAAR1 и дофаминергической системы. Описана возможная коэкспрессия D2 и TAAR1. Примечательно, что введение TAAR1-агонистов способно снижать каталепсию, вызванную D2-блокатором галоперидолом, а у

TAAR1-нокаутных мышей и гетерозигот снижена выраженность вызванной галоперидолом каталепсии [15,16]. При этом у нокаутных животных повышено количество D2-дофаминовых рецепторов в стриатуме и снижен PPI [17]. У TAAR1-нокаутных мышей отмечается повышение локомоции на введение d-амфетамина по сравнению с животными дикого типа; у них также повышен выброс дофамина и норадреналина в дорсальном стриатуме на введение d-амфетамина [17]. Показано, что TAAR1-агонисты способны снижать гиперлокомоцию, вызванную кокаином как на мышах, так и на крысах [18]. На модели двойных нокаутов по гену дофаминового транспортера и TAAR1 доказано, что снижение гиперлокомоции у DAT-нокаутов при помощи RO5166017 является TAAR1-зависимым [3]. Описано также, что TAAR1 может участвовать в эффектах дофаминергических агонистов, таких как апоморфин. Апоморфин является частичным агонистом TAAR1-рецепторов с активностью оценивающейся примерно в 75% от активности бета-фенилэтиламина. Так, у TAAR1-нокаутов снижено время вертикализации в тесте апоморфинового клаймбинга по сравнению с животными дикого типа и отмечено снижение в стереотипном поведении (лизании), при этом различий в горизонтальной активности в тесте на локомоторную активность выявлено не было, как и в жевании и обнюхивании [19]. При электрофизиологических исследованиях также обнаружены изменения в функционировании дофаминергических нейронов у животных, нокаутных по TAAR1. Частота спонтанных разрядов дофаминергических нейронов вентрально-теgmentальной области повышена у TAAR1-нокаутов по сравнению с животными дикого типа, причём в ответ на TAAR1-агонист пара-тирамин частоту спонтанных разрядов возможно снизить у животных дикого типа, эта же реакция на пара-тирамин у нокаутных животных отсутствует [20].

TAAR1 вовлечён также и во взаимодействие с серотонинергической системой. В серотонинергических нейронах TAAR1-агонист RO5203648 увеличивает частоту спонтанных разрядов серотонинергических нейронов в дорсальном ядрах шва, причём после отмывки от препарата скорость импульсации возвращалась к контрольным уровням [18]. Известно, что TAAR1-агонисты могут снижать стресс-индуцированную гипертермию, что, вероятно, обусловлено экспрессией TAAR1 в серотонинергических и терморегуляторных областях, таких как дорсальные ядра шва и гипоталамус [3]. Примечательно, что в отличие от животных дикого типа MDMA в дозах 10-20 мг/кг не способен вызывать гипотермию у животных, нокаутных по TAAR1, но наоборот вызывает повышение температуры; также у TAAR1-нокаутов повышен релизинговый эффект MDMA на уровень серотонина по результатам микродиализа [21].

Интересно, что TAAR1 могут модулировать также и глутаматную нейротрансмиссию. Есть данные, свидетельствующие о том, что у TAAR1-нокаутных животных отмечается

снижение экспрессии субъединицы GluN1 и GluN2B а также снижение фосфорилирования GluN1 на серине 896 в префронтальной коре. У нокаутов также увеличен мембранный потенциал покоя в кортикальных нейронах V слоя, амплитуда и кинетика вызванных потенциалов, а также соотношение NMDA/AMPA токов [4]. Также известно, что селективный TAAR1-агонист RO5203648 способен дозозависимо снижать двигательную гиперактивность, вызванную введением NMDA-антагониста L-687,414, а также способен снижать спонтанную гиперактивность у животных с пониженной экспрессией NR1 субъединицы NMDA рецептора [18].

## **TAAR2**

Экспрессия TAAR2 выявлена в обонятельном эпителии, желудочно-кишечном тракте, сердце, легких, лейкоцитах и яичках [12,22,23]. Лиганды к TAAR2 до сих пор не обнаружены, однако, рецептор способен активироваться высокими концентрациями некоторых первичных аминов. В недавнем исследовании нашей группой была косвенно показана экспрессия в грушевидной коре, латеральном гипоталамусе, CA1 поле гиппокампа, латеральной хабенуле, пятом слое соматосенсорной коры и ядрах шва. Помимо этого, обнаружено повышение уровней дофамина в чёрной субстанции и стриатуме нокаутов по гену TAAR2, а также выявлено увеличение количества TH-позитивных нейронов в чёрной субстанции [24].

## **TAAR5**

При первоначальной идентификации рецептора TAAR5 ему присвоили название PNR - Putative Human Neurotransmitter Receptor, и исследователями была описана экспрессия в человеческом мозге: миндалине, таламусе, гипоталамусе, гиппокампе и хвостом ядре [25]. Позже были опубликованы данные о невысокой экспрессии в черной субстанции [26]. Сигналы гибридизации *in situ*, специфичные для РНК TAAR5, обнаружены в дугообразном ядре мыши, вентромедиальном гипоталамусе и миндалевидном теле [27]. Так же, экспрессия TAAR5 описана в обонятельном эпителии и обонятельных луковицах [7,28]. Косвенно при помощи иммуногистохимического окрашивания возможная экспрессия в пределах головного мозга мышей оценена на животных с геном LacZ, вставленным вместо гена TAAR5: окрашивание было выявлено в прилежащем ядре перегородки, орбитофронтальной коре, вентромедиальном ядре гипоталамуса миндалине, области CA1 гиппокампа, переднем обонятельном ядре, грушевидной коре, таламической области, энторинальной коре, миндалине и мозжечке [6,29].

На данный момент известны несколько веществ, способных воздействовать на рецептор TAAR5. Агонистической активностью обладает триметиламин: по всей видимости восприятие

запаха триметиламина, пахнувшего тухлой рыбой, отчасти обусловлено TAAR5, экспрессирующимся в обонятельном эпителии. Описан также агонист альфа-NETA, являющимся также ингибитором холин-ацетилтрансферазы и антагонистом хемокиноподобного рецептора 1 (CMKLR1) [30,31]. При исследовании *in vivo* альфа-NETA обладает нейротропными свойствами, что может быть частично обусловлено активацией TAAR5 [32–35].

Слабыми агонистическими свойствами обладают N-N-диметилэтиламин и N-метилпиперидин [7]. Недавно при помощи скрининга соединений, полученных моделированием *in silico*, были идентифицированы два потенциальных антагониста TAAR5 [36].

Недавнее исследование нокаутных по гену TAAR5 мышей выявило снижение у них нескольких показателей тревожного поведения в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Светло-тёмная камера». Также у нокаутов оказался понижен уровень серотонина в стриатуме и гиппокампе, а в гипоталамусе снижено количество 5-гидроксииндолуксусная кислоты. Помимо этого, у TAAR5-нокаутов отмечался повышенный гипотермический ответ на инъекцию 5HT1A-агониста 8-OH-DPAT [6].

#### **TAAR6.**

На момент начала выполнения данной работы имелись скудные представления о возможной функциональной роли рецептора TAAR6. Известно, что данный рецептор экспрессируется в обонятельном эпителии, также экспрессия обнаружена в амигдале и гиппокампе [2,37]. Помимо этого, имеются данные о низкой экспрессии мРНК TAAR6 у человека в гиппокампе, префронтальной коре, черной субстанции, амигдале и базальных ганглиях [38]. Нашей группой проведено дополнительное исследование экспрессии TAAR6 в ЦНС, основанное на анализе публичных открытых транскриптомных баз данных. Установлено, что данный рецептор также экспрессируется в префронтальной коре и прилежащем ядре перегородки [39].

В литературе неоднократно описывались возможные связи однонуклеотидных полиморфизмов в гене SNP TAAR6 с риском возникновения психических расстройств таких как биполярное аффективное расстройство и шизофрения [38,40–46], однако данные противоречивы, так как часть более поздних исследований опровергает наличие такой ассоциации [47–51].

### **TAAR8, TAAR9**

На текущий момент практически отсутствует информация о функциях рецептора TAAR8. Экспрессия TAAR8 обнаружена в мышечных почках и амигдале, а также в сердце крыс [2,52]. Стоит отметить, что у мышей в отличие от человека имеются три ортолога гена TAAR8 – TAAR8a, TAAR8b, TAAR8c. Идентифицированы несколько лигандов к TAAR8, N-метилпиперидин и N,N-диметилциклогексилламин [7,53,54].

Экспрессия рецептора TAAR9 обнаружена в обонятельном эпителии гипофизе, спинном мозге, двенадцатиперстной кишке и желудке, селезёнке, лимфоцитах и скелетных мышцах [22,55–61]. Активация TAAR9 возможна N-метилпиперидином и N,N-диметилциклогексилламином, а также компонентами мочи плотоядных и растительноядных животных [7,53,62]. Нашей группой недавно обнаружено снижение уровней холестерина и липопротеинов низкой плотности у крыс, нокаутных по гену TAAR9 [57]. Ведётся дальнейшая работа по идентификации функций рецептора как в ЦНС, так и за её пределами.

### **Эктопическая локализация обонятельных рецепторов**

Интересным является вопрос о возможной локализации обонятельных рецепторов за пределами обонятельного эпителия и выполнении ими функций, отличных от обонятельных в классическом понимании. Обонятельные рецепторы являются самым большим семейством генов в геноме человека [63]. Первоначально предполагалось, что обонятельные рецепторы являются узкоспециализированными, экспрессируются только в пределах обонятельного эпителия и выполняют свои функции исключительно в концепции ольфакторной хеморецепции. Однако за последнее десятилетие были неоднократно найдены исключения из этого правила, чему активно способствовало появление высокопроизводительных омиксных технологий, таких как тканевые микрочипы или секвенирование РНК [64].

На данный момент эктопическая экстраольфакторная локализация была продемонстрирована для многих видов обонятельных рецепторов. Одним из примеров может быть OR2A4/7, экспрессирующийся в первичных человеческих меланоцитах и участках кожи человека, чья экспрессия была продемонстрирована как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Высказываются предположения о вовлечённости данного обонятельного рецептора в регуляцию дифференцировки меланоцитов, синтезе меланина и росте меланоцитов [65]. Ещё один пример, Olf78, обонятельный рецептор, экспрессируемый в почечном юкстагломерулярном аппарате, где он опосредует секрецию ренина; он также экспрессируется в гладкомышечных клетках мелких резистивных сосудов и по имеющимся данным реагирует на

короткоцепочечные жирные кислоты, которые в том числе могут продуцироваться микрофлорой кишечника [66]. Теме возможного участия обонятельных рецепторов в обмене веществ, развитии диабета и ожирения, работе кишечника и взаимодействии с кишечной микрофлорой посвящается всё больше исследовательских работ [67], в частности по причине обнаружения их экспрессии в печени [68,69]. Также есть данные об экспрессии обонятельных рецепторов в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, макрофагах, обсуждается возможное участие ольфакторных рецепторов в процессах воспаления и различных иммунных реакциях [70]. Особое внимание стоит уделить наличию обонятельных рецепторов в сперматозоидах - одним из ярких примеров этому может быть OR17-4, который реагирует на бурженаль (являющийся хемоаттрактантом для сперматозоидов) и модулирует подвижность мужских половых клеток в зависимости от концентрации этого вещества, тем самым регулируя хемотаксис по направлению к яйцеклетке [71]. Похожие функции обнаружены также у OR7A5 и OR4D1 [72]. Помимо функций во взрослом организме возможно наличие роли обонятельных рецепторов за пределами органа обоняния на стадии эмбрионального развития [73].

Постепенно накапливается всё больше данных о функциях эктопических обонятельных рецепторов и высказываются предположения о возможной фармакологической модуляции работы тканей и органов посредством воздействия на данную группу рецепторов, то есть вполне возможно использование их в будущем как мишеней для лекарственных препаратов с абсолютно новыми механизмами действия [74,75]. Интересным примером может являться активация синтетическим терпеноидным ароматизатором под названием сандалор рецептора OR2AT4, найденного в кератиноцитах, что вызывает пролиферацию и миграцию клеток, тем самым способствуя заживлению ран [76]. Этот рецептор также экспрессируется в волосяных фолликулах человека, и его активация значительно увеличивает активную фазу роста волосяного фолликула, вызывая выработку инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), что может способствовать стимуляции роста волос [77].

Экспрессия обонятельных рецепторов может изменяться при некоторых патологиях, что может способствовать их использованию в качестве биомаркера во время скрининга и для постановки точного диагноза. Так OR51E2 является потенциальным маркером рака простаты, а OR2B6, OR2C3 и OR10H1 могут служить биомаркерами для рака молочной железы, меланомы и рака мочевыводящих путей [75]. Недавно нашей группой было показано, что экспрессия рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, обнаруживается в образцах невусов, а в образцах меланомы их экспрессия снижается, а также меняется её паттерн [78]. Помимо этого,

экспрессия TAAR1 коррелирует с уровнем дифференцировки рака молочной железы и может являться предиктором выживаемости пациентов [79].

По мере накопления новых данных возможно также и переименование рецепторов в зависимости от их локализации и обнаруженных новых функций [64].

Можно сделать вывод, что экстраольфактоная локализация и функция рецепторов, первично определённых исследователями обонятельными, является широко распространённой. С другой стороны, нет ничего экстраординарного, что одни и те же "строительные блоки" в ходе эволюции используются в совершенно разных органах и тканях одного организма. На протяжении последних лет появляются всё новые данные о локализации рецепторов следовых аминов вне обонятельного эпителия, одной из актуальных задач является изучение их функций в этих тканях и органах.

### **Исследование TAAR1-агонистов как потенциальных лекарственных средств**

Поскольку экспрессия TAAR1 обнаружена в дофаминергических нейронах, многие исследования были сфокусированы на изучении возможной модуляции функции дофаминергических нейронов при помощи TAAR1 и возможном применении TAAR1-агонистов в лечении состояний, патофизиология которых затрагивает дофаминергический сигналинг. Такими расстройствами, например, являются шизофрения и химические аддикции.

Шизофрения - хроническое инвалидизирующее расстройство, которому в среднем подвержен примерно 1% населения планеты. Согласно данным из США средняя потеря жизни для пациентов с шизофренией составляет около 28,5 лет [80], а расходы, связанные с потерей трудоспособности и медицинским обслуживанием обошлись государству в 2020 году в 281,6 миллиарда [81]. Симптомы шизофрении условно принято делить на позитивные, к которым относятся бред, галлюцинации, дезорганизация мышления, и негативные симптомы, к которым относят бедность эмоциональных реакций и речи, апатию и абулию [82–84]. Основным медикаментозным лечением шизофрении являются антипсихотические препараты. Большинство антипсихотических препаратов так или иначе воздействуют на D2-подобные дофаминовые рецепторы, являясь либо антагонистами (галоперидол, рисперидон, оданзапин и т.п.), либо частичными агонистами (арипипразол, брекспипразол, карипразин и люматеперон). Рецепторный профиль препаратов может значительно отличаться, но чаще всего ещё одной мишенью являются 5HT<sub>2A</sub> серотониновые рецепторы: препараты такого действия принято относить ко второму поколению антипсихотиков (атипичным антипсихотикам). Один из

антипсихотических препаратов, не воздействующий на рецепторы к дофамину, а являющийся инверсным агонистом 5HT<sub>2A</sub> рецепторов, пимавансерин, способен снижать психотические проявления у пациентов с деменцией при болезни Паркинсона [85], также в настоящее время в клинических исследованиях изучают его потенциал в уменьшении негативной симптоматики у пациентов с шизофренией в качестве дополнительной терапии [86]. На финальной стадии клинических исследований находится ещё один антипсихотический препарат, не воздействующий на такие мишени как D<sub>2</sub> и 5HT<sub>2A</sub> рецепторы, для лечения шизофрении от Karuna Therapeutics Inc. - KarXT [87]. KarXT, являющийся комбинацией M<sub>1</sub>-, M<sub>4</sub>-агониста ксаномелина и периферического неселективного холинолитика троспия, показал способность снижать позитивные и негативные симптомы шизофрении, и, возможно, когнитивные симптомы [88]. Ксаномелин, центрально активный компонент препарата, способен также облегчать когнитивные и поведенческие симптомы у пациентов с болезнью Альцгеймера [89]. Для подавляющего большинства антипсихотических препаратов характерны побочные эффекты, такие как гиперпролактинемия, набор веса, гиперлипидемия и сахарный диабет второго типа, изменение сердечной проводимости, а также экстрапирамидные побочные эффекты, такие как лекарственно-индуцированный паркинсонизм, акатизия и поздняя дискинезия [90]. Антипсихотические препараты второго поколения зачастую имеют менее выраженный профиль экстрапирамидных побочных эффектов, но по эффективности не всегда сильно превосходят свои более ранние аналоги [91]. Стоит отметить, что деление на поколения является достаточно условным, а разница в фармакологических профилях отдельных препаратов может сильно варьировать. К сожалению, далеко не всем пациентам помогает существующая фармакотерапия и актуальной проблемой в современной психиатрии является существенная доля больных с симптомами, устойчивыми к терапевтическим эффектам антипсихотических препаратов [92]. В связи со своей повышенной эффективностью в редукции психотических симптомов отдельно можно выделить клозапин, однако его применение ограничено необходимостью регулярного мониторинга показателей крови в связи с риском развития агранулоцитоза [93]. Ещё одной из проблем лекарственной терапии шизофрении является недостаточно удовлетворительное воздействие на негативные и когнитивные симптомы [94,95]. Более того, лекарственные препараты могут сами по себе вызывать негативные симптомы, что безусловно ухудшает результаты терапии [96]. Таким образом, направлением дальнейшей разработки антипсихотических препаратов является снижение побочных эффектов терапии, повышение их эффективности в преодолении терапевтической резистентности, а также повышение воздействия на негативные и когнитивные симптомы

шизофрении. Возможным решением этих задач является изучение и внедрение в клинику препаратов, воздействующих на новые мишени и имеющих отличные от своих предшественников механизмы действия.

Одним из возможных новых фармакологических препаратов, воздействующих на симптомы шизофрении, является 5HT1A-, TAAR1-агонист улотаронт [5,97]. Улотаронт (SEP-363856, SEP-856) был идентифицирован как потенциальный антипсихотический препарат в результате совместных усилий Sunovion Pharmaceuticals и PsychoGenics Inc. при помощи in-vivo скрининга на высокопроизводительной платформе SmartCube®, обрабатывающей поведенческие тесты с использованием искусственного интеллекта для фенотипического поиска лекарственных препаратов [98]. Дальнейшие исследования подтвердили данную гипотезу: препарат получил от FDA статус прорывной терапии, в настоящий момент проходят исследования третьей фазы клинических исследований [99]. До клинических исследований фазы 2 дошёл ещё один TAAR1-агонист под названием ралмитаронт от Hoffmann-La Roche, действие которого изучалось при шизофрении и шизоаффективном расстройстве (NCT04512066, NCT03669640). На момент написания работы данные исследований не опубликованы.

Фармакологическая характеристика улотаронта была произведена посредством исследований на клеточных культурах и животных моделях. На клеточных культурах при скрининговом анализе связывания радиолигандов улотаронт (при 10 мкМ) показал > 50% ингибирование специфического связывания 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2, 5-102 HT7,  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B и D2R рецепторов. Значения  $K_i$  варьировались от 0,031 до 21 мкМ. В последующих функциональных анализах он был идентифицирован как агонист человеческого рецептора TAAR1 с  $EC_{50}$   $104,14 \pm 0,062$  мкМ и  $E_{max} = 101,3 \pm 1,3\%$  (mean  $\pm$  S.E.M.) и рецептора 5-HT1A с  $EC_{50}$   $2,3 \pm 1,40$  мкМ и  $E_{max} = 74,7 \pm 19,60\%$ . Слабое воздействие на все другие мишени (5-HT1B, 106 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2, 5-HT7,  $\alpha$ 2A,  $\alpha$ 2B и D2 рецепторы) наблюдалось только при высоких микромолярных концентрациях. В функциональных анализах рецепторов D2R улотаронт проявлял слабую частичную агонистическую активность со значениями  $EC_{50}$   $10,44 \pm 4$  мкМ (сАМР,  $E_{max} = 23,9\% \pm 109,7,6\%$ ) и 8 мкМ (по  $\beta$ -аррестину,  $E_{max} = 27,1\%$ ). При 100 мкМ наблюдалось  $34\% \pm 1,16\%$  ингибирование в анализе сАМР, и не наблюдалось антагонизма при концентрациях до 100 мкМ в анализе по  $\beta$ -аррестину. Низкопотенциальные частичные агонистические активности были также обнаружены на 5-HT1B ( $EC_{50} = 15,6 \pm 11,6$  мкМ,  $E_{max} = 22,4\% \pm 10,9\%$ ), 5-HT1D ( $EC_{50} = 0,262 \pm 113,0,09$  мкМ,  $E_{max} = 57,1\% \pm 6,0\%$ ) и 5-HT7 рецепторах ( $EC_{50} = 6,7 \pm 1,32$  мкМ,

$E_{max} = 41,0\% \pm 9,5\%$ ). В функциональном анализе активности 5-HT<sub>2B</sub> улотаронт не проявлял агонизма до концентраций 100 мкМ. На рецепторе 5-HT<sub>2A</sub> активность была практически не обнаружена 29,3% агонизма наблюдалось только в самой высокой исследованной концентрации 10 мкМ. Улотаронт не проявил активности ни в одном из исследованных ферментов до концентрации 100 мкМ [100]. Интересно, что более позднее исследование с использованием альтернативного клеточного метода определения активности TAAR1 *in vitro* показало более мощное ( $EC_{50} 38 \pm 11$  нМ;  $E_{max} = 109\% \pm 3\%$ ) агонистическое действие улотаронта, что свидетельствует о более высоком уровне селективности в отношении 5-HT<sub>1A</sub>-активности [101]. Аналогичное различие в активности на TAAR1 по сравнению с 5-HT<sub>1A</sub> было показано в независимом исследовании [102]. Было показано, что улотаронт является мощным полным агонистом TAAR1, действуя специфически через G $\alpha_s$  ( $pEC_{50}$ :  $6,08 \pm 0,22$ ;  $E_{max}$ :  $96,41\% \pm 15,26$ ).

Улотаронт проявил несколько меньшую активность в отношении TAAR1, чем бета-фенилэтиламин ( $pEC_{50}$ :  $6,49 \pm 0,23$ ), но большую, чем пара-тирамин ( $pEC_{50}$ :  $5,65 \pm 0,06$ ). В то же время улотаронт продемонстрировал на несколько порядков меньшую по частичную агонистическую активность в отношении 5-HT<sub>1A</sub> рецептора. Подобно эндогенному агонисту, в чрезвычайно высоких микромолярных концентрациях улотаронт мог вызывать 5-HT<sub>1A</sub>-зависимое привлечение G $\alpha_q$ , G $\alpha_i$  и в меньшей степени G $\alpha_s$  ( $E_{max}$ : 36-47%) [102]. Также было показано, что улотаронт может влиять на 5-HT<sub>1A</sub>-опосредованную активность GIRK. Способность агонистов TAAR1 активировать GIRK через TAAR1 была продемонстрирована ранее [3,14]. Улотаронт вызывал G $\beta\gamma$ -опосредованную активацию GIRK ( $E_{max}$ :  $55,03\% \pm 14,09$ ), что указывает на то, что соединение в высоких микромолярных концентрациях может вызывать калиевые токи канала GIRK через рецептор 5-HT<sub>1A</sub>, предположительно за счет сопряжения G $\alpha_i$ /o [102]. Однако, имеют ли эти высокие концентрации (> 100 мкМ) улотаронта, необходимые для активности на 5HT<sub>1A</sub>, какое-либо физиологическое значение, остается неясным. Кроме того, была оценена активность улотаронта в отношении D2-рецептора. В соответствии с предыдущими результатами [100], улотаронт продемонстрировал лишь низкую потентность и эффективность в D2R в отношении вовлечения G $\alpha_i$  и активации GIRK только при очень высоких (до 1 мМ) концентрациях.

Фармакокинетика улотаронта изучалась как на животных, так и на людях. Фармакокинетика при внутривенном и пероральном введении улотаронта доклинически оценивалась у самцов мышей ICR (10 мг/кг, перорально), крыс Sprague-Dawley (5 и 284 10 мг/кг, перорально и внутривенно) и макак-резус (10 мг/кг, перорально и внутривенно) [100]. У

мышей  $C_{\max}$  для 10 мг/кг, перорально, составила  $2854 \pm 298$  нг/мл и  $7972 \pm 2908$  нг/г в плазме 286 и мозге, соответственно;  $T_{\max}$  составила 30 мин для плазмы и 15 мин для ткани мозга;  $T_{1/2}$  составила 287 0,847 ч и 0,808 ч в плазме и мозге, соответственно.

У крыс после введения 10 мг/кг п/о  $C_{\max}$  составила  $1750 \pm 369$  нг/мл и  $3762 \pm 1324$  нг/г в плазме и мозге, соответственно;  $T_{\max}$  в плазме и ткани мозга составила 15 мин;  $T_{1/2}$  составил 2,1 ч и 2,33 ч в плазме и мозге, соответственно. У крыс после введения 5 мг/кг внутривенно и 5 мг/кг перорально  $C_{\max}$  в плазме составила  $2578 \pm 110$  нг/мл и  $1056 \pm 173$  нг/г;  $T_{\max}$  - 0,083 и 0,42  $\pm$  0,14 ч;  $T_{1/2}$  в плазме - 1,17  $\pm$  0,16 ч и 1,24  $\pm$  0,1 ч, соответственно.

У обезьян после введения 5 мг/кг перорально  $C_{\max}$  в плазме составила  $431 \pm 104$  нг/мл,  $T_{\max}$  - 6,00  $\pm$  2,83 ч,  $T_{1/2}$  - 3,03 ч. У обезьян после введения 5 мг/кг внутривенно  $C_{\max}$  в плазме составила  $2191 \pm 194$  нг/мл,  $T_{\max}$  - 0,083;  $T_{1/2}$  - 3,14  $\pm$  1,26 ч. Среднее время пребывания - 5,90 ч [100].

Таким образом, у экспериментальных животных улотаронт быстро всасывается, обладает хорошей биодоступностью (~100% у крыс, 92% у собак и 71% у обезьян) и имеет тенденцию концентрироваться в тканях мозга (концентрация в мозге и AUC в мозге были примерно в 3 раза выше, чем в плазме). В последующих исследованиях *in vitro* ADME и доклинической фармакокинетики также была продемонстрирована высокая растворимость и проницаемость через гемато-энцефалический барьер [103]. В этом исследовании улотаронт продемонстрировал низкое связывание с белками плазмы крови животных и человека с долей несвязанного вещества более 78% (как у животных, так и у человека). Улотаронт демонстрировал низкий или умеренный печеночный клиренс в гепатоцитах мыши, крысы, обезьяны и человека. Формирование печеночного клиренса улотаронта в основном определяется CYP2D6 и, по-видимому, включает как NADPH-зависимые, так и NADPH-независимые пути, участвующие в его метаболизме. Основным метаболитом, выявленным в плазме крови мышей, крыс, кроликов, собак, обезьян, и людей после однократного или повторного приема улотаронта, является SEP-383103 [103].

Популяционная фармакокинетика улотаронта у взрослых людей проанализирована с использованием объединенных данных семи исследований фазы I, одного острого исследования фазы II и одного 6-месячного пролонгированного исследования. Фармакокинетические параметры оценивались у мужчин и женщин в возрасте от 18 до 55 лет. Данные получены от здоровых добровольцев ( $n = 99$ ) и пациентов с шизофренией ( $n = 305$ ). 53,7% испытуемых были белыми, 31,4% - чернокожими, 10,9% - азиатами и 3,9% -

другой/смешанной расы. Более 80% азиатских испытуемых в анализе были японцами [97]. Использовались разовые и многократные пероральные дозы (5-150 мг/день). Согласно фармакокинетическому анализу, улотаронт хорошо всасывается при пероральном приеме. Улотаронт продемонстрировал пропорциональность дозы в дозах от 25 до 100 мг по средней максимальной концентрации, площади под кривой "концентрация-время" и минимальной концентрации. Предполагаемый медианный  $T_{max}$  составил 2,8 часа, а средний эффективный период полувыведения - 7 часов, что привело к коэффициенту накопления 1,1 при ежедневном приеме. Фармакокинетические параметры не претерпели значительных изменений после 12 недель ежедневного приема. Фармакокинетические параметры улотаронта не зависели от пола, расы, возраста, состава препарата или наличия шизофрении. Только масса тела пациентов влияла на фармакокинетику улотаронта. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что улотаронт имеет фармакокинетический профиль, который соответствует однократному приему препарата в течение дня [104]. Было проведено сравнение биоэквивалентности таблетированной и капсулированной форм улотаронта, которое не выявило существенных различий. Кроме того, не было обнаружено никакого влияния пищи на фармакокинетику таблетированной формы у людей [105].

Для оценки механизмов, ответственных за действие улотаронта на нейронном уровне, были проведены патч-кламп записи в изолированных срезах мозга мыши из дорсального ядра шва (DRN), где расположены тела клеток серотониновых нейронов, и вентрально-теgmentальной области (VTA), содержащей тела клеток мезолимбических дофаминергических нейронов. Улотаронт вызывал тормозные ответы в нейронах дорсальных ядер шва, и этот эффект ослаблялся антагонистом 5-HT<sub>1A</sub> WAY-100635, но не антагонистом TAAR1 EPPTB. Активность нейронов вентрально-теgmentальной области также снижалась улотаронтом: тормозные эффекты в VTA ослаблялись антагонистом TAAR1 EPPTB, но не антагонистом 5-HT<sub>1A</sub> WAY-100635. Похоже, что ингибиторные эффекты улотаронта на активность нейронов дорсальных ядер шва были опосредованы через активацию серотониновых 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов, но в нейронах VTA они, по крайней мере, частично зависели от активации TAAR1 [100]. Анализ внеклеточной активности нейронов дорсальных ядер шва наркотизированных крыс подтвердил результаты, полученные в ходе патч-кламп записей в изолированных срезах мозга мыши. В дозе 5 мг/кг (внутривенно) улотаронт полностью подавлял возбуждение нейронов, и это торможение полностью нивелировалось антагонистом серотонина 5-HT<sub>1A</sub> WAY-100635, что указывает на то, что тормозящее действие улотаронта на нейроны дорсальных ядер шва опосредуется исключительно через рецепторы серотонина 5-HT<sub>1A</sub> [100]. Для прямой оценки

действия улотаронта на серотониновые 5-HT<sub>1A</sub> рецепторы в тканях мозга *in vitro* была проведена радиография в срезах мозга крыс. Количественно оценивали связывание радиолиганда серотонинового 5-HT<sub>1A</sub> агониста 8-ОН-DРАТ в отсутствие и в присутствии улотаронта. Улотаронт вытеснял 8-ОН-DРАТ в зависимости от концентрации, и наибольшее связывание рецептора наблюдалось в перегородке и по всей коре [100].

Для оценки связывания улотаронта с D2-рецепторами проведены эксперименты по автордиографии *in vivo* с радиолигандом D2-рецепторов раклопридом на крысах Sprague-Dawley. Улотаронт не вызывал значительного связывания D2-рецепторов в мозге при концентрациях в плазме, в 200 раз превышающих поведенчески эффективные, что свидетельствует об отсутствии значительного взаимодействия препарата с D2-рецепторами [100]. Кроме того, для определения связывания с D2-рецепторами у приматов была проведена позитронно-эмиссионная томографическая визуализация радиолиганда фаллиприда у анестезированных бабуинов. Улотаронт даже в очень высоких концентрациях показал слабые уровни связывания с D2-рецепторами (менее 10%) в различных областях мозга. Отсутствие прямого взаимодействия с дофаминовыми D2-рецепторами, по-видимому, распространяется также на приматов [100].

В совокупности эти данные указывают на то, что улотаронт может действовать преимущественно через активацию TAAR1 и серотониновых 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов без значительного влияния на дофаминовые D2-рецепторы и серотониновые 5-HT<sub>2A</sub> рецепторы, в отличие от большинства антипсихотиков.

Одними из наиболее признанных патогенетических гипотез шизофрении являются повышенная дофаминергическая и пониженная глутаматергическая нейротрансмиссия [106,107]. Препараты, действующие через увеличение дофаминовой или уменьшение глутаматной сигнализации, обычно применяются для моделирования эндофенотипов шизофрении у грызунов и для тестирования потенциальных лекарственных препаратов на этих моделях. Позитивные симптомы обычно моделируются в тестах, включающих локомоторную гиперактивность мышей и крыс после дофаминергического стимулятора амфетамина или антагониста глутаматных NMDA рецепторов фенциклидина (PCP) [108].

Введение улотаронта эффективно снижало гиперактивность у животных, находящихся под действием PCP. Введение всех протестированных доз (0,3, 1 и 3 мг/кг, перорально) сопровождалось дозозависимым снижением повышенной двигательной активности мышей [100]. Ослабление PCP-индуцированной гиперлокомоции также наблюдалось у крыс после

введения минимальной эффективной дозе 1 мг/кг (перорально). Антагонист серотониновых 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов WAY-100635 частично снижал способность улотаронта ослаблять РСР-индуцированную гиперактивность у мышей [100]. Потенциальная роль 5-HT<sub>1A</sub> механизма (как и других TAAR1-независимых механизмов) улотаронта в его действии на РСР-индуцированную гиперактивность была недавно подтверждена на мышах, нокаутных по TAAR1: предварительное введение препарата (10 мг/кг, перорально) уменьшало МК-801-индуцированную гиперактивность независимо от TAAR1 [102].

Интересно, что улотаронт не смог уменьшить локомоторную гиперактивность, вызванную дофаминергическими препаратами, что указывает на сложный механизм действия препарата на дофаминовую нейротрансмиссию и подчеркивает, что в этом, по всей видимости, участвуют не только D<sub>2</sub>-рецепторные механизмы. Так, предварительное введение препарата (диапазон доз: 1-10 мг/кг, перорально) не снижало гиперлокомоцию, вызванную d-амфетамином [102,109]. Аналогичные данные были получены при оценке эффекта улотаронта в апоморфин-индуцированном тесте карабкания у мышей (апоморфин - агонист дофаминовых D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>-рецепторов) [110]. В то же время введение улотаронта потенцировало эффекты антипсихотического препарата оланзапина в этом тесте, а также в МК-801-индуцированном тесте гиперактивности у мышей (МК-801 является NMDA-антагонистом) [110].

Улотаронт также показал результаты на доклинических моделях негативных симптомов шизофрении. Одной из часто используемых моделей негативных симптомов является снижение социального взаимодействия у грызунов, вызванное хроническим введением фенциклидина (РСР) [111,112]. Улотаронт был эффективен против субхронического РСР-индуцированного дефицита в тесте социального взаимодействия у крыс. Все испытанные дозы улотаронта увеличивали время социального взаимодействия с тенденцией к снижению величины эффекта с увеличением дозы от 1 до 10 мг/кг [109]. Улотаронт в дозе 10 мг/кг также смягчал когнитивные нарушения, вызванные субхроническим лечением РСР, в тесте распознавания новых объектов у крыс [109]. Кроме того, улотаронт несколько смягчал вызванные МК-801 нарушения в тесте "водный лабиринт Морриса" и потенцировал эффекты оланзапина в этом когнитивном тесте [110]. Дефицит фильтрации сенсорной информации (sensorimotor gating) присутствует у пациентов, страдающих шизофренией, и может быть смоделирован на грызунах. Исследования влияния лекарств на тест преимпульсного торможения (PPI), акустического стартл-рефлекса у грызунов показали хорошую прогностическую ценность в идентификации потенциальных антипсихотических препаратов [113]. Улотаронт в дозах 0,3-30 мг/кг (перорально) дозозависимо увеличивал PPI при минимальной эффективной дозе 3 мг/кг [100]. Эти

наблюдения были дополнительно подтверждены независимой группой [102]. Введение улотаронта в дозе 10 мг/кг (перорально) увеличивало PPI и, что особенно важно, восстанавливало PPI, сниженный предварительным введением МК-801 мышам дикого типа. Примечательно, что аналогичное действие отсутствовало при введении улотаронта ТААР1-нокаутных мышам, что подтверждает механизм воздействия препарата на преимпульсное торможение как модель негативных симптомов через агонизм к ТААР1 рецептору [102].

Экстрапирамидные симптомы и увеличение веса относятся к распространенным побочным реакциям, вызываемым антипсихотической терапией. Для оценки потенциальной возможности развития экстрапирамидных симптомов улотаронта был проведен бар-тест, при этом галоперидол использовался в качестве положительного контроля. Улотаронт в самой высокой исследованной дозе 100 мг/кг (перорально) не вызвал каталептического эффекта у мышей, что указывает на низкий потенциал препарата вызывать каталептические эффекты в дозах, значительно превышающих эффективные дозы в моделях психоза у мышей [100]. Однако было обнаружено, что улотаронт (10 мг/кг перорально) статистически значимо снижает базальную локомоторную активность мышей [102]. Последний эффект, по-видимому, является ТААР1-зависимым, поскольку препарат не влиял на локомоторную активность у ТААР1-нокаутных мышей [102]. Действие улотаронта на вес животных также оценивалось на мышах. Было показано, что хроническое лечение препаратом (в диапазоне доз 2-3 мг/кг перорально) не приводит к увеличению веса. Более того, введение улотаронта (3 мг/кг, перорально) предотвращало увеличение веса у животных, хронически получавших оланзапин [110].

Антипсихотики второго поколения хорошо известны как вспомогательные средства в терапии депрессии [114,115]. Анализ действия улотаронта в тесте принудительного плавания (FST), стандартном тесте на животных для оценки антидепрессантоподобной активности фармакологических агентов, показал, что введение препарата (в диапазоне доз 1-10 мг/кг перорально) привело к сокращению времени иммобилизации у мышей, что указывает на то, что улотаронт может обладать антидепрессантоподобным действием [100]. Недавно эти результаты были подтверждены другой группой [116]. В этом исследовании улотаронт уменьшал время неподвижности в тесте принудительного плавания и его аналогах - тесте подвешивания за хвост (tail suspension test), а также потенцировал действие антидепрессанта дулоксетина. Более того, улотаронт (15 мг/кг перорально в течение 21 дня) смягчал моделированное состояние ангедонии, вызванное хроническим непредсказуемым стрессом в тесте на предпочтение сахарозы, не оказывая никакого эффекта на не подвергавшихся стрессу мышей [116].

Улотаронт был протестирован на крысах для определения его влияния на архитектуру сна. Улотаронт в дозах 1, 3 и 10 мг/кг (перорально) вызывал дозозависимое снижение быстрого сна, увеличение латентности REM-сна и увеличение кумулятивного времени бодрствования. Улотаронт не влиял на кумулятивное время non-REM сна и время наступления non-REM сна. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что улотаронт может улучшать бдительность/бодрствование при применении в неактивной фазе [100].

Как в четырёхнедельном, так и в шестимесячном исследовании улотаронт показал свою эффективность в отношении симптомов шизофрении, что выражалось в снижении балльной оценки по шкалам PANSS и BSS, оценивающих позитивные и негативные симптомы. Самыми частыми нежелательными явлениями были головные боли, бессонница, тревожность и обострение шизофрении [117]. Примечательно, что у группы, получавшей препарат также улучшались показатели общего функционирования по шкале UPSA-B, а также улучшения в когнитивной сфере, оцениваемые по опроснику Cogstate [118].

Улотаронт как в доклинических, так и в клинических исследованиях не продемонстрировал способности вызывать экстрапирамидные побочные эффекты, характерные для большинства антипсихотиков. Экстрапирамидные побочные эффекты в клинических исследованиях не отличались в группах, получавших улотаронт и плацебо [117].

Что касается метаболических побочных эффектов, то в доклинических исследованиях не было показано набора веса у животных, получавших улотаронт субхронически. Напротив, имеются данные о том, что совместное введение улотаронта и оланзапина способно понижать вызванный оланзапином набор веса [110]. Во время клинических исследований набора веса у пациентов, получавших улотаронт, не было выявлено, как и значительных изменений в уровне триглицеридов и гликированного гемоглобина [117]. В терапевтических дозах улотаронт не оказывал влияния на систему проводимости, о чём свидетельствует отсутствие изменений в интервале QT [117,119].

По той причине, что большинство антипсихотических препаратов воздействуют на D2 рецепторы, для них весьма свойственно вызывать повышение уровней пролактина у пациентов [120]. Улотаронт в связи с иным профилем мишеней, на которые он способен воздействовать, в клинических исследованиях не показал влияния на уровни пролактина получавших его пациентов [117].

По всей видимости, улотаронт также способен воздействовать на психотические проявления у пациентов с болезнью Паркинсона. В пилотном клиническом исследовании (NCT02969369) у пациентов, получавших улотаронт, были выявлены улучшения по шкале позитивных симптомов при болезни Паркинсона SAPS-PD без ухудшения моторной симптоматики [121], однако в силу небольшого количества пациентов в выборке разница не достигла статистической значимости. Дальнейшие исследования должны прояснить эффекты улотаронта у данной группы пациентов.

Помимо исследований, сфокусированных на шизофрении, эффективность и безопасность улотаронта исследуется при большом депрессивном расстройстве (NCT05593029) и генерализованном тревожном расстройстве (NCT05729373). Одно из исследований было посвящено изучению влияния улотаронта на пациентов с нарколепсией-катаплексией (NCT05015673). Улотаронт в дозах 25 и 50 мг в день на протяжении двух недель снижал количество коротких дневных эпизодов REM-сна у пациентов, а также количество эпизодов катаплексии, однако ни одна из доз не оказывала статистически и клинически значимого влияния на дневную сонливость пациентов [122]. Ранее в доклинических и клинических исследованиях было выявлено подавление улотаронтом сна с быстрым движением глаз [100,123]. Влияние однократных пероральных доз (50 и 10 мг) улотаронта на REM-сон исследовали у здоровых мужчин (N = 12 для каждой дозы) в рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом перекрестном исследовании. Также были проанализированы концентрации препарата в плазме крови. Улотаронт в дозе 50 мг с большим эффектом (>3) влиял на параметры REM-сна после однократного приема и концентрации в плазме  $\geq 100$  нг/мл. Ниже этой эффективной концентрации доза 10 мг вызывала гораздо меньший эффект, увеличивая только время наступления REM-сна с размером эффекта равным 1, параллельно не изменяя время проведенное в REM-сне. Лечение улотаронтом в дозе 50 мг было связано с небольшим увеличением времени, проведенного в non-REM сне (стадии 2 и 3) [123]. Результаты post-hoc анализа выявили значительное влияние улотаронта на количество REM-сна без атонии у здоровых людей после приема дозы 50, но не 10 мг [124].

Суммируя всё вышесказанное, можно сделать вывод, что улотаронт способен оказывать антипсихотическое действие, не влияя напрямую на D2 и 5HT<sub>2A</sub> рецепторы, задействуя отличные от классических антипсихотиков мишени, среди которых идентифицированы TAAR1 и 5HT<sub>1A</sub> рецепторы. Судя по доклиническим данным, часть эффектов являются TAAR1-обусловленными. Снижение негативных симптомов может быть результатом как отсутствия прямого влияния на D2 рецепторы, вызывающего вторично-негативную симптоматику при

применении классических антипсихотических препаратов, так и других механизмов. Будущие исследования продемонстрируют сравнительную эффективность улотаронта и других, применяемых в клинике антипсихотических препаратов, а также помогут определить группы пациентов, в лечении которых улотаронт мог бы быть препаратом выбора при купировании обострений и поддерживающем лечении. Долгосрочная безопасность и эффективность является ещё одной важной темой, подлежащей изучению. Так же интересным предметом исследований является последующая характеристика пациентов, отвечающих либо не отвечающих на новый вид лечения, а также возможное применение данной терапии у резистентных групп пациентов. Данные исследования будут интересны с точки зрения характеристики эндофенотипов заболевания, так как до сих пор этиология и патогенез шизофрении изучен не до конца. Если препарат будет одобрен для применения в клинике, то не исключено, что он может быть использован не только в качестве монотерапии, но и в качестве лекарственных комбинаций при различных расстройствах.

Агонисты TAAR1 активно изучаются в качестве потенциальных антиаддиктивных препаратов [125].

Известно, что вещества, обладающие аддиктивным потенциалом, способны понижать пороговые значения тока, при которых самостимуляция сохраняется у ранее обученных животных [126]. TAAR1-агонисты RO5256390 и RO5263397, вводимые на фоне кокаина, дозозависимо уменьшали способность кокаина снижать пороги самостимуляции у крыс, причём полный агонист RO5256390 не оказывал влияния на пороги самостимуляции у интактных животных, в то время как парциальный агонист RO5263397 в максимально исследованной дозе повышал имеющийся порог [127].

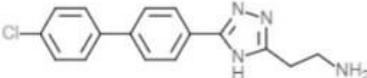
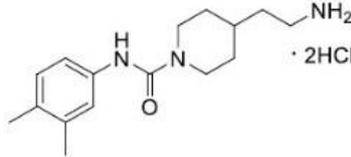
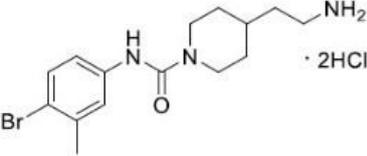
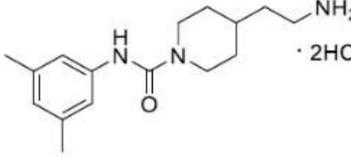
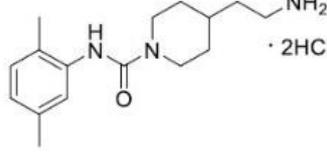
Одной из критических проблем в лечении зависимостей от ПАВ является возврат к употреблению после периода воздержания [128,129]. Установление стойкой ремиссии - важная практическая задача современной наркологии. Крейвинг и последующий рецидив у пациентов часто вызывается острым повторным приёмом ПАВ (прайминг-эффект) [130], сигналами и обстановкой, контекстно связанными с ПАВ [131] или определенными стрессовыми факторами [132]. Эти клинические сценарии часто исследуются с использованием модели восстановления угашенной реакции самовведения (УРС) на лабораторных животных [133]. Запускать восстановление УРС у лабораторных животных могут различные стимулы, в зависимости от предыдущего опыта обучения. Это может быть безусловный стимул, такой как прайминг-введение вещества, при помощи которого была сформирована реакция самовведения, а также

вещества похожего класса [134]. Помимо безусловных стимулов возобновление УРС возможно при предъявлении широкого спектра условных стимулов, ассоциированных с реакцией самовведения. Также возобновление УРС возможно после воздействия определенных стрессоров [135]. Изучая влияние экспериментальных препаратов на восстановление УРС у лабораторных животных, можно доклинически оценить способность фармакологических препаратов предотвращать рецидивы. Методика имеет хорошую содержательную и конструктивную валидность [136], прогностическая валидность также доказана многочисленными исследованиями, хоть и имеет некоторые ограничения [137]. Различные TAAR1 агонисты были протестированы на способность угнетать восстановление УРС, вызванное как прайминг-введением, так и условными стимулами, связанными с ПАВ. Интраперитонеальное введение крысам RO5256390 и RO5203648 препятствовало восстановлению УРС кокаина, вызванному как прайминг-инъекцией, так и контекстом [138]. Аналогичные данные были получены для морфина при исследовании эффектов RO5263397 [139]. Помимо этого, RO5263397 блокировал восстановление УРС метамфетамина, вызванное как прайминг-введением [140], так и предъявлением зрительных условных стимулов [141]. Схожий эффект был выявлен при тестировании способности данного экспериментального препарата угнетать восстановление УРС никотина, вызванное связанными с ним визуальными стимулами [142]. В одном из исследований были получены интересные данные о том, какие именно области ЦНС вовлечены в эффекты TAAR1 агонистов на восстановление УРС. Для этого препарат RO5166017 вводили в различные структуры мозга и оценивали его влияние на восстановление УРС кокаина, спровоцированное как прайминг-введением, так и предъявлением условных стимулов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что блокирование УРС при помощи RO5166017 обусловлено активацией TAAR1 рецепторов в Nucleus Accumbens и VTA [143]. Данная находка подтверждает роль TAAR1 рецепторов в модуляции работы систем награды и мотивации. Таким образом, можно сделать вывод об эффективности TAAR1-агонистов в нескольких доклинических моделях аддикций с различными классами аддиктивных препаратов.

### 3. Исследование *in vivo* активности новых синтезированных TAAR1-агонистов

Институтом химии Санкт-Петербургского Государственного Университета под руководством профессора Михаила Юрьевича Красавина был синтезирован ряд соединений, потенциально являющихся агонистами рецептора TAAR1 (рисунок 1). Позже синтезированная библиотека соединений исследована сотрудниками Института Трансляционной Биомедицины Санкт-Петербургского Государственного Университета на клеточной линии, экспрессирующей рецепторы TAAR1, для определения эффективных концентраций и размера эффекта. Способность препаратов к активации TAAR1 оценивалась *in vitro* по повышению внутриклеточного уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) при помощи метода резонансного переноса энергии биолюминесценции (BRET). В основе BRET лежит способность химерного белка Rluc-EPAC-YFP изменять свою конформацию при связывании с цАМФ. В результате молекула-донор энергии (люцифераза кораллового полипа *R. reniformis* – Rluc) и молекула-акцептор (жёлтый флуоресцентный белок – YFP), обычно расположенные близко друг к другу в неактивированном состоянии EPAC (exchange protein activated by cAMP), значительно отдаляются, что приводит к снижению резонансного неизлучательного переноса энергии от донора к акцептору. В итоге изменяется соотношение интенсивности люминесценции акцептора (525 нм) и интенсивности люминесценции донора (480 нм), или так называемое соотношение BRET. Таким образом, при активации G $\alpha$ s-сигнального пути, возникающего при активации изучаемого рецептора каким-либо лигандом, будет наблюдаться снижение соотношения BRET. Следовательно, чем сильнее будет снижение данного соотношения от исходного уровня, тем более сильным агонистом будет считаться химическое соединение. Наиболее активные соединения были выбраны для дальнейшего исследования *in vivo* активности на различных животных моделях.

Ранее коллективом лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института Трансляционной Биомедицины и коллегами из НИИ Фармакологии им. Вальдмана была выявлена способность LK00764 подавлять гиперлокомоцию у крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера (DAT), а также подавлять двигательную гиперактивность мышей, вызванную введением антагониста глутаматных рецепторов NMDA подтипа дизоцилпином (МК-801).

Name	Formula	Emax%	EC50
LK00764		101	4 nM
AP 161		84,39	33 nM
AP 162		104,16	37 nM
AP 163		85,22	112 nM
AP 164		79,71	42 nM

**Рисунок 1.** Формулы и характеристики TAAR1-агонистов, *in vivo* активность которых была исследована в ходе выполнения диссертационной работы.

**Исследование действия вещества LK00764 на двигательную гиперактивность мышей, вызванную введением ингибитора дофаминового транспортера GBR 12909**

**Материалы и методы.**

Для проведения эксперимента использовано 21 взрослая самка мышей линии Swiss. Животных содержали по 5-6 особей в плексигласовых клетках, вода и комбикорм на всё время содержания предоставлялись мышам в неограниченном количестве за исключением времени проведения эксперимента. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-

23 градусов по Цельсию, относительную влажность воздуха в помещениях поддерживали в диапазоне 30-70%.

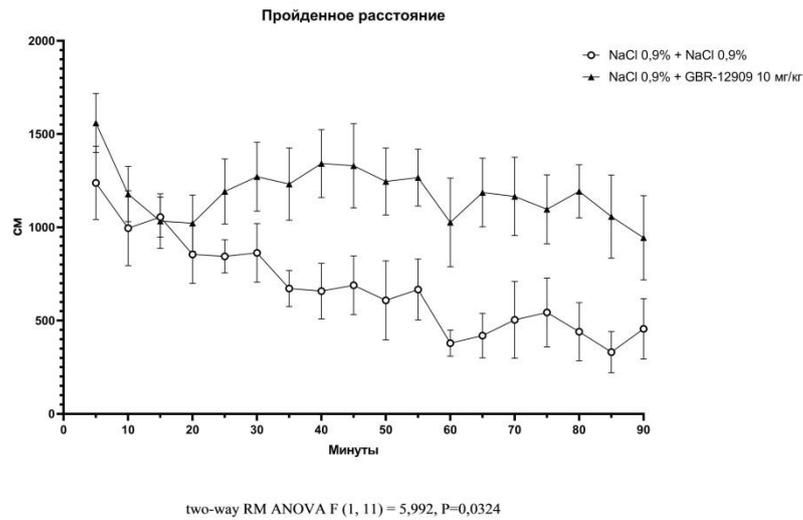
В данном эксперименте исследовалась потенциальная активность вещества LK00764 при внутрибрюшинном (в/б) введении. Животные были случайным образом поделены на 3 экспериментальные группы, количество животных в группе было равно 7 (таблица 1). Животным непосредственно перед посадкой в локомоторные боксы производили в/б инъекцию физиологическим раствором/GBR 12909, далее производили внутрибрюшинную инъекцию физиологическим раствором/LK00764. Подробное описание экспериментальных групп приведено в таблице. Объем введения составлял 10 мл/кг. Животные на 1,5 часа помещались в локомоторные боксы 40см\*40см\*40см, горизонтальная двигательная активность фиксировалась с помощью видеотрекинга Noldus EthoVision.

Данные обрабатывались при помощи two-way RM ANOVA с последующим тестом Bonferroni для множественных сравнений. Статистически значимыми результаты считались при значениях  $p < 0.05$ . Обработка данных производилась с помощью статистического пакета GraphPad Prism.

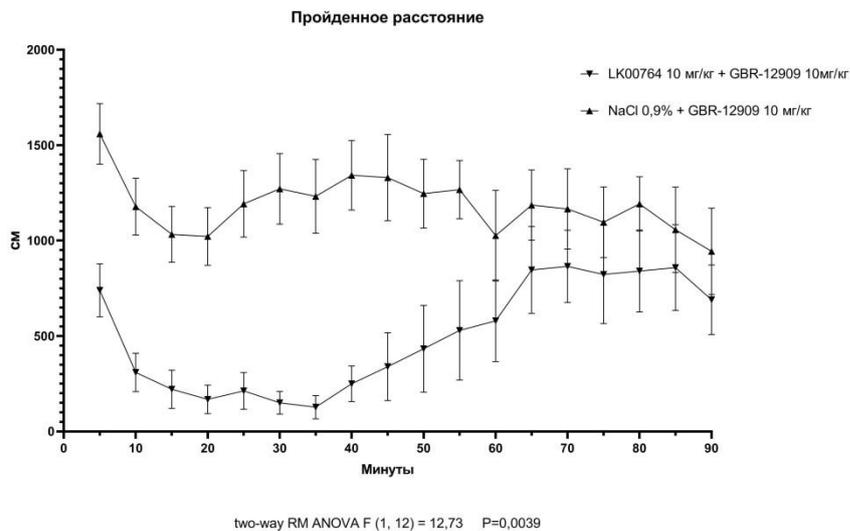
**Таблица 1.** Характеристика групп животных в эксперименте по исследованию действия вещества LK00764 при внутрибрюшинном введении на мышинной модели двигательной гиперактивности, вызванной введением блокатора дофаминового транспортера GBR 12909.

Группа	Количество	И.п. инъекция 1	И.п. инъекция 2
Негативный контроль	7	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%
GBR-12909	7	GBR 12909 10 мг/кг	NaCl 0,9%
LK00764 и.п. 10 мг/кг	7	GBR 12909 10 мг/кг	LK00764 10 мг/кг

## Результаты.



**Рисунок 2.** Дистанция, пройденная за 90 минут после введения веществ контрольной группой и группой, получавшей GBR 12909. GBR 12909 в дозе 10 мг/кг статистически значимо повышал локомоторную активность мышей, two-way RM ANOVA F (1, 11) = 5,992, p=0.0324. На графике отображены mean ± S.E.M.



**Рисунок 3.** Дистанция, пройденная за 90 минут после введения веществ группой, получавшей GBR 12909 и группой, получавшей GBR 12909 и LK00764 интраперитонеально в дозе 10 мг/кг. Интраперитонеальное введение 10 мг/кг LK00764, растворённого в физиологическом растворе, статистически значимо снижало локомоторную гиперактивность, вызванную 10 мг/кг GBR 12909, two-way RM ANOVA F (1, 12) = 12,73, p=0.0039. На графике отображены mean ± S.E.M.

В результате проведённых экспериментов было выявлено, что вещество LK00764 в дозе 10 мг/кг при интраперитонеальном введении способно снижать гиперлокомоцию, вызванную введением DAT-ингибитора GBR 12909. Графики, иллюстрирующие результаты данной серии экспериментов приведены на рисунках 2-3.

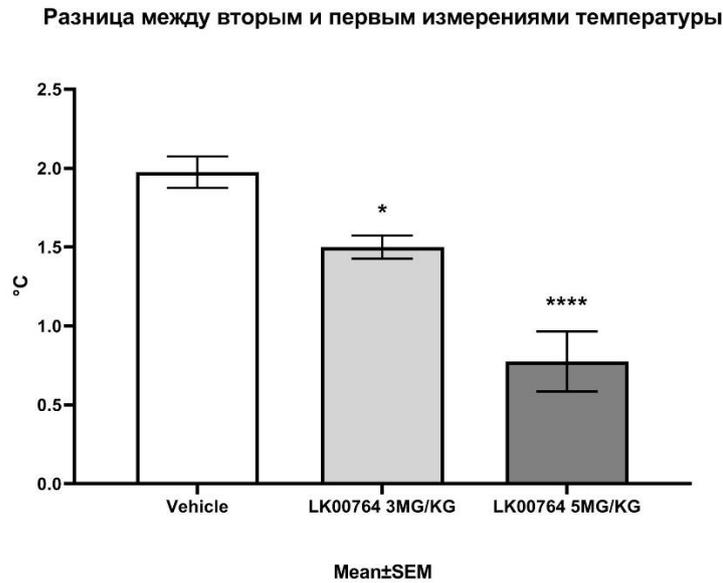
### **Исследование гипотермического действия LK00764 на крысах**

#### **Материалы и методы.**

Для исследования гипотермического действия LK00764 при остром введении были использованы 8 взрослых самцов крыс линии Wistar. Животные содержались по 4 головы в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве, включая время проведения экспериментов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

Термометрию у крыс проводили ректально с помощью термометра BIOSEB. Восемью самцам крыс линии Wistar вводили интраперитонеально растворитель (10% полисорбат 80, растворённый в физиологическом растворе) или LK00764 в дозе 3 или 5 мг/кг, растворённый в 10% полисорбате 80 (в физиологическом растворе). Инъекции проводились в объёме 1 мл/кг. Для проведения эксперимента использовался дизайн "латинский квадрат". Первое измерение проводилось непосредственно перед инъекцией, второе - через 15 мин. Рассчитывалась разница между вторым и первым измерениями.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программы GraphPad Prism, использовался RM one-way ANOVA тест с последующим тестом Bonferroni для множественных сравнений. Статистически значимыми считались значения  $p < 0.05$ .

**Результаты.**

**Рисунок 4.** Разница в температурах после инъекции. LK00764 в дозе 3 мг/кг при интраперитонеальном введении статистически значимо снижал проявления стресс-индуцированной гипертермии - Bonferroni's multiple comparisons test,  $p=0.0123$ , подобный эффект отмечался и в дозе 5 мг/кг - Bonferroni's multiple comparisons test,  $p<0.0001$ .

Таким образом, LK00764 дозо-зависимо способен снижать проявления стресс-индуцированной гипертермии, что является возможным предиктором анксиолитического действия [144,145], а также соотносится с предыдущими доклиническими исследованиями TAAR1-агонистов [3]. Результаты эксперимента отображены на рисунке 4.

## **Исследование воздействия на поведение мышей вещества LK00764 при остром введении в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тест вынужденного плавания»**

### **Материалы и методы.**

Для исследования воздействия на поведение острого введения препарата LK00764 были использованы 24 взрослых самки мышей линии Swiss. Животные содержались по 4-6 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве за исключением времени проведения экспериментов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

Мыши случайным образом были поделены на 3 экспериментальные группы по 8 животных в каждой (таблица 2). Препарат LK00764 либо физиологический раствор вводился за 30 минут до начала экспериментов в объёме 10 мл/кг. Далее поочередно выполнялись тесты «Открытое поле» – 5 минут, «Приподнятый крестообразный лабиринт» – 5 минут, «Тест вынужденного плавания» – 10 минут. Контрольная группа получала инъекции физиологического раствора интраперитонеально и подкожно, группа «LK00764 – подкожно» получала инъекцию физиологического раствора интраперитонеально и инъекцию 10 мг/кг LK00764 подкожно, группа «LK00764 – интраперитонеально» получала инъекцию 10 мг/кг LK00764 интраперитонеально и инъекцию физиологического раствора подкожно.

Круговой тест открытого поля использовали для анализа исследовательской активности. Аппарат состоял из серой пластиковой круглой арены (диаметр 63 см) с 13 отверстиями в полу (диаметр отверстий 1,6 см) и условиями освещения 200 лк. Каждую мышь помещали в центр арены и регистрировали спонтанную исследовательскую активность с помощью программного обеспечения для видеотрекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. Отслеживались следующие поведенческие параметры: общее пройденное расстояние, совокупная продолжительность пребывания в центральной зоне, количество подъёмов на задние лапы и количество исследований норок.

Для измерения уровня тревожного поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Лабиринт состоял из двух противоположных открытых (30 x 5 см)

и двух противоположных закрытых рукавов (30 x 5 x 15 см), приподнятых на 40 см от пола. Мышей помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта к закрытому рукаву и регистрировали в течение 5 мин. Следующие параметры были проанализированы с помощью программного обеспечения Noldus Ethovision: совокупная продолжительность в открытых рукавах, частота входов в открытые рукава, общее пройденное расстояние, количество подъёмов на задние лапы, количество свешиваний.

Для оценки депрессивноподобного поведения использовали тест вынужденного плавания. Каждую мышь отдельно помещали в цилиндр из плексигласа (диаметр: 10 см, высота: 21 см), заполненный водой на 2/3. Температура воды находилась в пределах  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Тест проводился в течение 10 мин. Уровень воды был достаточно глубоким (18 см), чтобы хвост мыши не касался дна. После купания мышей вынимали из воды, вытирали насухо полотенцем, возвращали в их домашнюю клетку и оставляли в теплом помещении. Оценивали суммарное время иммобилизации, активного и пассивного плавания.

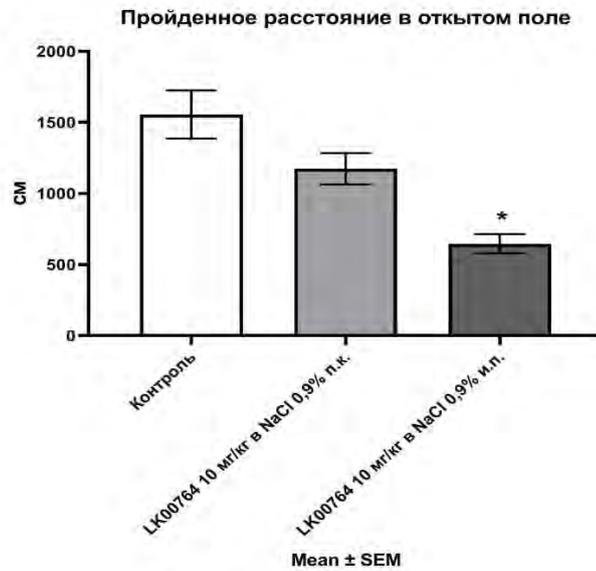
Для обработки полученных данных был использован One-Way ANOVA test с поправкой Bonferroni на множественные сравнения. Статистически значимыми различия признавались при значениях  $p < 0.05$ . Статистическая обработка данных производилась с помощью статистического пакета GraphPad Prism.

**Таблица 2.** Характеристика групп животных в экспериментах по изучению влияния на поведение мышей острого введения препарата LK00764.

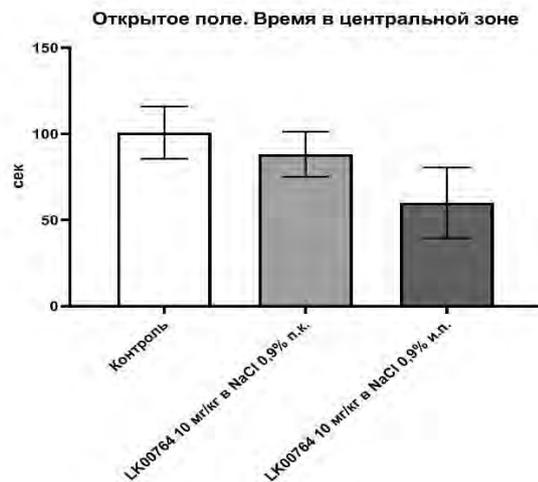
Группа	Количество
Контроль	8
LK00764 10 мг/кг интраперитонеально (растворённого в NaCl 0,9%) + NaCl 0,9% подкожно	8
LK00764 10 мг/кг подкожно (растворённого в NaCl 0,9%) + NaCl 0,9% интраперитонеально	8

## Результаты.

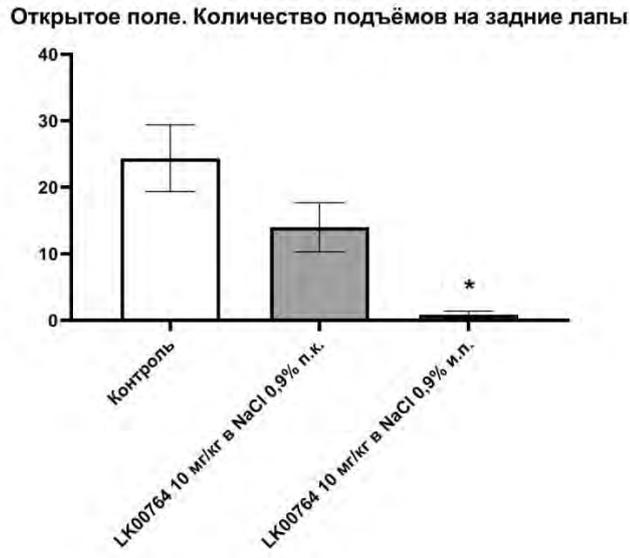
### Открытое поле.



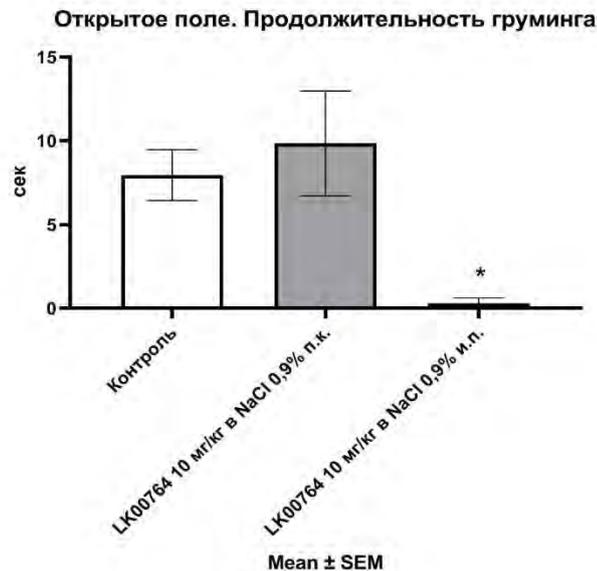
**Рисунок 5.** Пройденное мышами расстояние в открытом поле. LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении статистически значимо не снижал пройденное расстояние за время выполнения теста, однако имелась тенденция к его снижению - Bonferroni's multiple comparisons test,  $p=0.0733$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг статистически значимо снижал пройденное расстояние - Bonferroni's multiple comparisons test,  $p<0.0001$ .



**Рисунок 6.** Проведённое мышами время в центральной зоне открытого поля. LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении статистически незначимо не влиял на время, проведённое в центральной зоне открытого поля, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p>0.05$ . На графике отображены mean ± S.E.M.

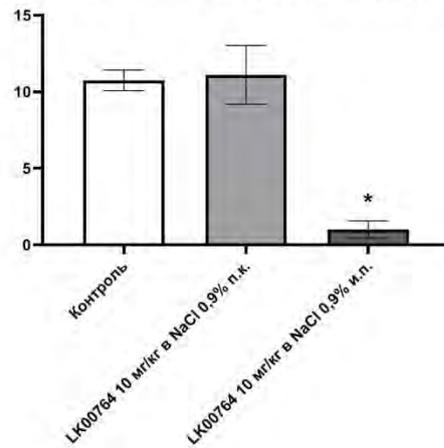


**Рисунок 7.** Частота подъяма на задние лапы во время теста «открытое поле». LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении статистически значимо не влиял на количество подъямов на задние лапы, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг снижал количество подъямов на задние лапы, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p = 0.0004$ . На графике отображены mean  $\pm$  S.E.M.



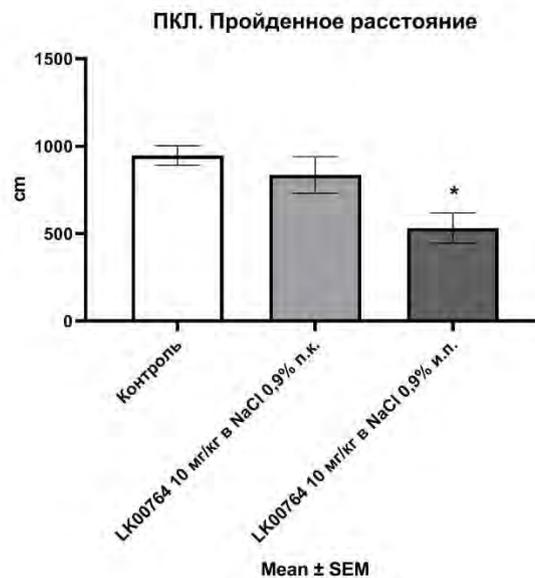
**Рисунок 8.** Продолжительность груминга во время теста «открытое поле». LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении значимо не влиял на продолжительность груминга, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг статистически значимо снижал продолжительность груминга, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p = 0.0433$ .

Открытое поле. Количество обследований отверстий

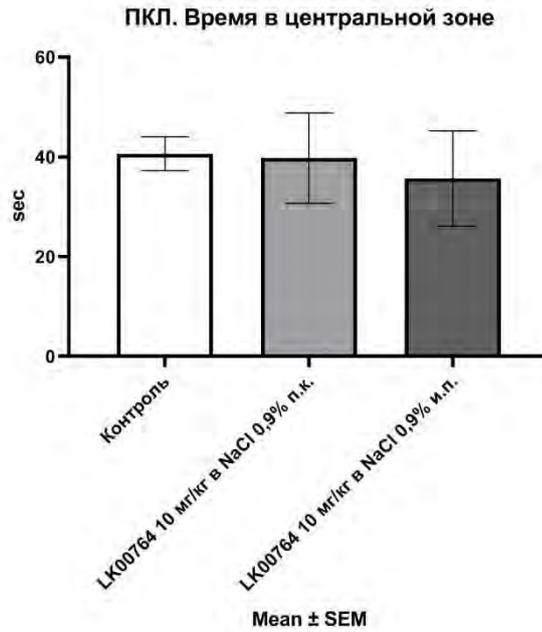


**Рисунок 9.** Количество обследований отверстий во время теста «открытое поле». LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении значимо не влиял на количество обследований отверстий, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг статистически значимо снижал количество исследований отверстий, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p < 0.0001$ . На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

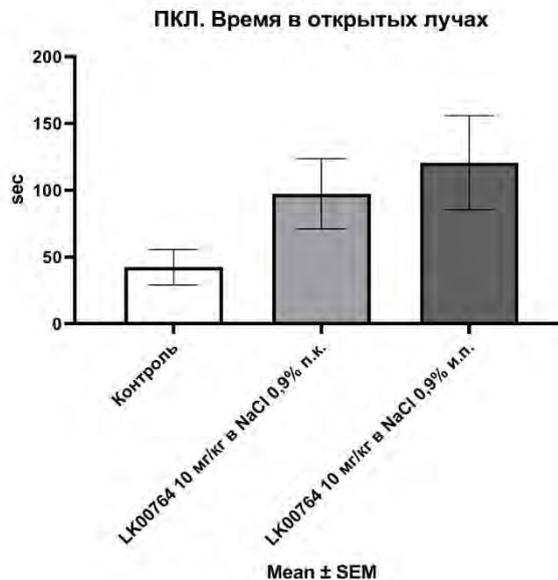
### Приподнятый крестообразный лабиринт



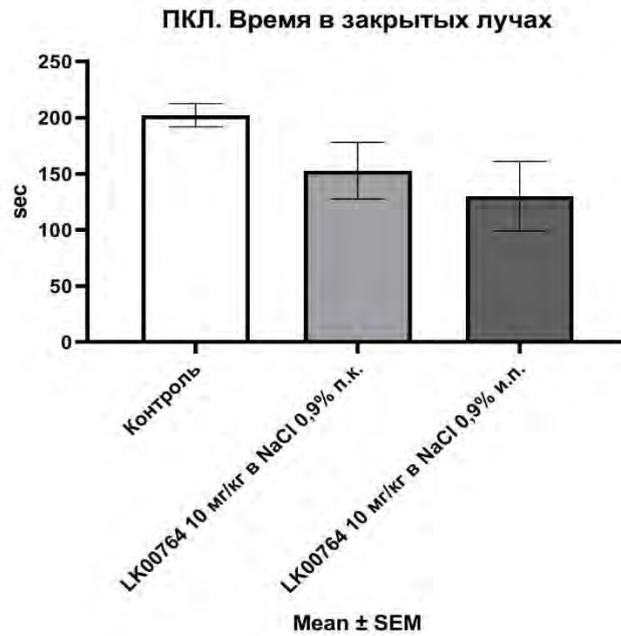
**Рисунок 10.** Пройденное мышами расстояние за время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении значимо не влиял на пройденное расстояние, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг статистически значимо снижал пройденное расстояние, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p = 0.0065$ .



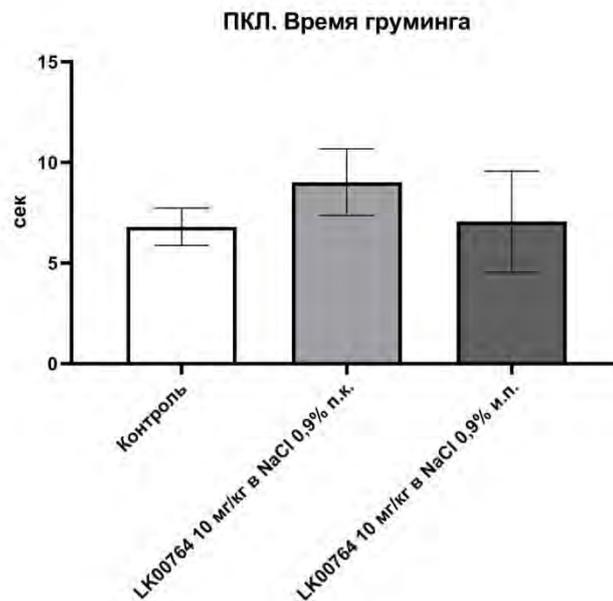
**Рисунок 11.** Время, проведённое мышами в центральной зоне при выполнении теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на время, проведённое в центральной зоне, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ .



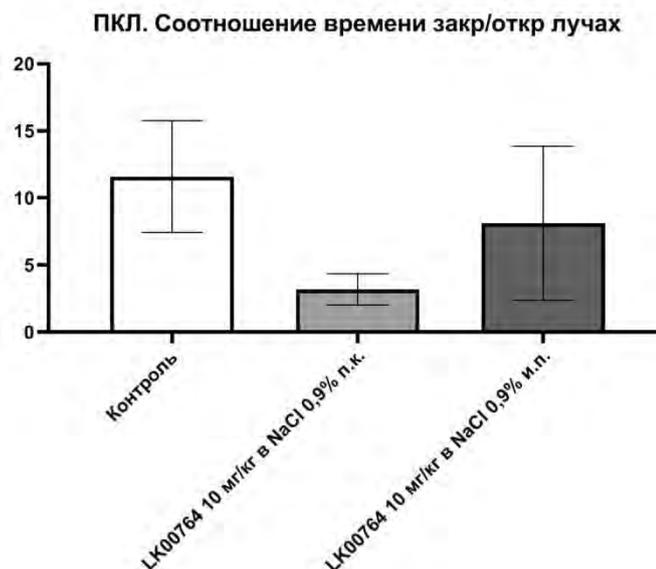
**Рисунок 12.** Время, проведённое мышами в открытых лучах приподнятого крестообразного лабиринта. LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на время, проведённое в открытых лучах, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ .



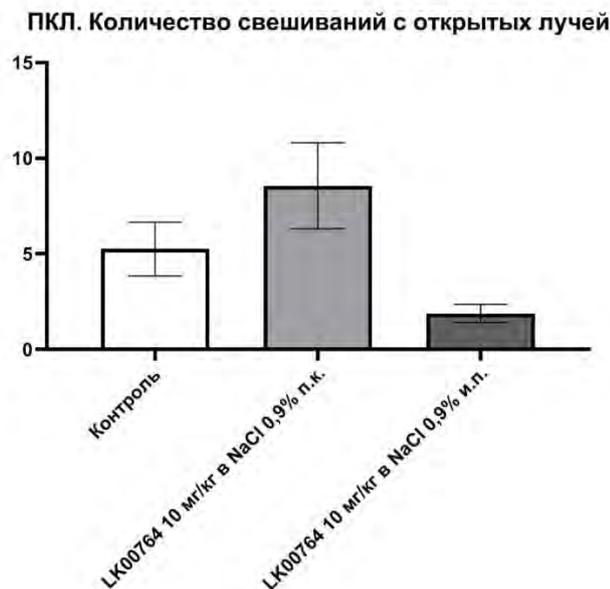
**Рисунок 13.** Время, проведённое мышами в закрытых лучах приподнятого крестообразного лабиринта. LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на время, проведённое в закрытых лучах, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ .



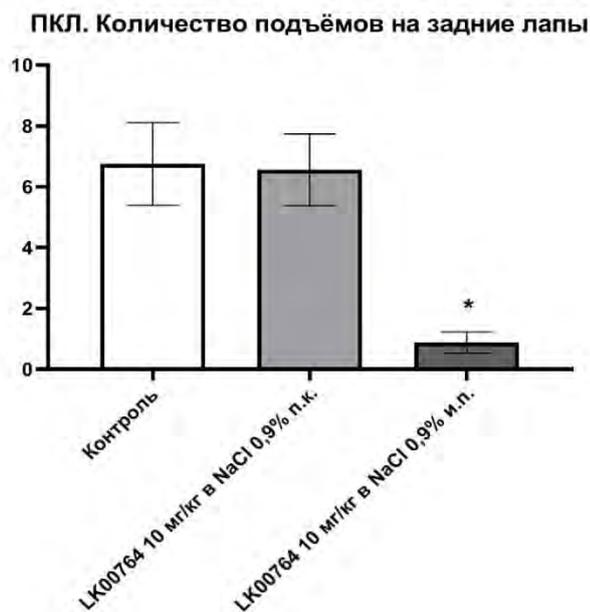
**Рисунок 14.** Время груминга при выполнении теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на время груминга, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . На графике отображены mean  $\pm$  S.E.M.



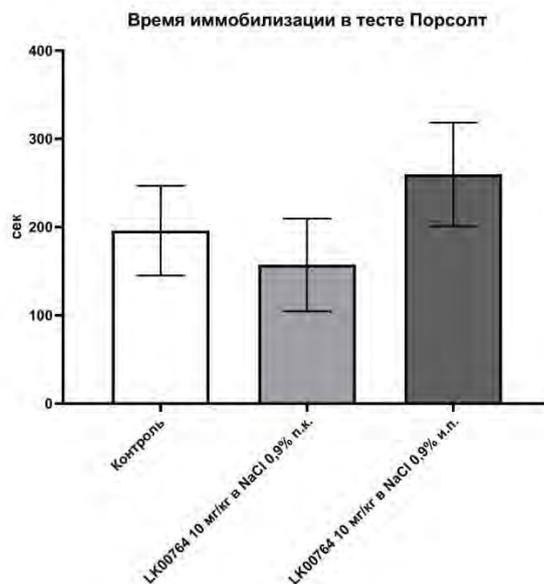
**Рисунок 15.** Соотношение времени, проведённого в закрытых и открытых лучах во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на соотношение времени, проведённого в закрытых и открытых лучах, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



**Рисунок 16.** Количество свешиваний с открытых лучей во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на количество свешиваний с открытых лучей, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



**Рисунок 17.** Количество подъёмов на задние лапы во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». LK00764 в дозе 10 мг/кг при подкожном введении значимо не влиял на количество подъёмов на задние лапы, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . При интраперитонеальном введении LK00764 в дозе 10 мг/кг статистически значимо снижал количество подъёмов на задние лапы, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p = 0.0020$ .



**Рисунок 18.** Время иммобилизации при выполнении теста вынужденного плавания. LK00764 в дозе 10 мг/кг как при подкожном, так и при интраперитонеальном введении значимо не влиял на время иммобилизации, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ . На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

Из полученных результатов можно сделать выводы об угнетающем действии препарата LK00764 на двигательную и исследовательскую активность. В тесте «Открытое поле» LK00764 в дозе 10 мг/кг при интраперитонеальном введении статистически значимо снижал пройденную животными дистанцию за время теста, аналогичная тенденция отмечена и при подкожном введении, что отражено на рисунке 5. Пройденная дистанция также снижалась в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при интраперитонеальном введении препарата (рисунок 10). Вертикальная двигательная активность так же угнеталась в группе, получавшей LK00764 интраперитонеально, о чём свидетельствует снижение подъёмов на задние лапы в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», что отражено на рисунках 7 и 17. Помимо данных показателей при интраперитонеальном введении снижалась продолжительность груминга и количество исследованных отверстий при выполнении теста «Открытое поле», но не во время теста «Приподнятый крестообразный лабиринт», что отражено на рисунках 8, 9 и 14. Различия в результатах между интраперитонеальным и подкожным введением могут быть объяснены отличиями в таких фармакокинетических параметрах, как максимальная концентрация препарата и время её достижения.

Препарат при остром введении не продемонстрировал анксиолитических свойств, о чём может говорить отсутствие изменений в таких показателях как время, проведённое в центральной зоне открытого поля, а также время, проведённое в открытых, закрытых лучах и центральной зоне приподнятого крестообразного лабиринта и количество свешиваний с открытых лучей лабиринта, что отражено на рисунках 6 и 11-16.

Наличие антидепрессивных свойств при остром введении LK00764 не продемонстрировал, так как статистически значимых различий в продолжительности иммобилизации в тесте вынужденного плавания между опытными группами и контрольной группой выявлено не было, что продемонстрировано на рисунке 18.

Исходя из полученных результатов можно говорить о преимущественно седативных свойствах препарата LK00764 при остром интраперитонеальном введении в дозе 10 мг/кг, но практически полном отсутствии подобных эффектов при подкожном введении через 30-50 минут после инъекции.

**Исследование воздействия на поведение мышей вещества LK00764 при субхроническом 14-дневном введении в тестах «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Тест вынужденного плавания»**

**Материалы и методы.**

Для исследования воздействия на поведение субхронического введения препарата LK00764 было использовано 20 взрослых самок мышей линии Swiss. Животные содержались по 4-6 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве за исключением времени проведения экспериментов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

Мыши случайным образом были поделены на 2 экспериментальные группы (таблица 3). Первая группа (контроль) получала подкожные инъекции физиологическим раствором в объёме 10 мл/кг. Вторая группа (LK00764) получала подкожные инъекции LK00764 в дозе (10 мг/кг), растворённом в физиологическом растворе в объёме 10 мл/кг. Процедура повторялась ежедневно на протяжении 14 дней. Тест проводится на следующий день после последнего введения препарата (24 часа перерыв). Поочерёдно выполнялись тесты «Открытое поле» - 5 минут, «Приподнятый крестообразный лабиринт» - 5 минут, «Тест вынужденного плавания» - 10 минут.

Круговой тест открытого поля использовали для анализа исследовательской активности. Аппарат состоял из серой пластиковой круглой арены (диаметр 63 см) с 13 отверстиями в полу (диаметр отверстий 1,6 см) и условиями освещения 200 лк. Каждую мышь помещали в центр арены и регистрировали спонтанную исследовательскую активность с помощью программного обеспечения для видеотрекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. Отслеживались следующие поведенческие параметры: общее пройденное расстояние, совокупная продолжительность пребывания в центральной зоне, количество подъёмов на задние лапы и количество исследований норок.

Для измерения уровня тревожного поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Лабиринт состоял из двух противоположных открытых (30 x 5 см) и двух противоположных закрытых рукавов (30 x 5 x 15 см), приподнятых на 40 см от пола.

Мышей помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта к закрытому рукаву и регистрировали в течение 5 мин. Следующие параметры были проанализированы с помощью программного обеспечения Noldus Ethovision: совокупная продолжительность в открытых рукавах, частота входов в открытые рукава, общее пройденное расстояние, количество подъёмов на задние лапы, количество свешиваний.

Для оценки депрессивноподобного поведения использовали тест вынужденного плавания. Каждую мышь отдельно помещали в цилиндр из плексигласа (диаметр: 10 см, высота: 21 см), заполненный водой на 2/3. Температура воды находилась в пределах  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Тест проводился в течение 10 минут. Уровень воды был достаточно глубоким (18 см), чтобы хвост мыши не касался дна. После купания мышей вынимали из воды, вытирали насухо полотенцем, возвращали в их домашнюю клетку и оставляли в теплом помещении. Оценивали суммарное время иммобилизации, активного и пассивного плавания.

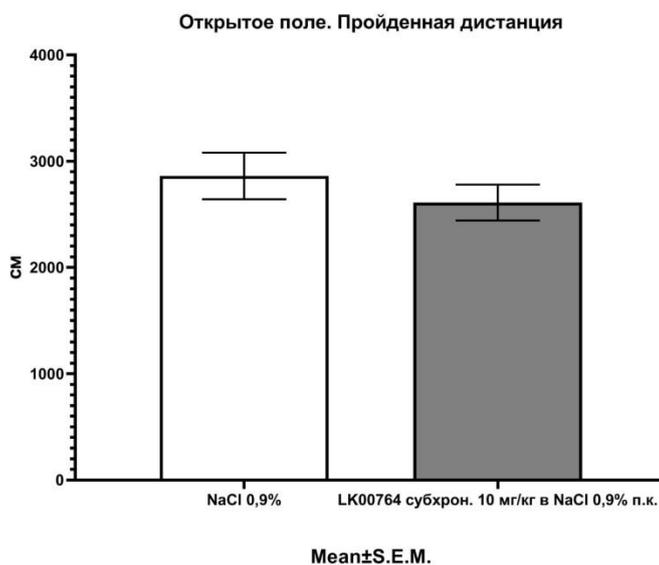
Для статистического анализа при сравнении групп был использован Unpaired t test, статистически значимыми различия признавались при значениях  $p < 0.05$ . Обработка данных производилась с помощью статистического пакета GraphPad Prism.

**Таблица 3.** Характеристика групп животных в экспериментах по изучению влияния на поведение мышей субхронического 14-дневного введения препарата LK00764.

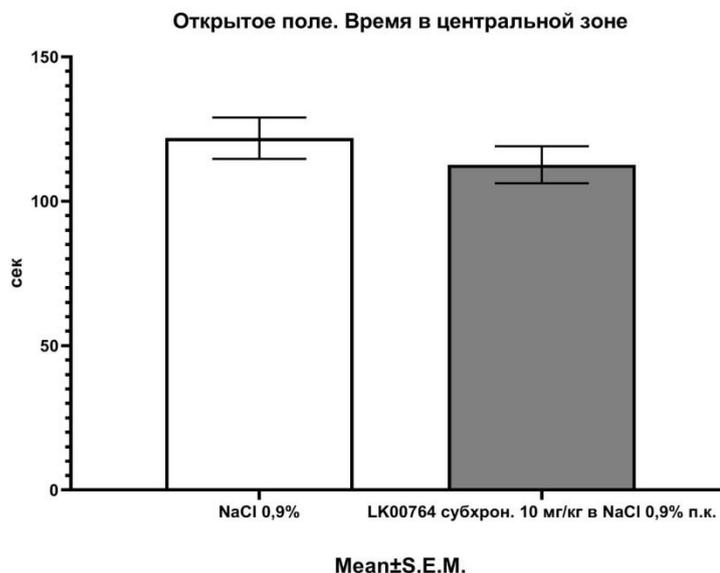
Группа	Количество
Контроль	10
LK00764 10 мг/кг подкожно	10

## Результаты.

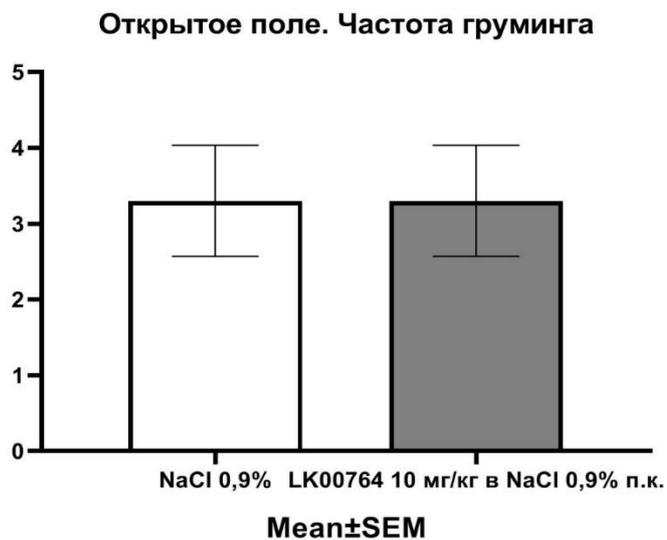
### Открытое поле.



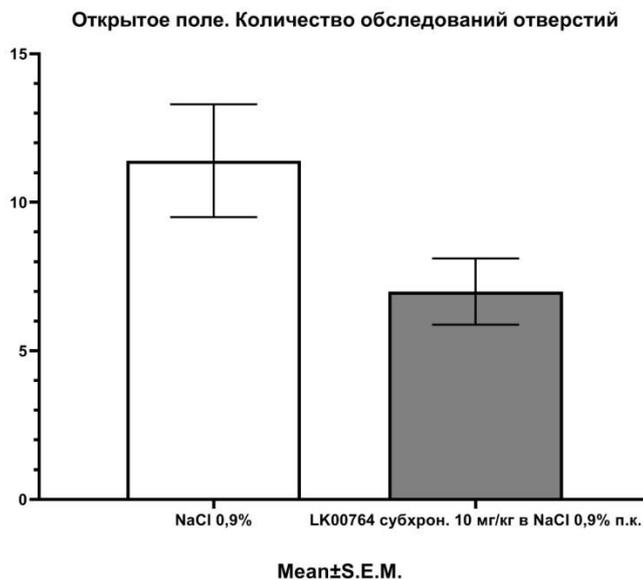
**Рисунок 19.** Пройденная мышами дистанция за время выполнения теста «открытое поле». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на пройденную дистанцию, Unpaired t test,  $p=0.3784$



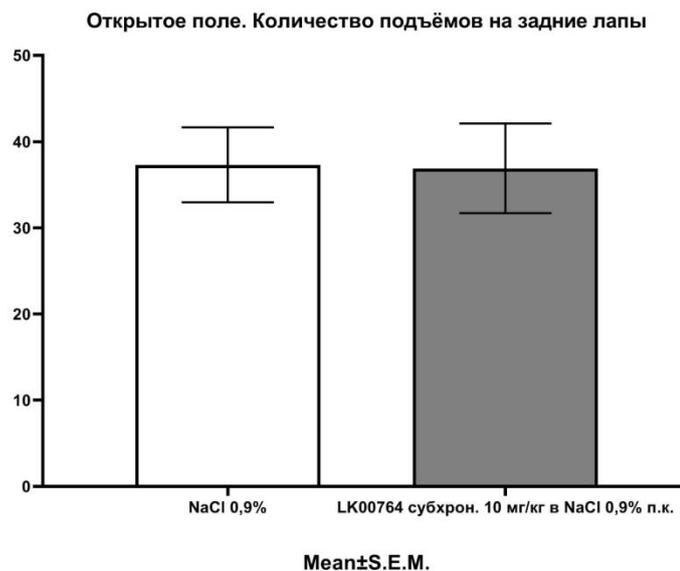
**Рисунок 20.** Время, проведённое мышами в центральной зоне открытого поля. Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на время, проведённое в центральной зоне, Unpaired t test,  $p=0.3505$ .



**Рисунок 21.** Частота груминга во время выполнения теста «открытое поле». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на частоту груминга, Unpaired t test,  $p > 0.9999$ .

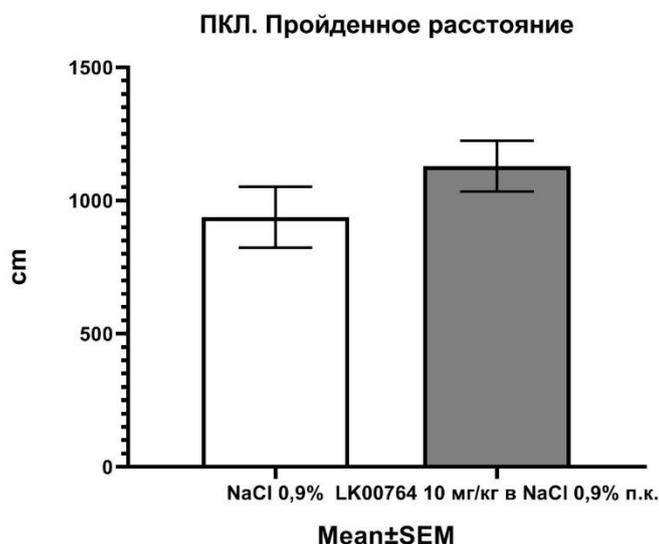


**Рисунок 22.** Количество обследований отверстий во время выполнения теста «открытое поле». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на количество обследованных отверстий, Unpaired t test,  $p = 0.0610$ .

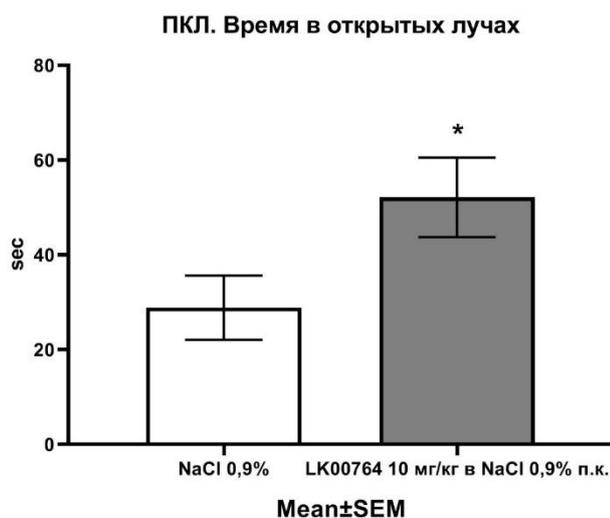


**Рисунок 23.** Количество подъёмов на задние лапы во время выполнения теста «открытое поле». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на количество подъёмов на задние лапы, Unpaired t test,  $p=0.9536$ .

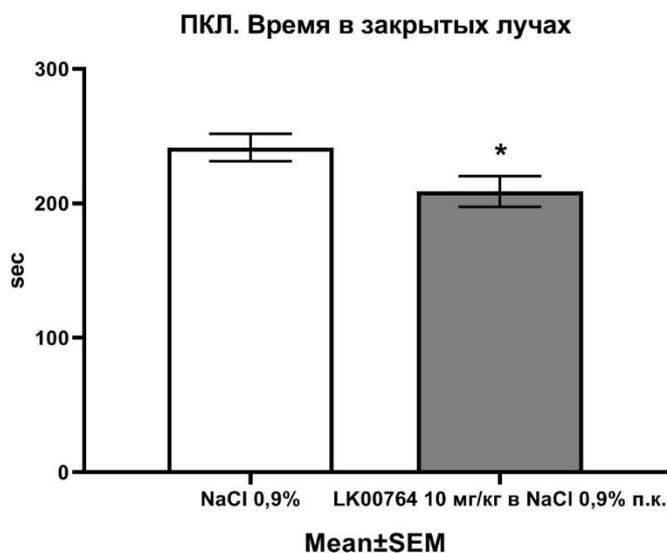
#### Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»



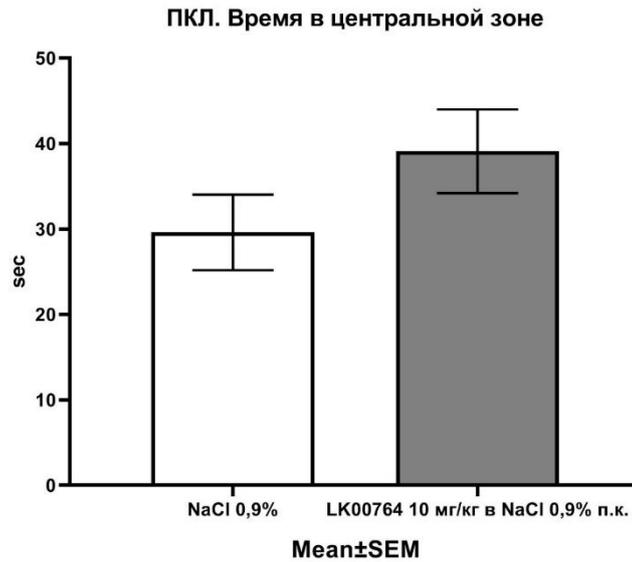
**Рисунок 24.** Пройденное расстояние за время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на пройденное в тесте расстояние, Unpaired t test,  $p=0.2159$ .



**Рисунок 25.** Время, проведённое мышами в открытых лучах теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг повышало время нахождения в открытых лучах, Unpaired t test,  $p=0.0447$ .

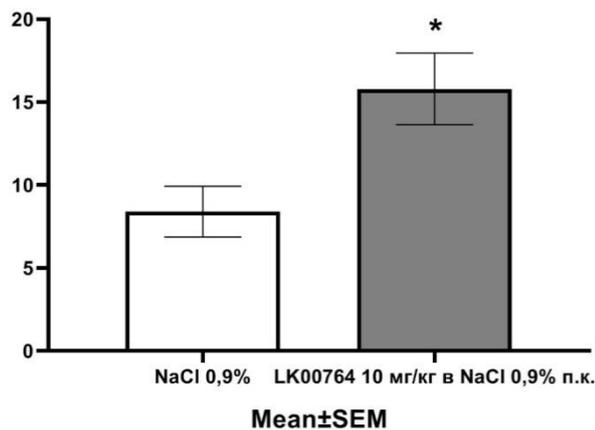


**Рисунок 26.** Время, проведённое мышами в закрытых лучах теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг понижало время нахождения в закрытых лучах, Unpaired t test,  $p=0.0462$ .

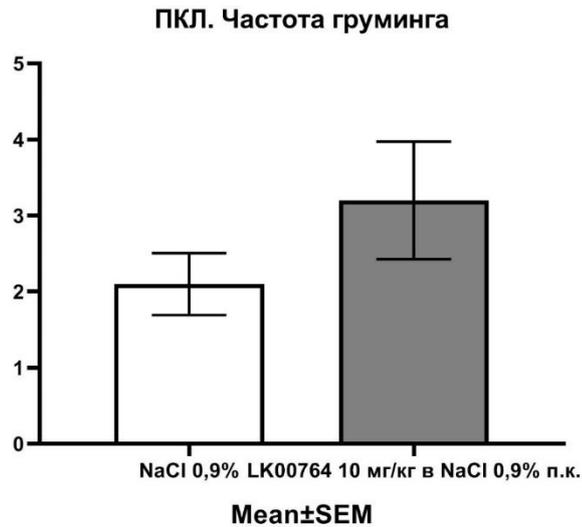


**Рисунок 27.** Время, проведённое мышами в центральной зоне «приподнятого крестообразного лабиринта». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на время, проведённое в центральной зоне, Unpaired t test,  $p=0.1675$ .

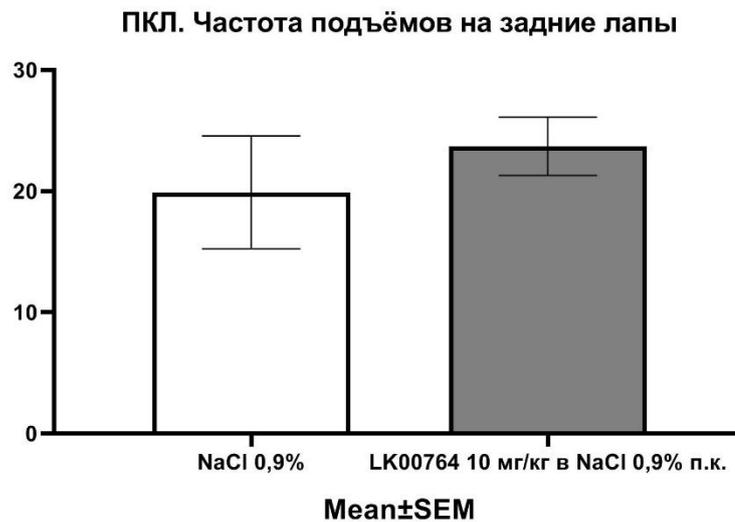
ПКЛ. Количество свешиваний с открытых лучей



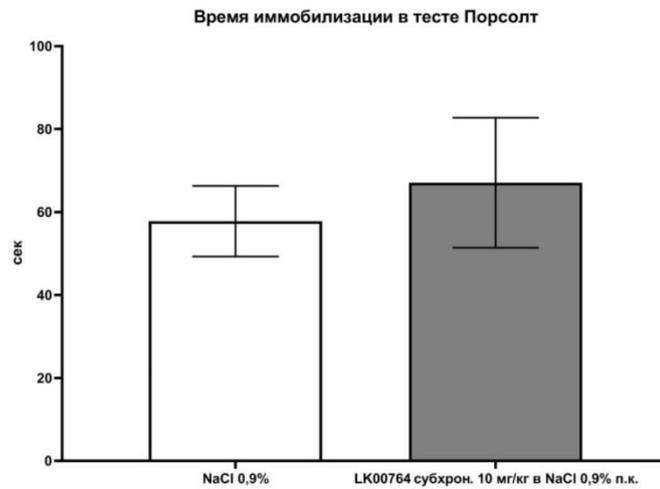
**Рисунок 28.** Количество свешиваний с открытых лучей во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг повышало количество свешиваний, Unpaired t test,  $p=0.0119$ .



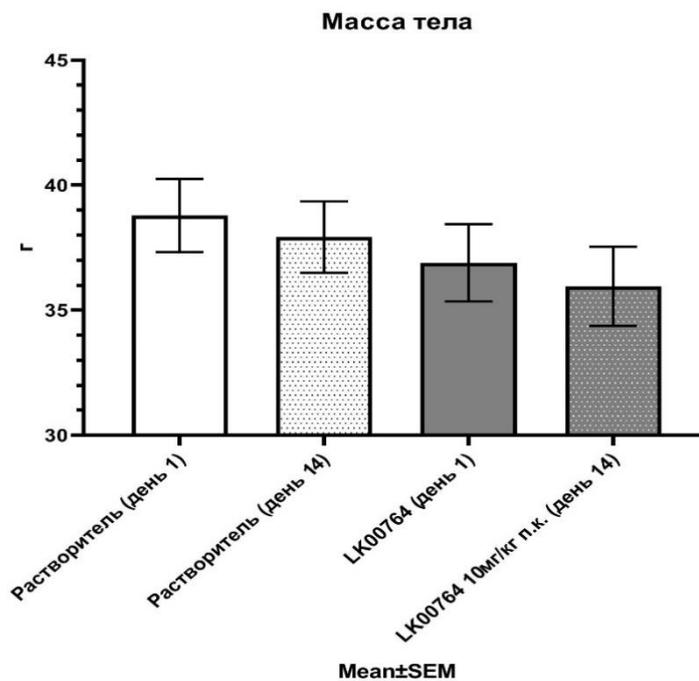
**Рисунок 29.** Частота груминга во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на частоту груминга, Unpaired t test,  $p=0.2235$ .



**Рисунок 30.** Частота подъёмов на задние лапы во время выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт». Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало значимого влияния на количество подъёмов на задние лапы, Unpaired t test,  $p=0.4778$ .



**Рисунок 31.** Время иммобилизации при выполнении теста вынужденного плавания. Субхроническое подкожное введение вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на время иммобилизации в тесте Порсолта, Unpaired t test,  $p > 0.05$ . На графике отображены Mean  $\pm$  S.E.M.



**Рисунок 32.** Масса тела на первый и четырнадцатый день эксперимента. Подкожное введение физиологического раствора, так же, как и подкожное введение LK00764 в дозе 10 мг/кг не оказывало статистически значимого влияния на массу тела животных, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$ .

По результатам проведённых экспериментов можно сделать вывод о наличии анксиолитического эффекта при субхроническом 14-дневном подкожном введении вещества LK00764 в дозе 10 мг/кг. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» выявлено статистически значимое повышение времени, проведённом в открытых лучах лабиринта, а также повышение количества свешиваний с открытых лучей; вдобавок оказалось сниженным время, проведённое в закрытых лучах установки, что отображено на рисунках 25,26 и 28.

При наличии анксиолитического эффекта не было выявлено угнетающего действия на двигательную и исследовательскую активность животных: не было влияния на пройденное расстояние в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», не зафиксировано изменений в вертикальной двигательной активности животных во время выполнения данных тестов, не снижалось количество исследованных отверстий, не было влияния на продолжительность и частоту груминга (рисунки 19-24, 27, 29 и 30).

Потенциальной антидепрессивной активности при субхроническом введении препарата LK00764 выявлено не было, о чём свидетельствует отсутствие значимых различий в продолжительности иммобилизации при выполнении теста вынужденного плавания (рисунок 31).

Также стоит отметить, что субхроническое подкожное введение LK00764 не оказывало значимого влияния на массу тела животных (рисунок 32), что может быть возможным предиктором отсутствия метаболических побочных эффектов при клиническом применении.

### **Исследование активности веществ AP161-AP164 на крысиной модели двигательной гиперактивности, вызванной нокаутом гена дофаминового транспортера (DAT)**

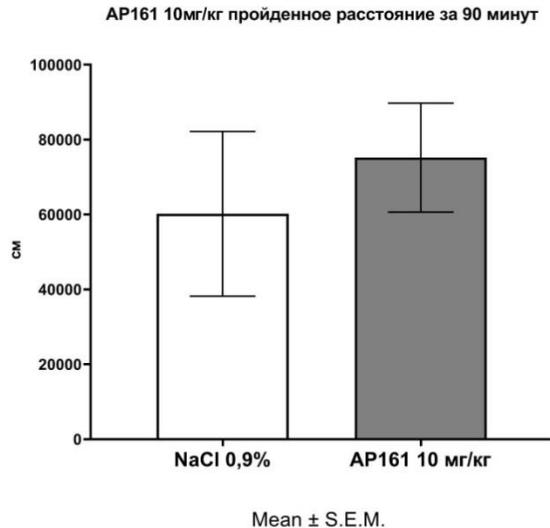
#### **Материалы и методы.**

12 взрослых самок крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера (DAT), были использованы для тестирования препаратов AP161, AP162, AP163 и AP164. Животные содержались в плексигласовых клетках по 3-4 головы. Вода и корм во время всего содержания были предоставлены животным в неограниченном количестве за исключением времени проведения тестов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

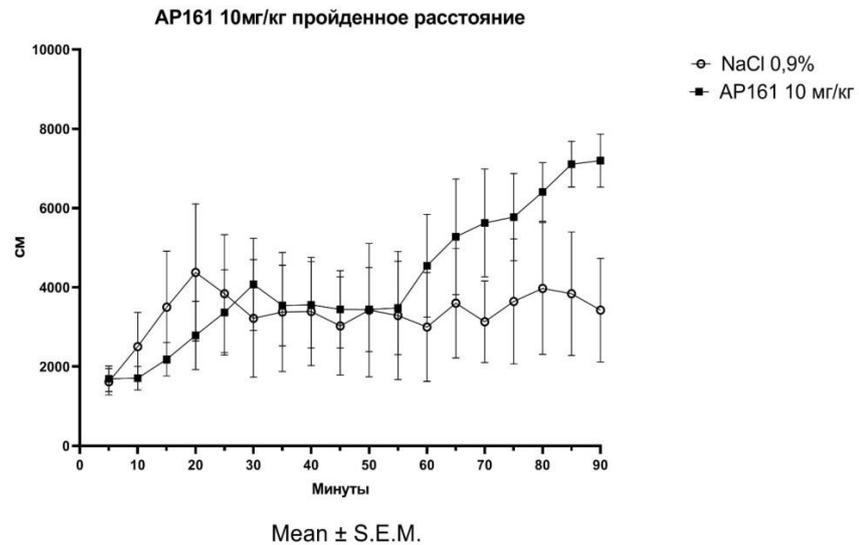
Все вещества непосредственно перед экспериментом были растворены в стерильном физиологическом растворе (NaCl 0,9%). Животные получали интраперитонеальные инъекции в объеме 1 мл/кг непосредственно перед посадкой в экспериментальную установку. Животные случайным образом перед экспериментом делились на группы (по 6 крыс), получавшие либо физиологический раствор, либо раствор одного из исследуемых соединений. Экспериментальные установки представляли из себя прозрачные плексигласовые боксы без подстила размером 40см\*40см\*40см. После инъекций животные помещались в боксы на 90 минут, сразу же включалась видеофиксация горизонтальной локомоторной активности программой Noldus EthoVision, при помощи которой измерялось пройденное за время эксперимента расстояние.

Статистическая обработка полученных данных производилась при помощи 2way ANOVA с последующим тестом Bonferroni для множественных сравнений, также использовался тест Mann-Whitney и Kruskal-Wallis. Статистически значимыми результаты считались при значениях  $p < 0,05$ . Обработка данных производилась с помощью статистического пакета GraphPad Prism.

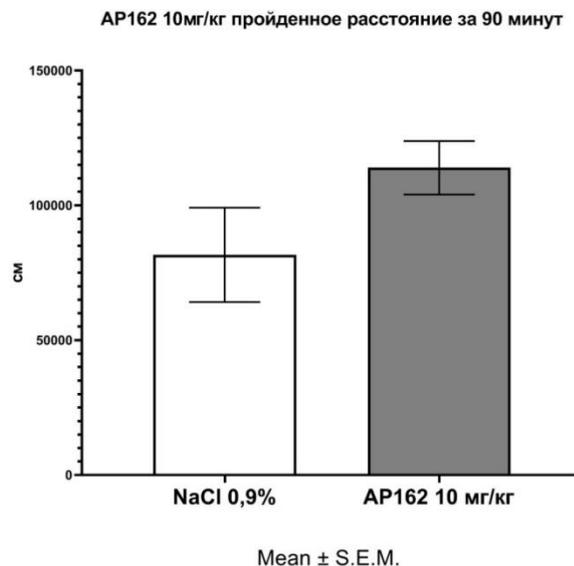
## Результаты.



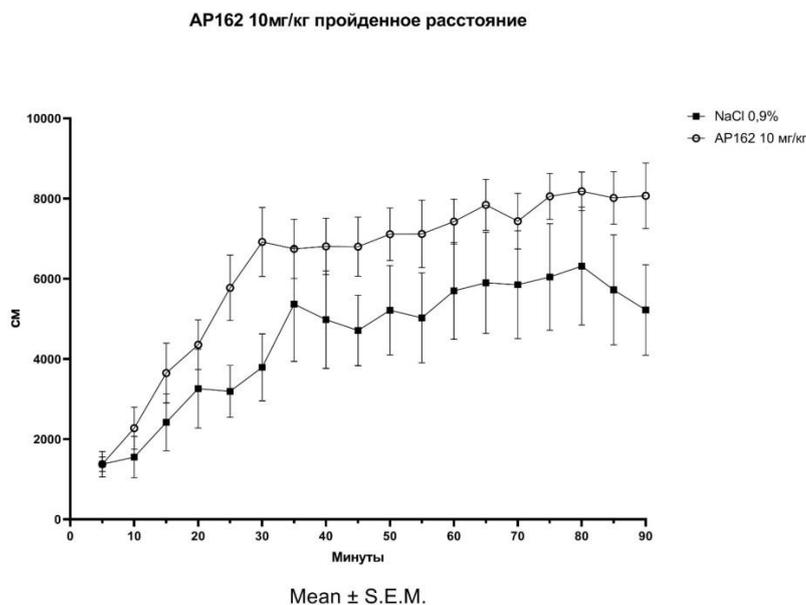
**Рисунок 33.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP161 в дозе 10 мг/кг. AP161 в дозе 10 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на двигательную активность DAT-нокаутов. Mann Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=12$ ).



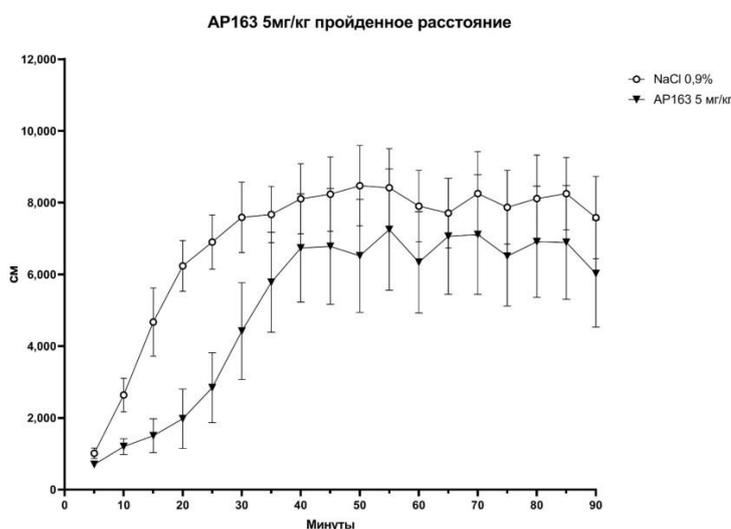
**Рисунок 34.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP161 в дозе 10 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. AP161 в дозе 10 мг/кг не продемонстрировал способности снижать двигательную активность DAT-нокаутных крыс на протяжении 90 минут после инъекции. Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$  для всех интервалов времени.



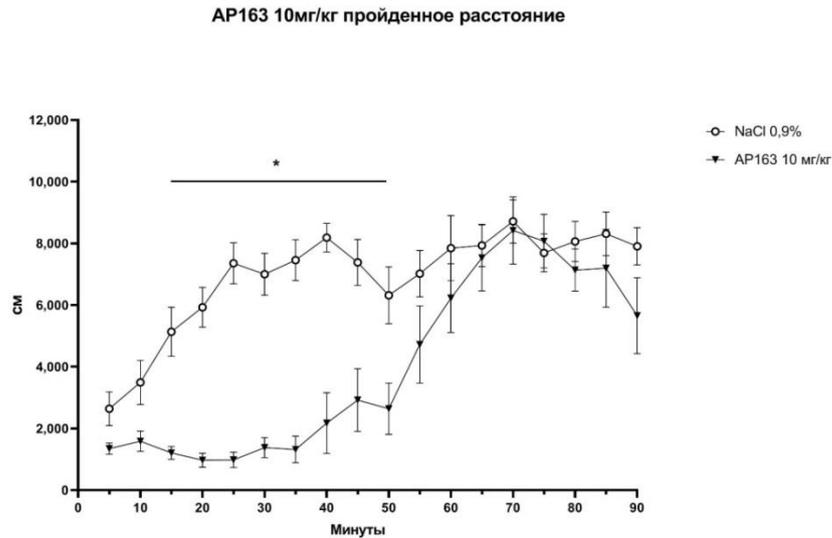
**Рисунок 35.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP162 в дозе 10 мг/кг. AP162 в дозе 10 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на двигательную активность DAT-нокаутов. Mann Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=10$ ).



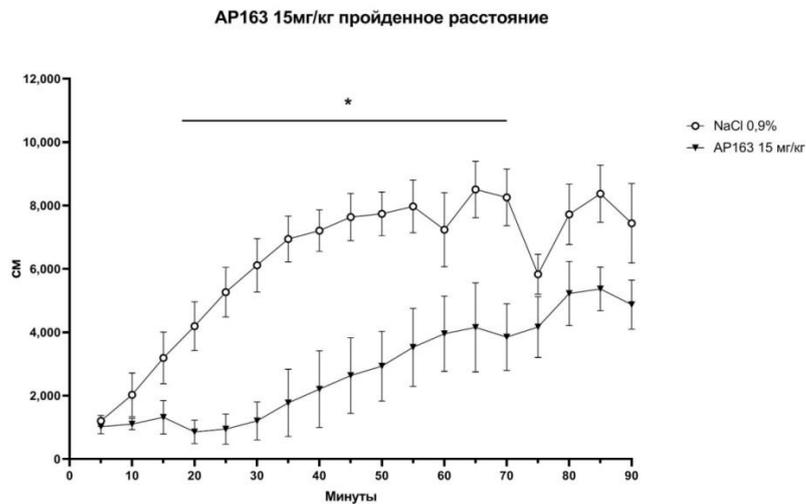
**Рисунок 36.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP162 в дозе 10 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. AP162 в дозе 10 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на двигательную активность DAT-нокаутов. Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$  для всех интервалов времени.



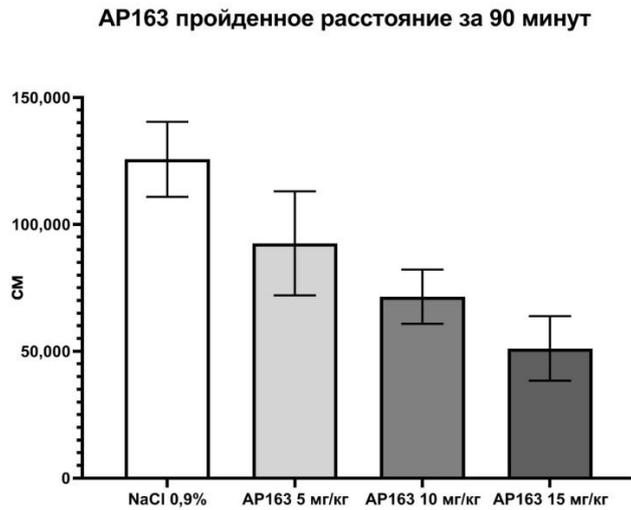
**Рисунок 37.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP163 в дозе 5 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. По результатам теста Bonferroni статистически значимых различий между группами на протяжении теста выявлено не было, хотя отмечалась тенденция к снижению двигательной активности с десятой по двадцатую минуты эксперимента. На графике отображены mean ± S.E.M.



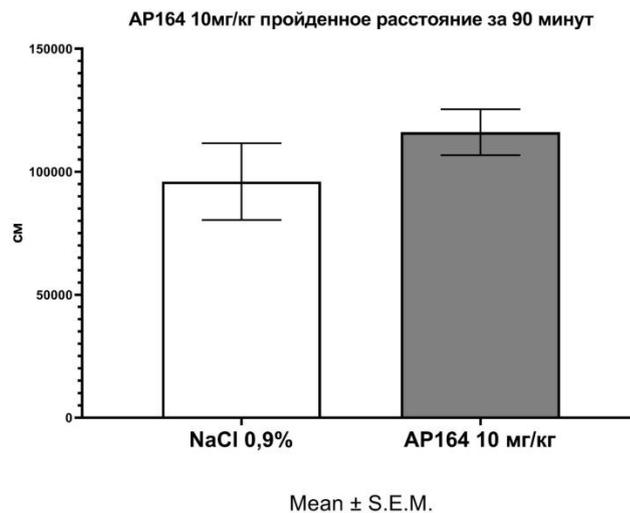
**Рисунок 38.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP163 в дозе 10 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. AP163 статистически снижал двигательную активность DAT-нокаутных крыс с десятой по пятидесятую минуты теста. Звёздочкой отмечены интервалы, где по результатам теста Bonferroni были выявлены статистически значимые различия между группами: значение  $p$  в указанном интервале 0.0001-0.0188. На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



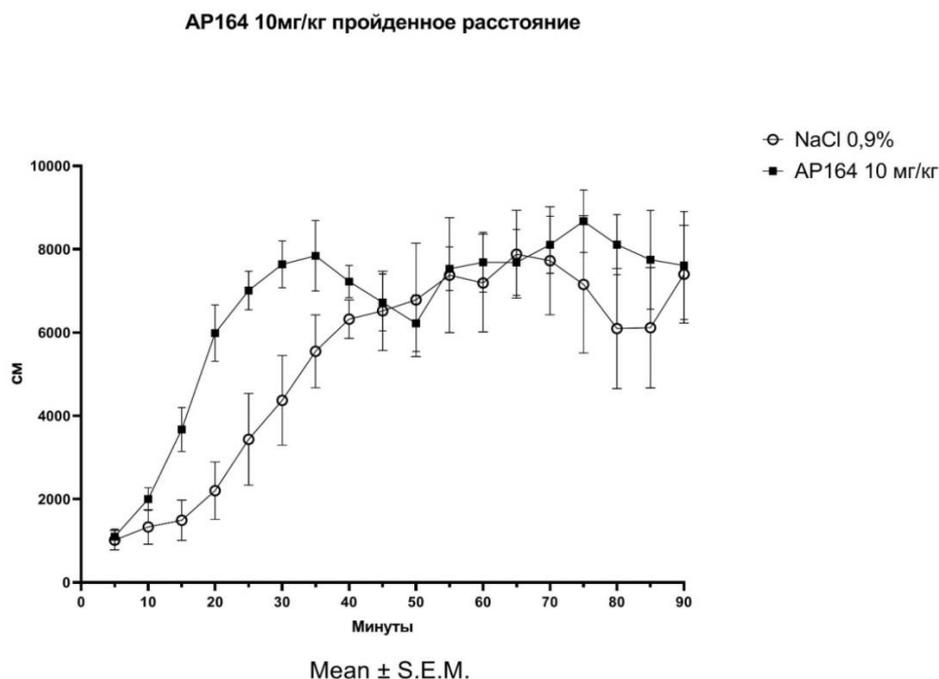
**Рисунок 39.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP163 в дозе 15 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. Звёздочкой отмечены интервалы, где по результатам теста Bonferroni были выявлены статистически значимые различия между группами: значение  $p$  в указанном интервале 0.0009-0.0113. На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



**Рисунок 40.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP163 в дозах 5-15 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. Вещество AP163 дозо-зависимо снижало горизонтальную двигательную активность DAT-нокаутных крыс;  $p=0.0417$  (Kruskal — Wallis test). На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



**Рисунок 41.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP164 в дозе 10 мг/кг. AP164 в дозе 10 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на двигательную активность DAT-нокаутов. Mann Whitney test,  $p>0.05$  ( $U=11$ ).



**Рисунок 42.** Пройденное DAT-нокаутами расстояние после интраперитонеальной инъекции вещества AP164 в дозе 10 мг/кг: развёртка по пятиминутным интервалам. AP164 в дозе 10 мг/кг не оказывал статистически значимого влияния на двигательную активность DAT-нокаутных крыс. Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.05$  для всех интервалов времени.

В результате данной серии экспериментов была выявлена способность вещества AP 163 дозозависимо снижать двигательную гиперактивность крыс, нокаутных по гену дофаминавого транспортера в диапазоне доз 5-15 мг/кг (рисунки 37-40). Потенциальное антипсихотическое действие вещества и другие возможные терапевтические применения подлежат дальнейшему изучению. Структура молекулы может быть использована для дальнейшей модификации и разработки более активных в отношении TAAR1 соединений.

У веществ AP 161, AP 162 и AP 164 в дозе 10 мг/кг не было выявлено способности снижать двигательную гиперактивность крыс, нокаутных по гену дофаминавого транспортера (рисунки 33-36 и 41-42), что предположительно может быть результатом плохого прохождения препаратов через гемато-энцефалический барьер либо фармакодинамических взаимодействий с другими возможными мишенями.

#### **4. Поведенческая характеристика мышей, мутантных по гену TAAR6**

Линия мышей с мутацией в гене TAAR6 была создана в Институте Трансляционной Биомедицины Санкт-Петербургского Государственного Университета Еленой Ивановной Леоновой. В ген была произведена вставка размером порядка 50 пар нуклеотидов, представляющая из себя по структуре многократный повтор последовательности (CAGAGG)<sub>n</sub>.

##### **Материалы и методы.**

Для выявления возможных отличий в поведении мышей, мутантных по гену TAAR6 было использовано 10 взрослых самцов линии C57Black/6j дикого типа и 11 мутантных по гену TAAR6 самцов того же помёта и возраста. Животные содержались по 3-5 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве за исключением времени проведения экспериментов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

Мыши были поделены на 2 экспериментальные группы по 10 и 11 самцов соответственно. С интервалом 1-3 дня выполнялись тесты «Открытое поле» – 5 минут, тест распознавания нового объекта (5+5 минут), тест копания – 3 минуты, тест закапывания шариков – 30 минут, тест социального взаимодействия, (5+5 минут) тест «Светлая-тёмная камера» - 3 минуты, «Приподнятый крестообразный лабиринт» – 5 минут, «Тест вынужденного плавания» – 10 минут. После серии экспериментов у животных забирались образцы различных структур мозга для последующей хроматографической оценки содержания основных нейромедиаторов и их метаболитов.

Круговой тест открытого поля использовали для анализа исследовательской активности. Аппарат состоял из серой пластиковой круглой арены (диаметр 63 см) с 13 отверстиями в полу (диаметр отверстий 1,6 см) и условиями освещения 200 лк. Каждую мышь помещали в центр арены и регистрировали спонтанную исследовательскую активность с помощью программного обеспечения для видеотрекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. Отслеживались следующие поведенческие параметры: общее пройденное расстояние, совокупная продолжительность пребывания в центральной зоне, количество подъёмов на задние лапы и

количество исследований норок. Для измерения уровня тревожного поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Лабиринт состоял из двух противоположных открытых (30 x 5 см) и двух противоположных закрытых рукавов (30 x 5 x 15 см), приподнятых на 40 см от пола. Мышей помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта к закрытому рукаву и регистрировали в течение 5 мин. Следующие параметры были проанализированы с помощью программного обеспечения Noldus Ethovision: совокупная продолжительность в открытых рукавах, частота входов в открытые рукава, общее пройденное расстояние, количество подъемов на задние лапы, количество свешиваний.

Тест «Тёмно-светлая камера» использовался для анализа тревожного поведения животных. Аппарат состоял из двух камер [20 см (Д) × 20 см (Ш) × 20 см (В)] каждая. Одна из камер была сильно освещена, а другая оставалась темной. Камеры были соединены проходом, который позволял мышам свободно перемещаться между камерами. Каждую мышь помещали в светлую часть аппарата в направлении от темной камеры и давали ей возможность исследовать аппарат в течение 3 минут. Регистрировались время задержки входа в темную камеру и время задержки возвращения в светлую камеру, а также общее время пребывания в светлой камере и количество входов в светлую камеру.

В тесте закапывания шариков каждую мышь помещали на 30 мин в плексигласовую клетку размера [35 см (Д) × 19 см (Ш) × 14 см (В)], заполненную 5 сантиметрами свежего подстила из опилок с пятью рядами по три шарика в каждом. Количество зарытых шариков подсчитывалось через 30 мин эксперимента. Зарытыми считались шарики при условии, если не менее двух третей их поверхности было покрыто подстилом. Для оценки депрессивноподобного поведения использовали тест вынужденного плавания. Каждую мышь отдельно помещали в цилиндр из плексигласа (диаметр: 10 см, высота: 21 см), заполненный водой на 2/3. Температура воды находилась в пределах  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Тест проводился в течение 10 мин. Уровень воды был достаточно глубоким (18 см), чтобы хвост мыши не касался дна. После купания мышей вынимали из воды, вытирали насухо полотенцем, возвращали в их домашнюю клетку и оставляли в теплом помещении. Оценивали суммарное время иммобилизации, активного и пассивного плавания.

Термометрия после инъекции 8-OH-DPAT. Для экспериментов использовали самцов ТААР6-мутантных мышей (n=9) и мышей дикого типа (WT) (n=10). Мыши получали пищу и воду в неограниченном количестве и содержались в стандартных лабораторных условиях при 12-часовом цикле свет/темнота. За час до начала поведенческих экспериментов мышей

приучали к экспериментальной комнате. ( $\pm$ )-8-ОН-DPAT гидробромид (( $\pm$ )-2-Dipropylamino-8-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, Sigma-Aldrich) растворяли в физиологическом растворе. Все инъекции проводились в объеме 10 мл/кг. Мыши были разделены на 4 группы: мыши WT - физраствор; мыши WT - 5 мг/кг раствора 8-ОН-DPAT; мыши TAAR6-мутанты - физраствор; мыши TAAR6-мутанты - 5 мг/кг раствора 8-ОН-DPAT. Во время проведения экспериментов исследователь был ослеплен. Эксперименты проводились в следующем порядке: первое измерение ректальной температуры, внутривенное введение 8-ОН-DPAT, второе измерение ректальной температуры через 30 минут. Разница температур вычислялась путем вычитания результата первого измерения из результата второго измерения в каждой группе.

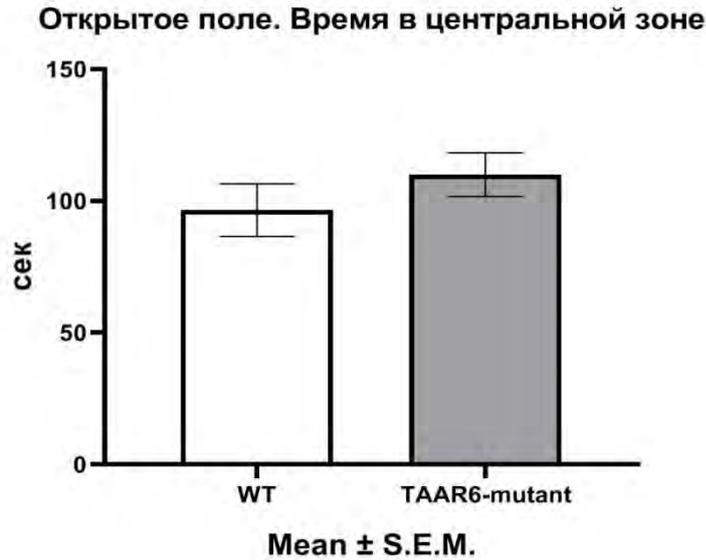
Для обработки полученных данных был использован тест Манна-Уитни. Статистически значимыми различия признавались при значениях  $p < 0.05$ . Статистическая обработка данных производилась при помощи статистического пакета GraphPad Prism.

## Результаты.

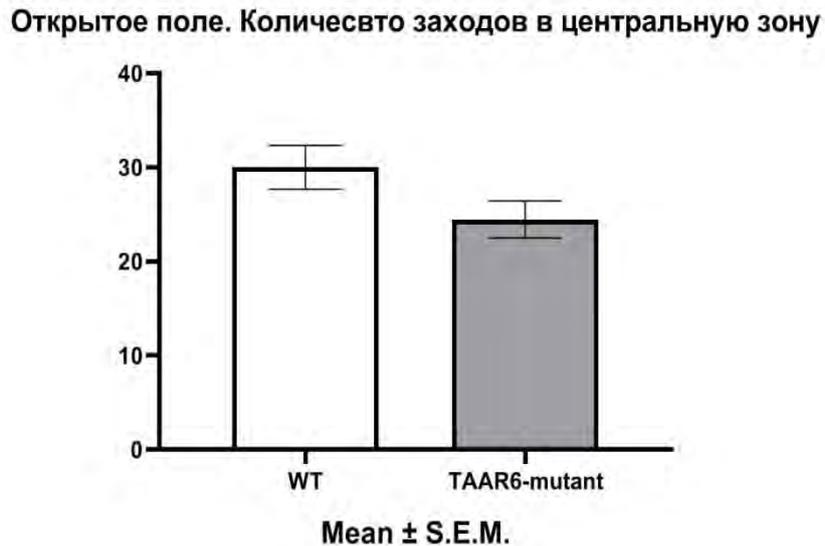
### Открытое поле.



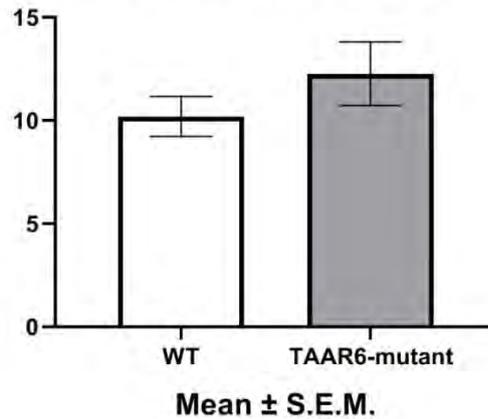
**Рисунок 43.** Пройденная мышами дистанция за время выполнения теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши не отличались по пройденной в открытом поле дистанции от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=41$ ). На графике отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$



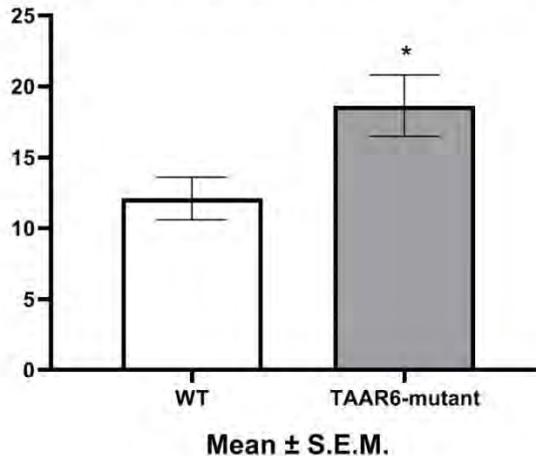
**Рисунок 44.** Время, проведённое мышами в центральной зоне при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши не отличались по проведённому в центральной зоне времени от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=39$ ).



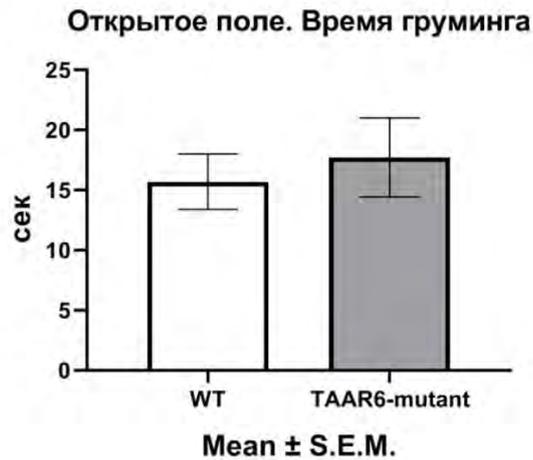
**Рисунок 45.** Количество заходов в центральную зону при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши не отличались по количеству заходов в центральную зону «Открытого поля» от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=32$ ).

**Открытое поле. Количество исследованных отверстий**

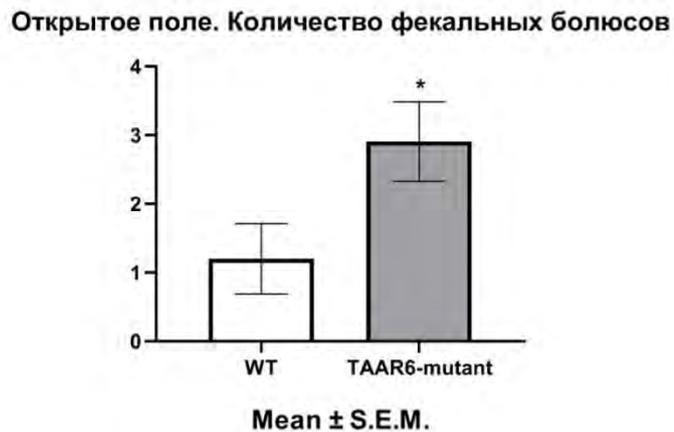
**Рисунок 46.** Количество исследованных отверстий при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши не отличались по количеству исследованных отверстий «Открытого поля» от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 41$ ).

**Открытое поле. Количество подъёмов на задние лапы**

**Рисунок 47.** Количество подъёмов на задние лапы при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши чаще поднимались на задние лапы по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p = 0.0475$  ( $U = 27$ ).



**Рисунок 48.** Продолжительность груминга при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши не отличались по продолжительности груминга во время выполнения теста «Открытое поле» от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 47$ ).



**Рисунок 49.** Количество фекальных болюсов при выполнении теста «Открытое поле». TAAR6-мутантные мыши оставляли больше фекальных болюсов по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p = 0.0267$  ( $U = 25$ ).

В тесте «Открытое поле» было выявлено повышенное количество подъёмов на задние лапы у мышей, мутантных по гену TAAR6, что показано на рисунке 47. Этот показатель интерпретируется исследователями как проявление исследовательской активности животных [146]. В то же время группы животных не отличались по другому параметру исследовательского поведения – количеству обследованных отверстий, что отображено на рисунке 46. Время нахождения в центральной зоне и количество заходов в неё, продолжительность груминга и пройденная дистанция не отличалась между группами (рисунки

43, 44, 45 и 48). Количество фекальных болюсов было повышено у TAAR6-мутантных мышей по сравнению с контрольной группой, что отображено на рисунке 49.

### Тест копания



**Рисунок 50.** Продолжительность копания в тесте копания. TAAR6-мутантные мыши не отличались по продолжительности копания от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=47$ ).

На рисунке 50 показано отсутствие отличий между группами по продолжительности копания во время соответствующего теста.

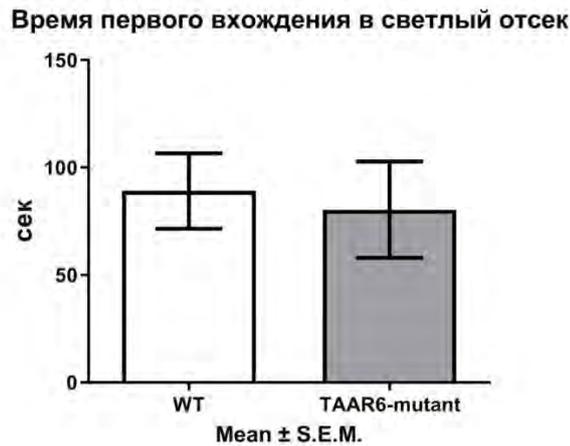
### Тест закапывания шариков



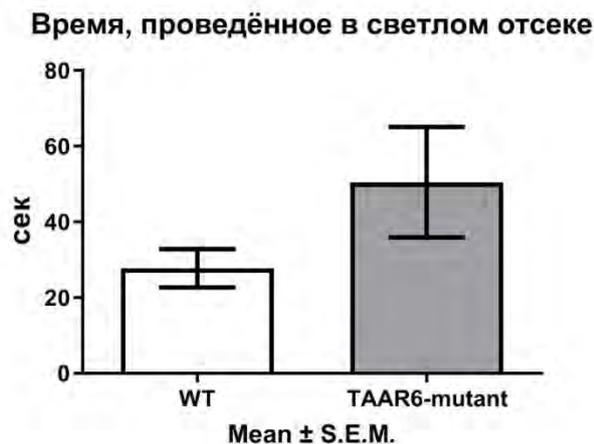
**Рисунок 51.** Количество закопанных шариков. TAAR6-мутантные мыши закапывали больше шариков по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p=0.0141$  ( $U=21.5$ ).

В тесте закапывания шариков TAAR6-мутантные животные закапывали больше шариков по сравнению с контрольной группой, что отображено на рисунке 51. Данный показатель зачастую интерпретируется как проявление тревожного или компульсивного поведения животных, однако существуют и альтернативные мнения по интерпретации результатов теста [147].

### Тест «Светло-тёмная камера»

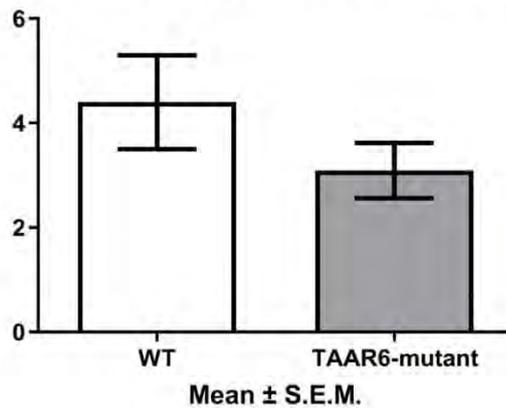


**Рисунок 52.** Время первого вхождения в светлый отсек в тесте «Светло-тёмная камера». TAAR6-мутантные мыши не отличались времени вхождения в светлый отсек от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=41$ ).



**Рисунок 53.** Время, проведённое в светлом отсеке в тесте «Светло-тёмная камера». TAAR6-мутантные мыши не отличались по времени, проведённому в светлом отсеке от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=32$ ).

### Количество выглядываний из тёмного отсека

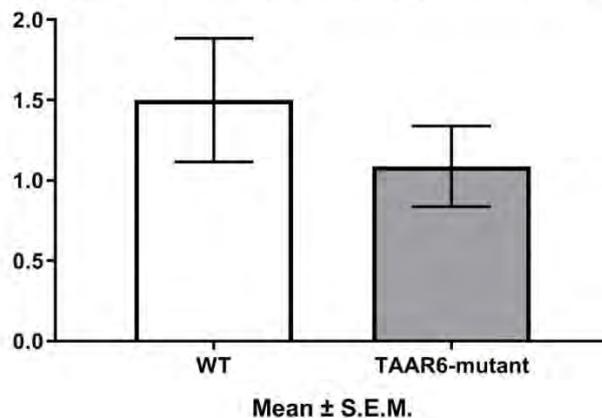


**Рисунок 54.** Количество выглядываний из тёмного отсека в тесте «Светло-тёмная камера». TAAR6-мутантные мыши не отличались количеством выглядываний из тёмного отсека от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 40.5$ ).

Ни один из измеренных показателей в тесте «Светло-тёмная камера» не был изменён у TAAR6-мутантных мышей, что показано на рисунках 52-54.

### T-образный лабиринт

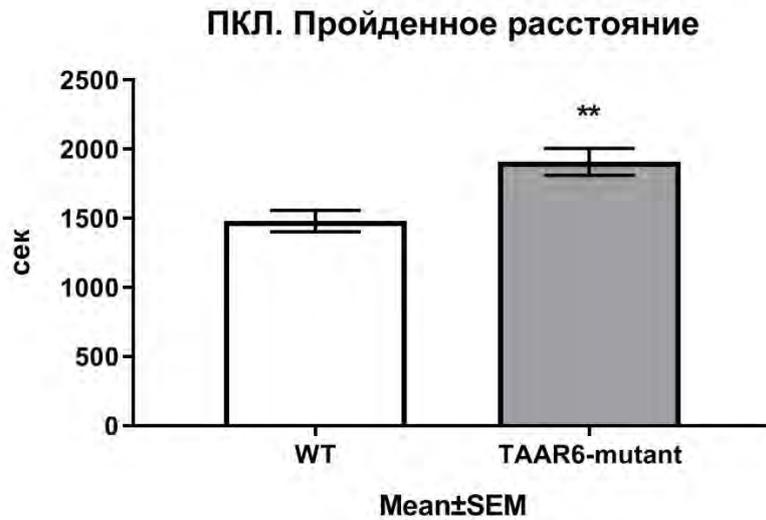
#### T-maze. Соотношение времени в незнакомых/знакомых рукавах



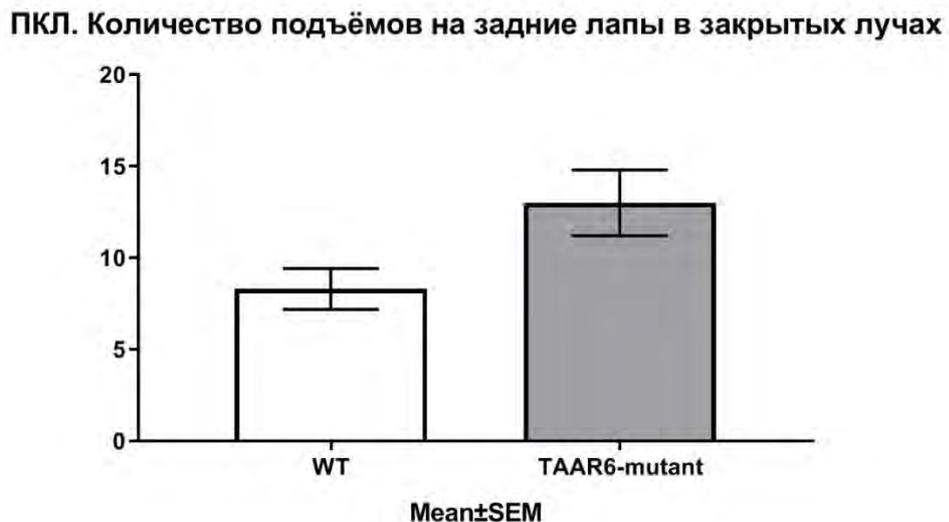
**Рисунок 55.** Соотношение времени, проведённого в незнакомых рукавах T-образного лабиринта ко времени, проведённому в знакомых рукавах лабиринта. TAAR6-мутантные мыши не отличались по данному параметру от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 43$ ).

В тесте на кратковременную память между группами животных не было выявлено различий, что отображено на рисунке X.

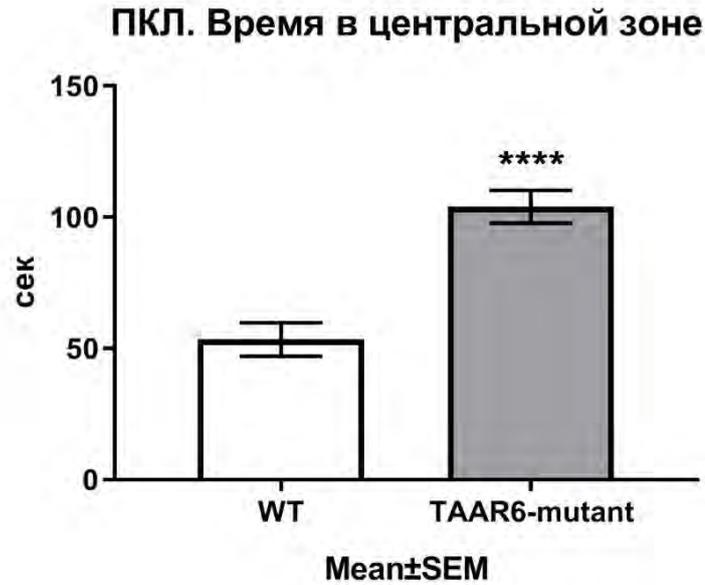
## Приподнятый крестообразный лабиринт



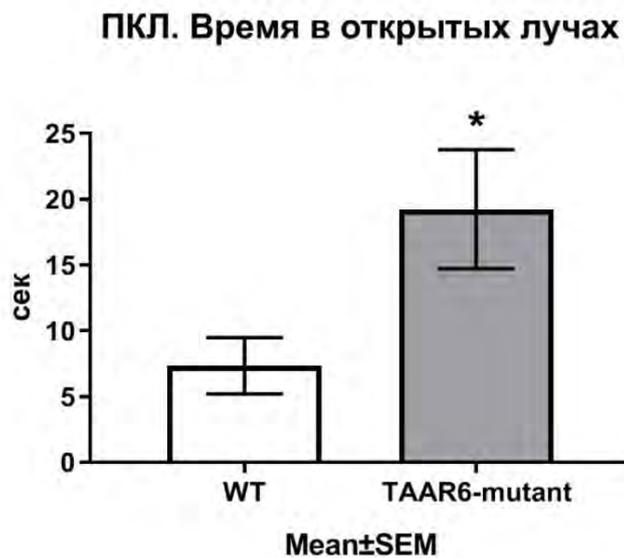
**Рисунок 56.** Пройденное мышами расстояние за время выполнения теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR6-мутантные мыши прошли большее расстояние по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p=0.0028$  ( $U=14$ ).



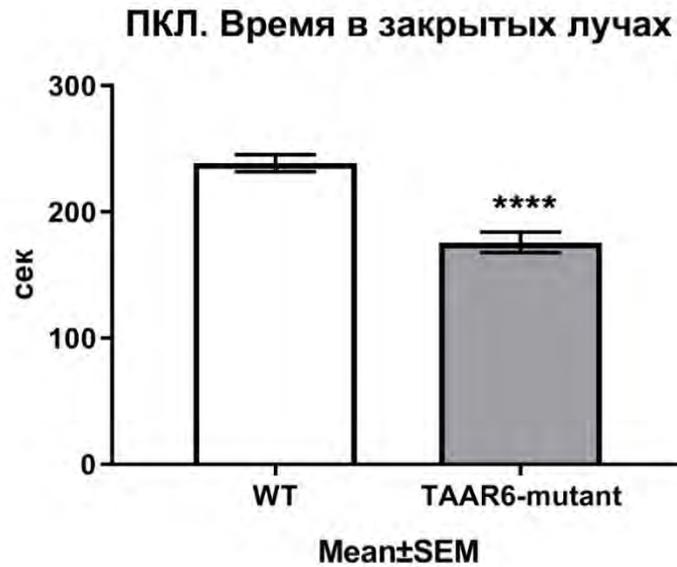
**Рисунок 57.** Количество подъёмов на задние лапы в закрытых лучах при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Статистически значимых отличий по количеству подъёмов на задние лапы выявлено не было, хотя имелась тенденция к повышению этого показателя у TAAR6-мутантных мышей, Mann-Whitney test,  $p=0.0847$  ( $U=30.5$ ).



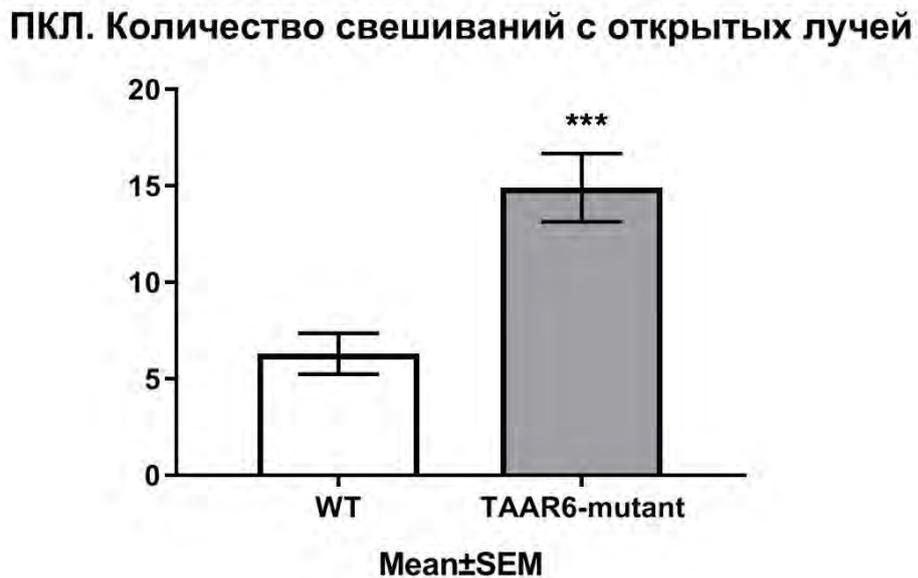
**Рисунок 58.** Время, проведённое мышами в центральной зоне при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR6-мутантные мыши проводили больше времени в центральной зоне по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$  ( $U=3$ ).



**Рисунок 59.** Время, проведённое мышами в открытых лучах «Приподнятого крестообразного лабиринта». TAAR6-мутантные мыши проводили больше времени в открытых лучах лабиринта по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p = 0.0166$  ( $U=21.5$ ).



**Рисунок 60.** Время, проведённое мышами в закрытых лучах «Приподнятого крестообразного лабиринта». TAAR6-мутантные мыши проводили меньше времени в закрытых лучах лабиринта по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$  ( $U=3$ ).



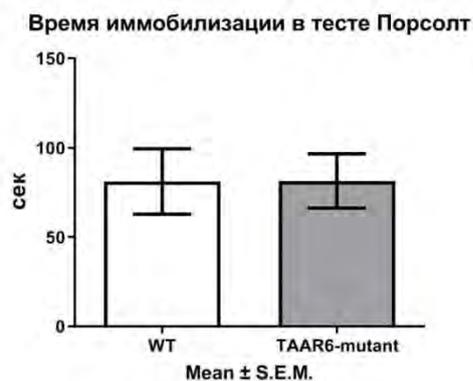
**Рисунок 61.** Количество свешиваний с открытых лучей «Приподнятого крестообразного лабиринта». TAAR6-мутантные мыши свешивались чаще по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p=0.0003$  ( $U=7.5$ ).



**Рисунок 62.** Продолжительность груминга во время выполнения теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR6-мутантные мыши не отличались по продолжительности груминга от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=54$ ).

По таким показателям как время, проведённое в открытых лучах и центральной зоне приподнятого крестообразного лабиринта, а также по количеству свешиваний с открытых лучей, мыши, мутантные по гену TAAR6, превосходили мышей дикого типа (рисунки 58, 59 и 61). Соответственно, у мутантов была снижена продолжительность пребывания в закрытых лучах (рисунок 60). Интересно, что пройденное расстояние у TAAR6-мутантов повышалось, что, возможно, является показателем повышения исследовательской активности (рисунок X). По таким показателям, как количество подъёмов на задние лапы и продолжительность груминга отличий между группами выявлено не было, что отображено на рисунках 57 и 62.

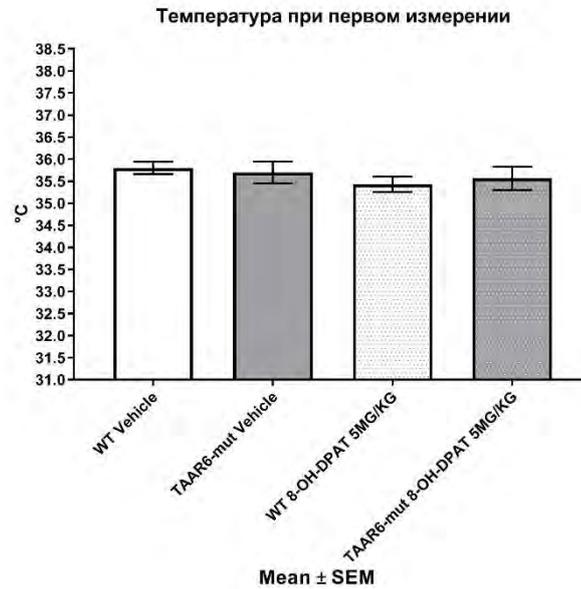
#### Тест вынужденного плавания



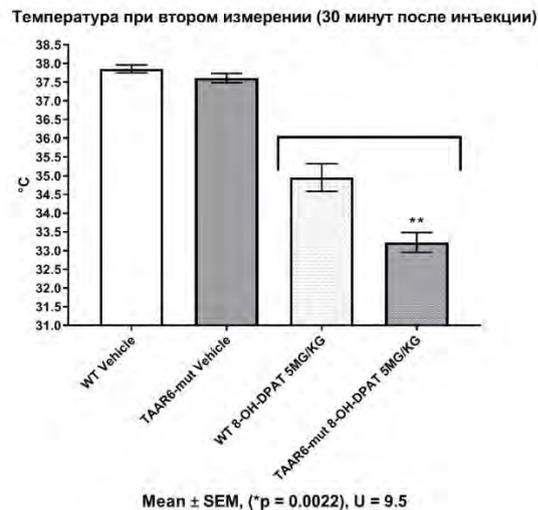
**Рисунок 63.** Время иммобилизации в тесте вынужденного плавания. TAAR6-мутантные мыши не отличались по времени иммобилизации в тесте Порсолта от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=53$ ).

По результатам теста Порсолта между группами животных не было выявлено различий в продолжительности иммобилизации (рисунок 63).

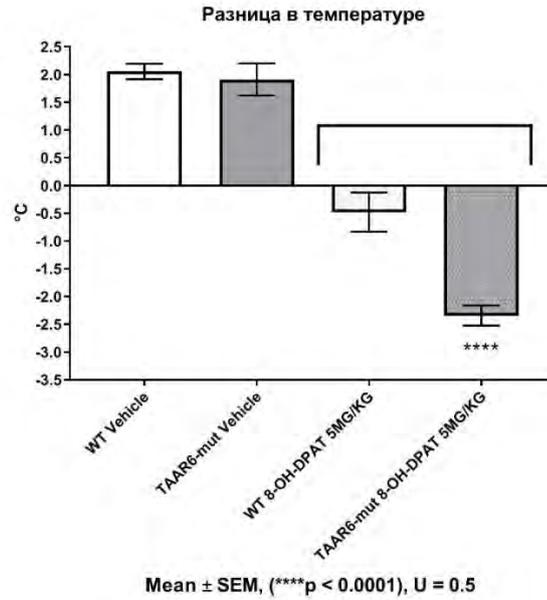
### Термометрия после инъекции 8-ОН-DPAT



**Рисунок 64.** Температура до инъекции. Все группы не отличались друг от друга по первоначальной температуре, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p > 0.9999$  для всех возможных сравнений.



**Рисунок 65.** Температура через 30 минут после инъекции. TAAR6-мутантные имели меньшую температуру после инъекции 8-ОН-DPAT по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p = 0.0022$  ( $U = 9.5$ ).



**Рисунок 66.** Разница с первоначальной температурой через 30 минут после инъекции. TAAR6-мутантные мыши сильнее снижали температуру после инъекции 8-ОН-DPAT по сравнению с мышами дикого типа, Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$  ( $U = 0.5$ ).

В результате исследования гипотермического воздействия агониста 5HT<sub>1A</sub> рецепторов 8-ОН-DPAT было выявлено усиление гипотермического эффекта препарата у мутантных по гену TAAR6 мышей (Рисунки 64-66). При этом само повышение температуры (так называемая стресс-индуцированная гипертермия) не отличалась между диким типом и нокаутами. Базальная температура при первоначальном измерении так же не отличалась между группами.

## 5. Оценка содержания моноаминов в структурах мозга TAAR6-мутантных мышей

### Материалы и методы.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию выполняли для исследования содержания серотонина, норадреналина, дофамина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты в различных структурах головного мозга. Для забора образцов мышам проводили цервикальную дислокацию, декапитацию, затем на льду в короткое время препарировали лобную кору, стриатум, гипоталамус и гиппокамп. Образцы немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Образцы для анализа гомогенизировали в 0,1 М  $\text{HClO}_4$ , центрифугировали (10 мин,  $+4^{\circ}\text{C}$ ; 14 000 g) и промывали с использованием центрифужных флотаторов (мембрана PVDF, размер пор 0,22 мкм, Millipore). Измерение содержания моноаминов в образцах тканей проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Eicom, HTEC-500, Япония) с угольным электродом WE-3G (Eicom, Япония) при приложенном потенциале +650 мВ. Система была оснащена обращенно-фазовой колонкой SA-50DS (150 × 2,1 мм, Eicom, Япония) со скоростью потока 200 мкл/мин. Подвижная фаза содержала 100 мМ натрий-фосфатного буфера, 0,17 мМ ЭДТА, 1,8 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты и 18% (об/об) метанола, pH 4,5. Все полученные пики нормировались на внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин, а конечные значения уровней моноаминов и метаболитов выражались в нанogramмах на миллиграмм веса влажной ткани. Статистическая обработка данных производилась при помощи теста Манна-Уитни в GraphPad Prism, значимыми отличия считались при значениях  $p < 0.05$ . Для данного исследования было использовано 11 взрослых мышей линии C57Black/6j дикого типа и 14 мутантных по гену TAAR6 мышей того же помёта и возраста. Животные содержались по 3-5 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве, световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, забор образцов мозга происходил во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%. Забор образцов головного мозга и хроматографический анализ содержания моноаминов и их метаболитов выполнялся совместно со с.н.с., к.б.н. Евгенией Викторовной Ефимовой и м.н.с лаборатории Михаэлем Мором.

## Результаты.

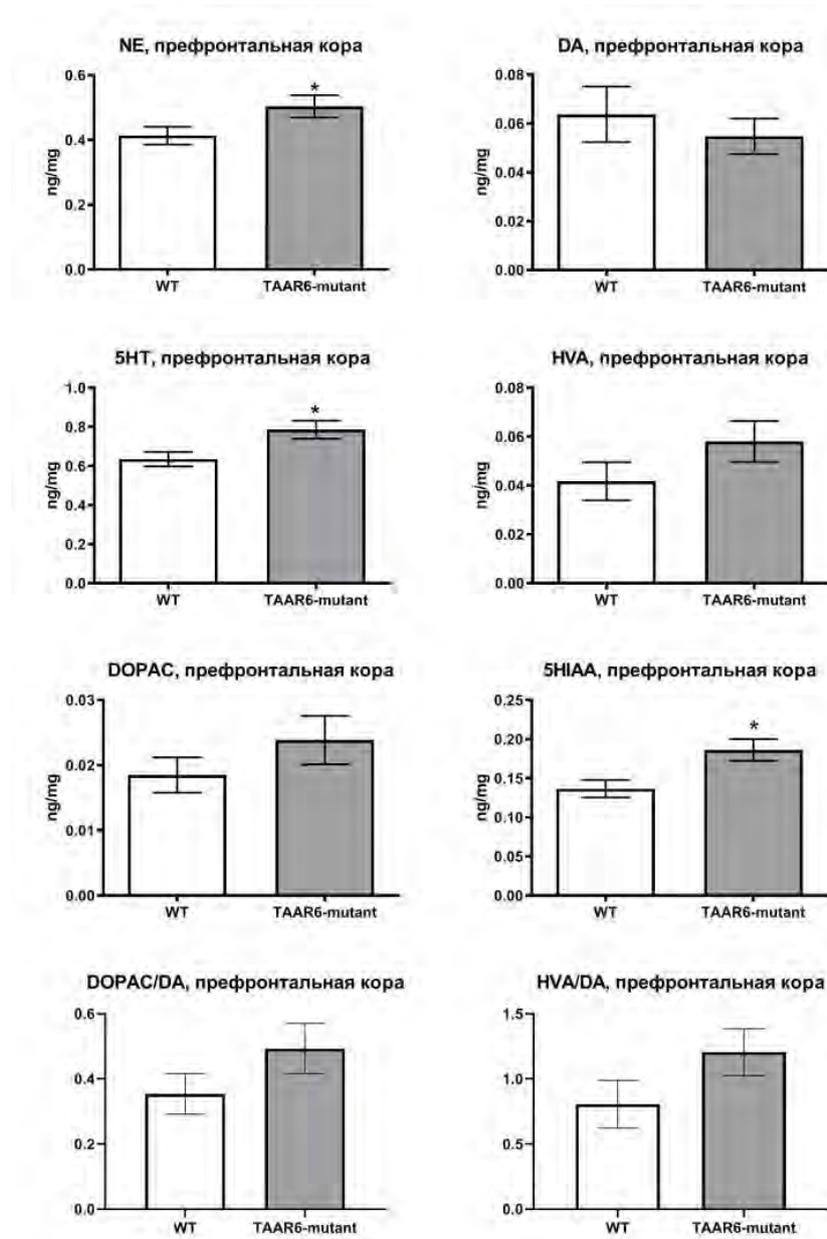


Рисунок 67. Содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре TAAR6-мутантных животных и животных дикого типа. Дикий тип, n=11; TAAR6-мут., n=13. На графиках отображены mean  $\pm$  S.E.M.

При анализе выявлено повышение содержания норэпинефрина ( $U=37$ ,  $p=0.0474$ ), серотонина ( $U=33$ ,  $p=0.0257$ ), а также 5-гидроксииндолуксусной кислоты ( $U=33$ ,  $p=0,0257$ ) в префронтальной коре животных, мутантных по гену TAAR6, по сравнению с животными дикого типа. Статистически значимых различий по остальным измеренным показателям зафиксировано не было ( $p>0.05$ ). Графики отображены на рисунке 67.

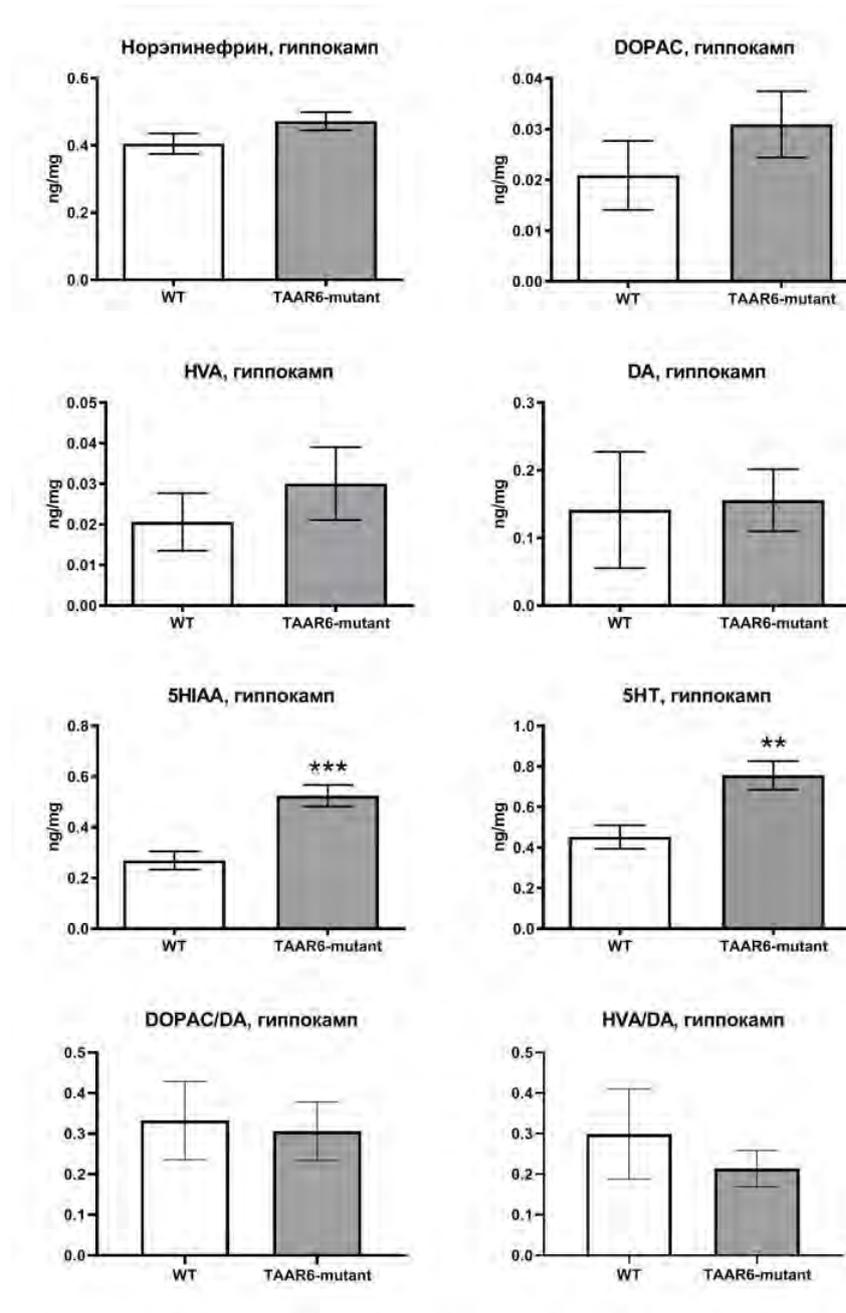


Рисунок 68. Содержание моноаминов и их метаболитов в гиппокампе TAAR6-мутантных животных и животных дикого типа. Дикий тип,  $n=7$ ; TAAR6-мут.,  $n=9$ . На графиках отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

При анализе выявлено повышение содержания серотонина ( $U=7$ ,  $p=0.0079$ ) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты ( $U=1$ ,  $p=0,0003$ ) в гиппокампе животных, мутантных по гену TAAR6, по сравнению с животными дикого типа. Статистически значимых различий по остальным измеренным показателям зафиксировано не было ( $p>0.05$ ). Результаты отображены на рисунке 68.

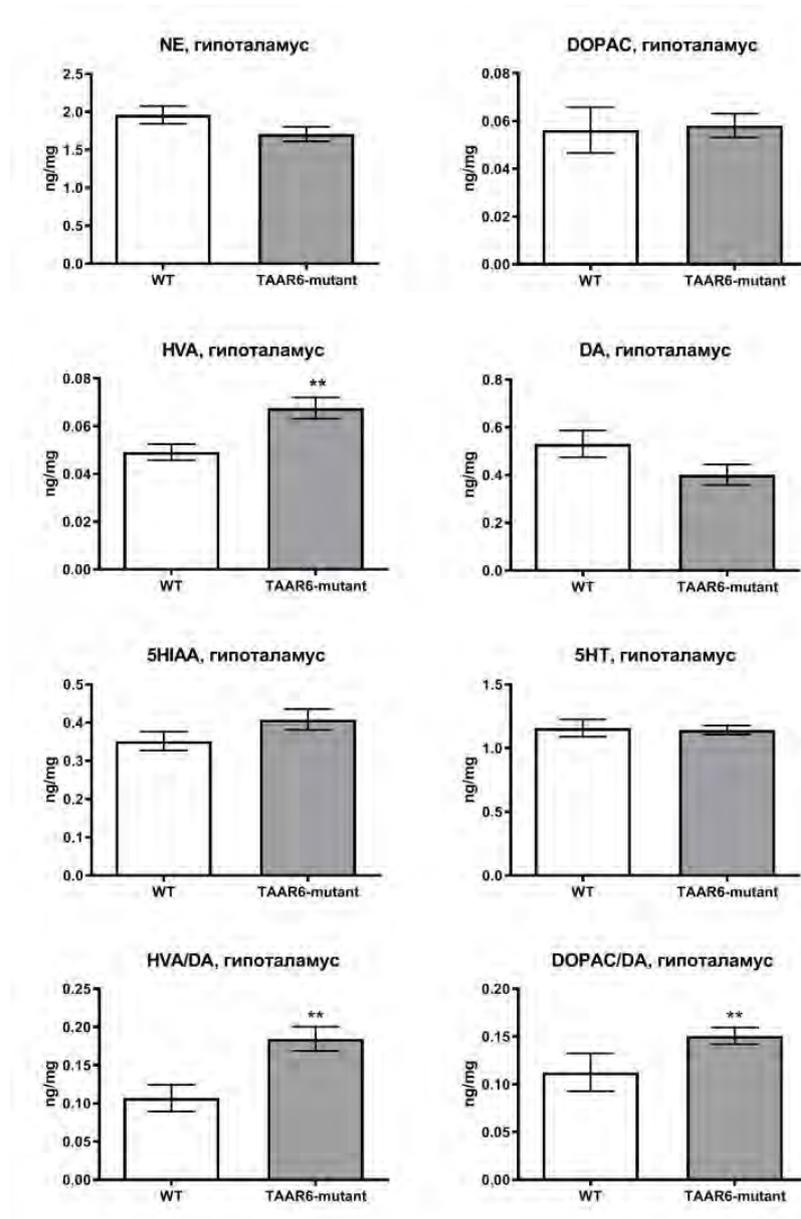


Рисунок 69. Содержание моноаминов и их метаболитов в гипоталамусе TAAR6-мутантных животных и животных дикого типа. Дикий тип, n=11; TAAR6-мут., n=14. На графиках отображены mean  $\pm$  S.E.M.

При анализе выявлено повышение содержания гомованилиновой кислоты (U=24, p=0.0028). Также оказались повышены соотношения гомованилиновой кислоты к дофамину (U=21, p=0.0014) и 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты к дофамину (U=25, p=0,0034) в гипоталамусе животных, мутантных по гену TAAR6, по сравнению с животными дикого типа. Статистически значимых различий по остальным измеренным показателям зафиксировано не было (p>0.05). Графики с результатами анализа отображены на рисунке 69.

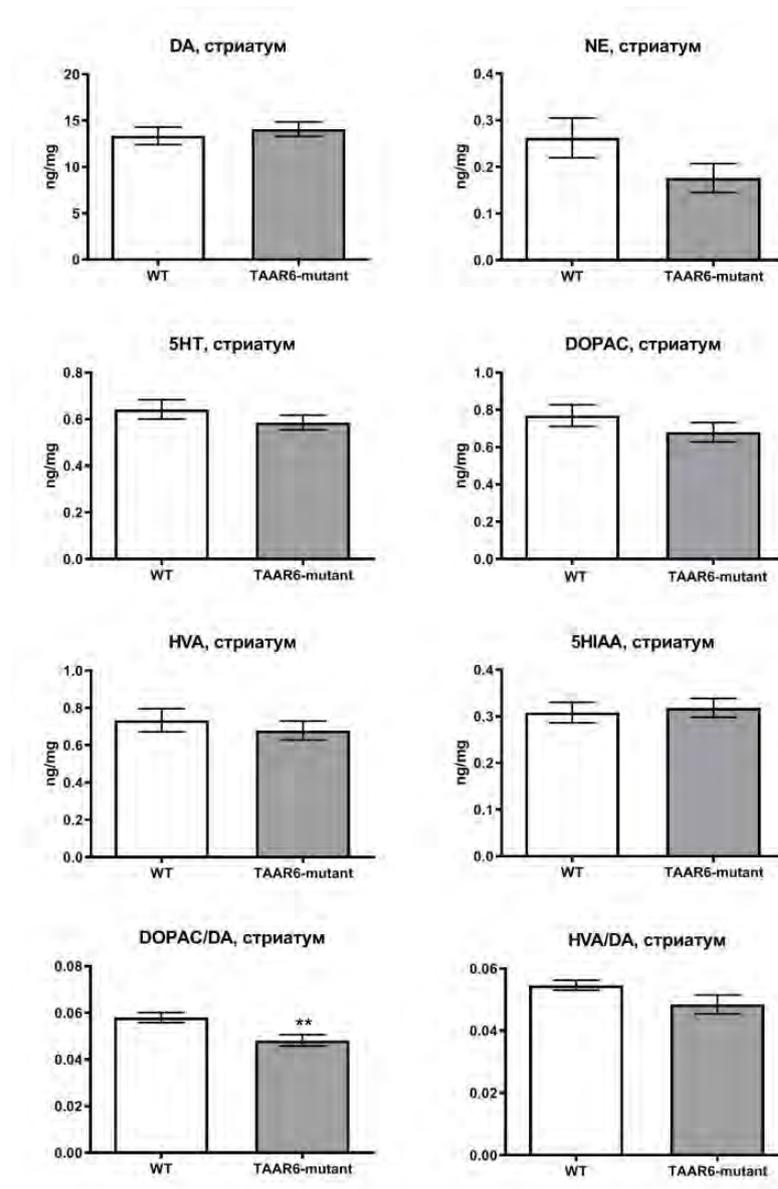
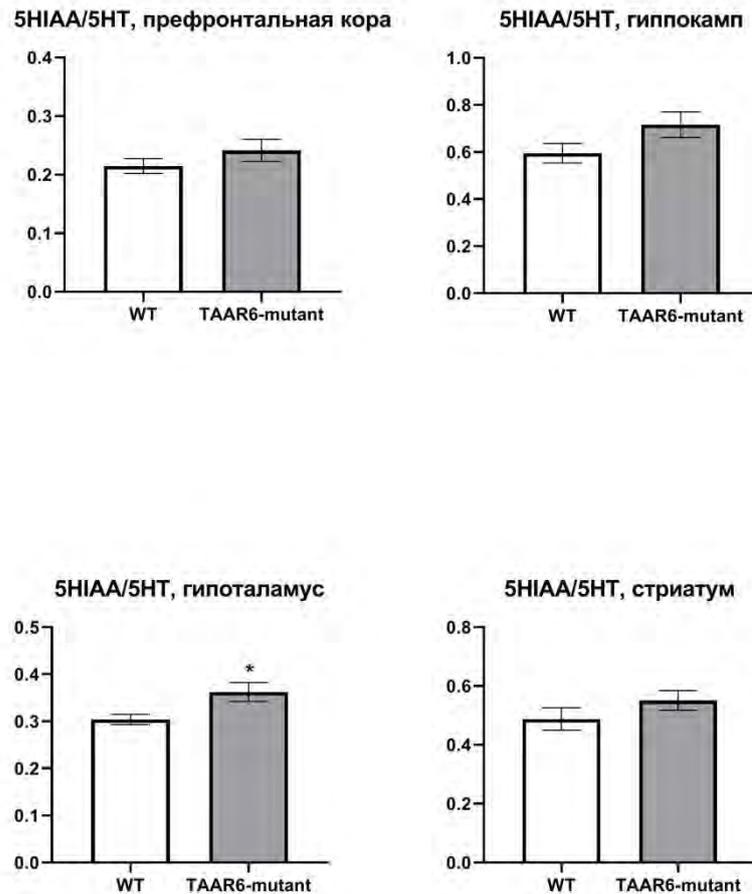


Рисунок 70. Содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме TAAR6-мутантных животных и животных дикого типа. Дикий тип,  $n=9$ ; TAAR6-мут.,  $n=8$ . На графиках отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

При анализе выявлено снижение соотношения 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты к дофамину ( $U=23$ ,  $p=0,0039$ ) в стриатуме животных, мутантных по гену TAAR6, по сравнению с животными дикого типа. Отмечалась также тенденция к снижению гомованилиновой кислоты к дофамину ( $U=41$ ,  $p=0,0821$ ). Статистически значимых различий по остальным измеренным показателям зафиксировано не было ( $p>0,05$ ). Результаты отображены на рисунке 70.



**Рисунок 71.** Соотношение 5-гидроксииндолуксусной кислоты к серотонину в каждой из изученных структур. В гипоталамусе мутантных по гену TAAR6 животных повышено соотношение 5-гидроксииндолуксусной кислоты к серотонину ( $U=29$ ,  $p=0,0246$ ). На графиках отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

При анализе соотношения 5-гидроксииндолуксусной кислоты к серотонину было выявлено повышение данного показателя в гипоталамусе мышей, мутантных по гену TAAR6. В остальных изученных структурах не было выявлено различий по соотношению 5HIAA/HT между группами. Графики отображены на рисунке 71.

## 6. Поведенческая характеристика мышей, нокаутных по гену TAAR2

### Материалы и методы.

Для выявления возможных отличий в поведении мышей, мутантных по гену TAAR2, было использовано 10 взрослых самцов линии C57Black/6n дикого типа и 11 мутантных по гену TAAR2 самцов того же помёта и возраста. Животные содержались по 3-5 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве за исключением времени проведения экспериментов. Световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, при этом эксперименты выполнялись во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%.

Мыши были поделены на 2 экспериментальные группы по 10 и 11 самцов соответственно. С интервалом 1-3 дня выполнялись тесты «Открытое поле» – 5 минут, тест распознавания нового объекта (5+5 минут), тест копания – 3 минуты, тест закапывания шариков – 30 минут, тест социального взаимодействия, (5+5 минут) тест «Светлая-тёмная камера» - 3 минуты, «Приподнятый крестообразный лабиринт» – 5 минут, «Тест вынужденного плавания» – 10 минут. После серии экспериментов у животных забирались образцы различных структур мозга для последующей хроматографической оценки содержания основных нейромедиаторов и их метаболитов.

Круговой тест открытого поля использовали для анализа исследовательской активности. Аппарат состоял из серой пластиковой круглой арены (диаметр 63 см) с 13 отверстиями в полу (диаметр отверстий 1,6 см) и условиями освещения 200 лк. Каждую мышь помещали в центр арены и регистрировали спонтанную исследовательскую активность с помощью программного обеспечения для видеотрекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. Отслеживались следующие поведенческие параметры: общее пройденное расстояние, совокупная продолжительность пребывания в центральной зоне, количество подъёмов на задние лапы и количество исследований норок. Для измерения уровня тревожного поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Лабиринт состоял из двух противоположных открытых (30 x 5 см) и двух противоположных закрытых рукавов (30 x 5 x 15 см), приподнятых на 40 см от пола. Мышей помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта к закрытому рукаву и регистрировали в течение 5 мин. Следующие параметры были проанализированы с помощью программного обеспечения Noldus Ethovision: совокупная

продолжительность в открытых рукавах, частота входов в открытые рукава, общее пройденное расстояние, количество подъёмов на задние лапы, количество свешиваний.

Тест на социальное взаимодействие использовался для количественной оценки социального поведения мышей, проявляемого по отношению к содержащемуся в группе незнакомому самцу той же линии, возраста и веса. Экспериментальная установка представляла собой ящик из оргстекла [35 см (Д) × 48 см (Ш) × 19 см (В)], разделенный на две части белой перегородкой с небольшим проходом, достаточным для свободного перемещения мыши между двумя частями установки. В каждую часть помещалась небольшая перфорированная клетка [11 см (Д) × 10 см (Ш) × 10 см (В)]. Мышей предварительно приучали к аппарату с двумя пустыми клетками в течение 5 мин. На следующий день в одну из проводных клеток помещали незнакомую мышь. Для испытуемых мышей регистрировали время нахождения в зоне возле клеток с мышами и без них, а также время исследования клеток. Зона возле клетки отмечалась на расстоянии 8 см от клетки. Исследование клетки регистрировалось вручную. Считалось, что мыши исследовали клетку, если они обнюхивали ее и подходили к клетке.

Тест «Тёмно-светлая камера» использовался для анализа тревожного поведения животных. Аппарат состоял из двух камер [20 см (Д) × 20 см (Ш) × 20 см (В)] каждая. Одна из камер была сильно освещена, а другая оставалась темной. Камеры были соединены проходом, который позволял мышам свободно перемещаться между камерами. Каждую мышь помещали в светлую часть аппарата в направлении от темной камеры и давали ей возможность исследовать аппарат в течение 3 минут. Регистрировались время задержки входа в темную камеру и время задержки возвращения в светлую камеру, а также общее время пребывания в светлой камере и количество входов в светлую камеру.

В тесте закапывания шариков каждую мышь помещали на 30 мин в плексигласовую клетку размера [35 см (Д) × 19 см (Ш) × 14 см (В)], заполненную 5 сантиметрами свежего подстила из опилок с пятью рядами по три шарика в каждом. Количество зарытых шариков подсчитывалось через 30 мин эксперимента. Зарытыми считались шарики при условии, если не менее двух третей их поверхности было покрыто подстилом. Для оценки депрессивноподобного поведения использовали тест вынужденного плавания. Каждую мышь отдельно помещали в цилиндр из плексигласа (диаметр: 10 см, высота: 21 см), заполненный водой на 2/3. Температура воды находилась в пределах  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Тест проводился в течение 10 мин. Уровень воды был достаточно глубоким (18 см), чтобы хвост мыши не касался дна. После купания мышей вынимали из воды, вытирали насухо полотенцем, возвращали в их

домашнюю клетку и оставляли в теплом помещении. Оценивали суммарное время иммобилизации, активного и пассивного плавания.

Горизонтальная локомоторная активность мышей оценивалась с помощью программы Noldus Ethovision. Для проведения теста были использованы 15 самцов дикого типа и 21 нокаутный по TAAR2 самец. Тест проводился с использованием квадратного аппарата открытого поля, который был незнаком животным. Мышей помещали в плексигласовые коробки размером 40 см (Д) × 40 см (Ш) × 40 см (В) и регистрировали их горизонтальную активность в течение 120 мин. Подстилка, корм и вода животным в этом тесте не предоставлялись.

Для оценки эффектов GBR 12909 использовалось 8 самцов дикого типа и 7 самцов, нокаутных по гену TAAR2. Инъекции проводились в объёме 10 мл/кг, GBR 12909 вводился в дозе 10 мг/кг. Самцов помещали в плексигласовые боксы размером 40 см (Д) × 40 см (Ш) × 40 см (В), двигательная активность регистрировалась с помощью программы Noldus Ethovision в течение 120 минут после инъекции.

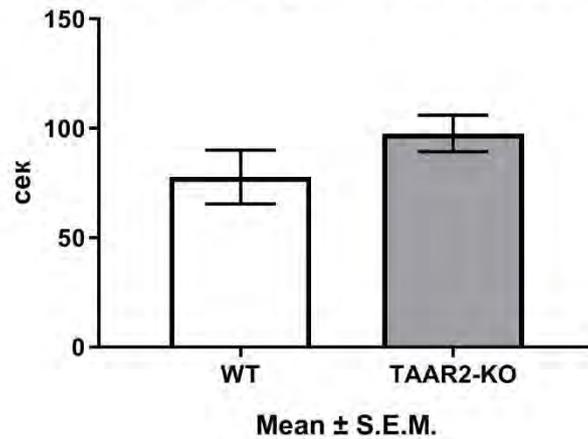
Для обработки полученных данных использовались тесты Манна-Уитни либо 2-way ANOVA с последующим тестом Bonferroni для множественных сравнений. Статистически значимыми различия признавались при значениях  $p < 0.05$ . Статистическая обработка данных производилась при помощи статистического пакета GraphPad Prism.

## Результаты.

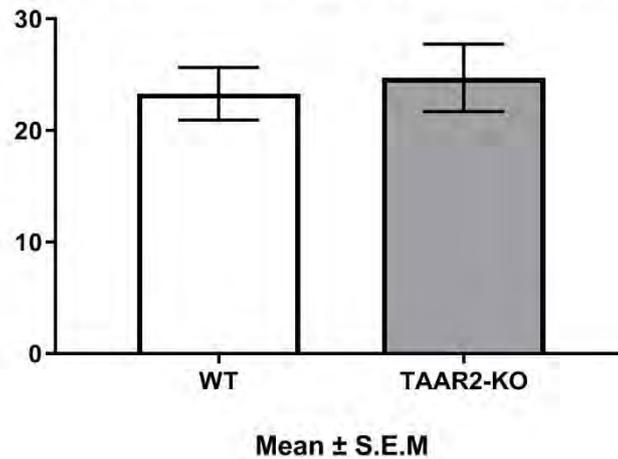
### Открытое поле.



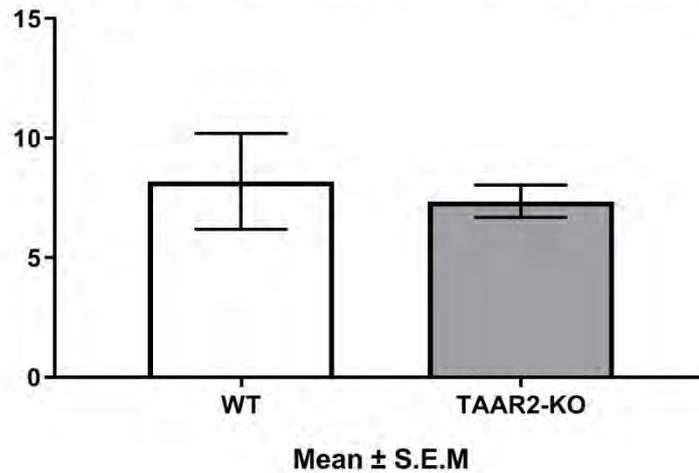
**Рисунок 72.** Пройденная мышами дистанция за время выполнения теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по пройденной в открытом поле дистанции от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=45$ ).

**Открытое поле. Время в центральной зоне**

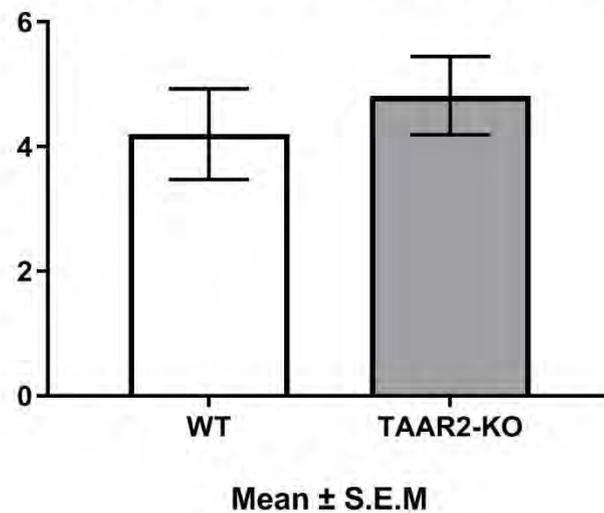
**Рисунок 73.** Время, проведённое в центральной зоне при выполнении теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по времени, проведённому в центральной зоне, от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=37$ ).

**Открытое поле. Количество подъёмов на задние лапы**

**Рисунок 74.** Количество подъёмов на задние лапы при выполнении теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по количеству подъёмов на задние лапы от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=44$ ).

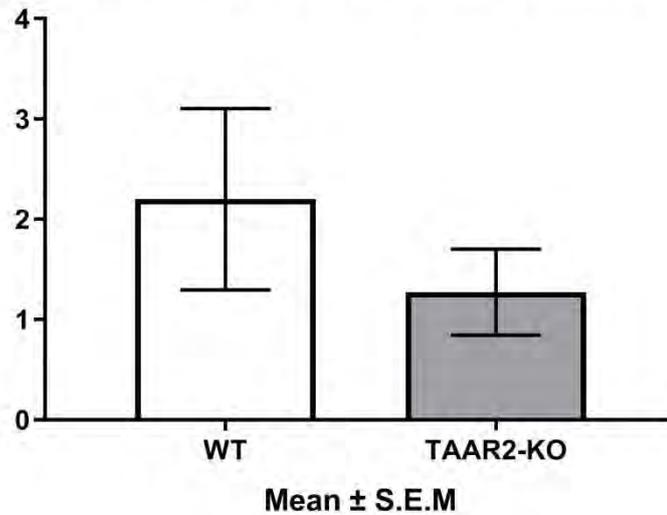
**Открытое поле. Количество исследованных отверстий**

**Рисунок 75.** Количество исследованных отверстий при выполнении теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по количеству исследованных отверстий от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 46$ ).

**Открытое поле. Частота груминга**

**Рисунок 76.** Частота груминга при выполнении теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по частоте груминга от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 45.5$ ).

### Открытое поле. Количество фекальных болюсов

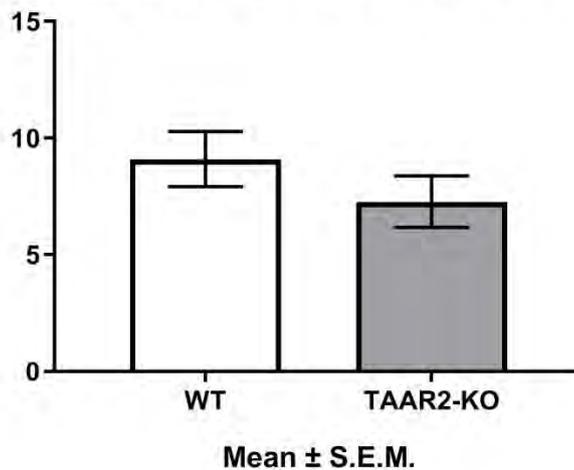


**Рисунок 77.** Количество фекальных болюсов при выполнении теста «Открытое поле». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по количеству фекальных болюсов от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=47$ ).

Ни по одному из исследованных показателей в тесте «Открытое поле» нокаутные по гену TAAR2 животные не отличались от животных дикого типа, что отображено на рисунках 72-77.

### Тест закапывания шариков

#### Количество закопанных шариков



**Рисунок 78.** Количество закопанных шариков в тесте закапывания шариков. TAAR2-нокаутные мыши не отличались по количеству закопанных шариков от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=38.5$ ).

### Тест социального взаимодействия



**Рисунок 79.** Время, проведённое в отсеке с мышью при выполнении теста социального взаимодействия. TAAR2-нокаутные мыши не отличались по времени, проведённому в отсеке с мышью, от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=38$ ).

В тесте закапывания шариков и тесте социального взаимодействия не выявлено отличий между группами (Рисунок 78-79).

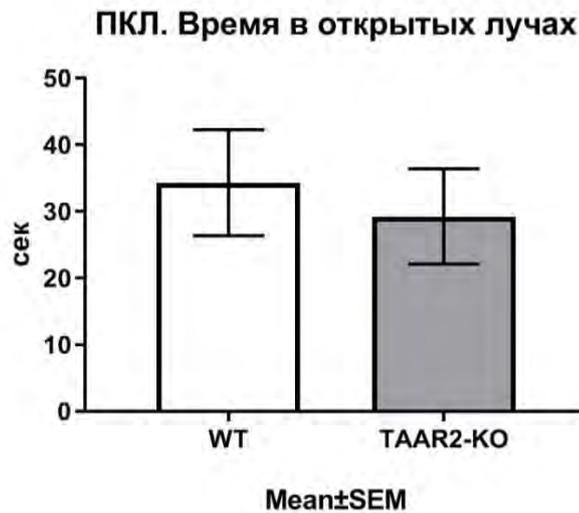
### Приподнятый крестообразный лабиринт



**Рисунок 80.** Время, проведённое в центральной зоне при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по времени, проведённому в центральной зоне, от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U=49$ ).

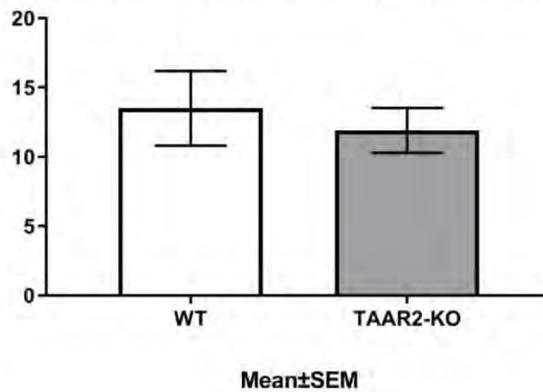


**Рисунок 81.** Время, проведённое в закрытых лучах при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по времени, проведённому в закрытых лучах, от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 50$ ).



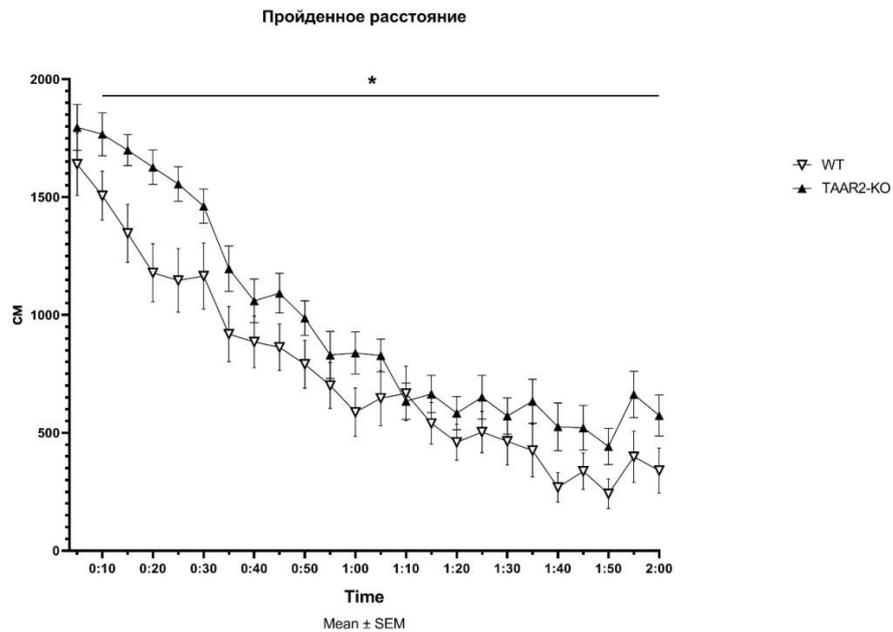
**Рисунок 82.** Время, проведённое в открытых лучах при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по времени, проведённому в открытых лучах, от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 51$ ).

## ПКЛ. Количество свешиваний с открытых лучей



**Рисунок 83.** Количество свешиваний с открытых лучей при выполнении теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». TAAR2-нокаутные мыши не отличались по количеству свешиваний с открытых лучей от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$  ( $U = 51$ ).

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» не было продемонстрировано различий между животными дикого типа и нокаутами по гену TAAR2 ни по одному из исследованных показателей, что отображено на рисунках 80-83.



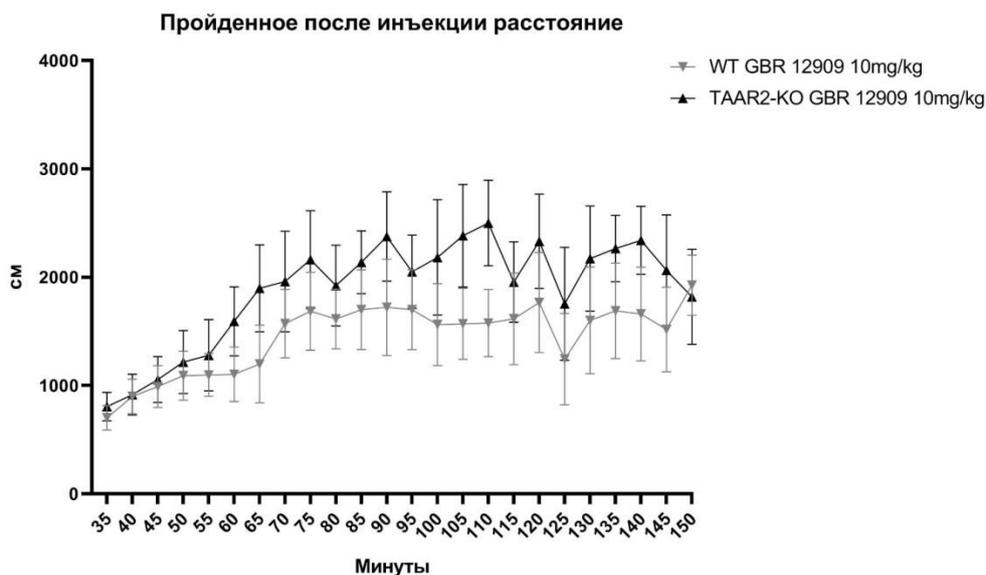
**Рисунок 84.** Расстояние, пройденное в тесте на локомоторную активность. TAAR2-нокаутные мыши проходили статистически значимо большее расстояние по сравнению с мышами дикого типа, Two-way RM ANOVA,  $p = 0.0205$ .

В двухчасовом тесте на локомоторную активность TAAR2-нокауты проходили большее расстояние по сравнению с животными дикого типа (график представлен на рисунке 84).

## Оценка локомоторной активности после инъекции DAT-ингибитора GBR 12909.



**Рисунок 85.** Расстояние, пройденное в тесте на локомоторную активность после инъекции GBR 12909. TAAR2-нокаутные мыши не отличались по пройденному расстоянию от мышей дикого типа, Mann-Whitney test,  $p=0.1893$  ( $U=16$ ).



**Рисунок 86.** Расстояние, пройденное мышами после инъекции GBR12909. TAAR2-нокаутные мыши статистически не отличались по пройденному расстоянию после инъекции от мышей дикого типа, Bonferroni's multiple comparisons test,  $p>0.05$  для всех интервалов времени.

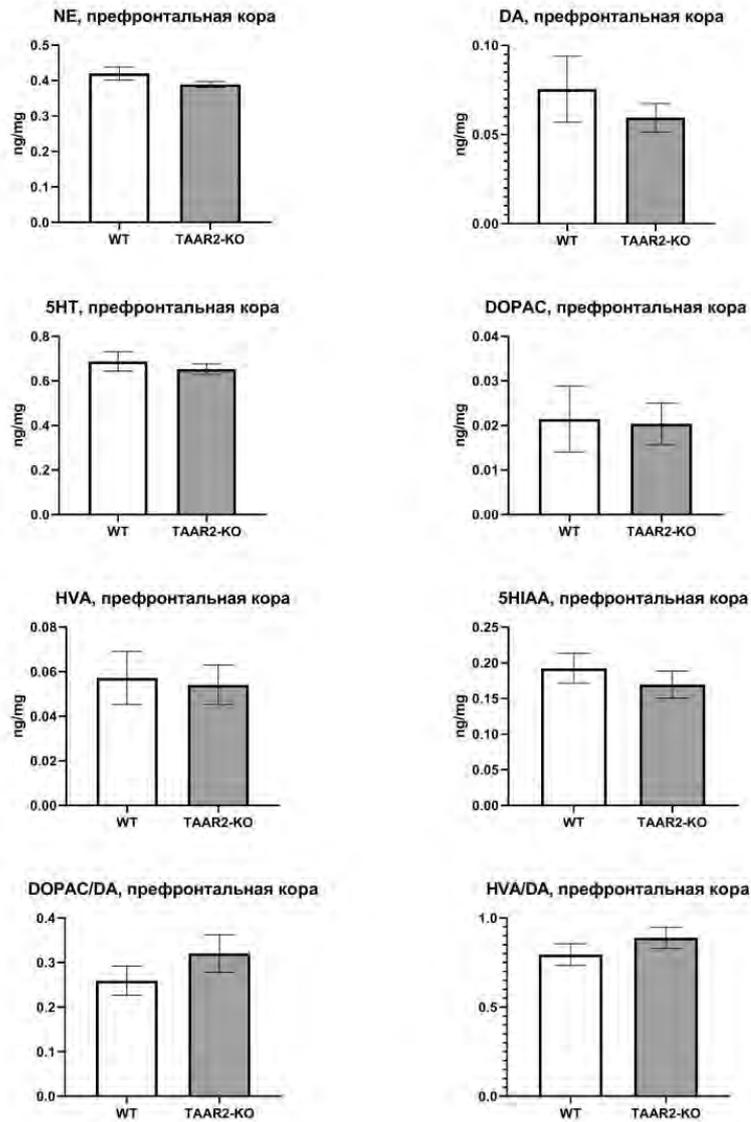
В тесте локомоторной гиперактивности, вызванной введением блокатора дофаминавого транспортера GBR 12909, не было выявлено различий между группой нокаутов и животными дикого типа, что показано на рисунках 85-86.

## 7. Оценка содержания моноаминов в структурах мозга TAAR2-нокаутных мышей

### Материалы и методы.

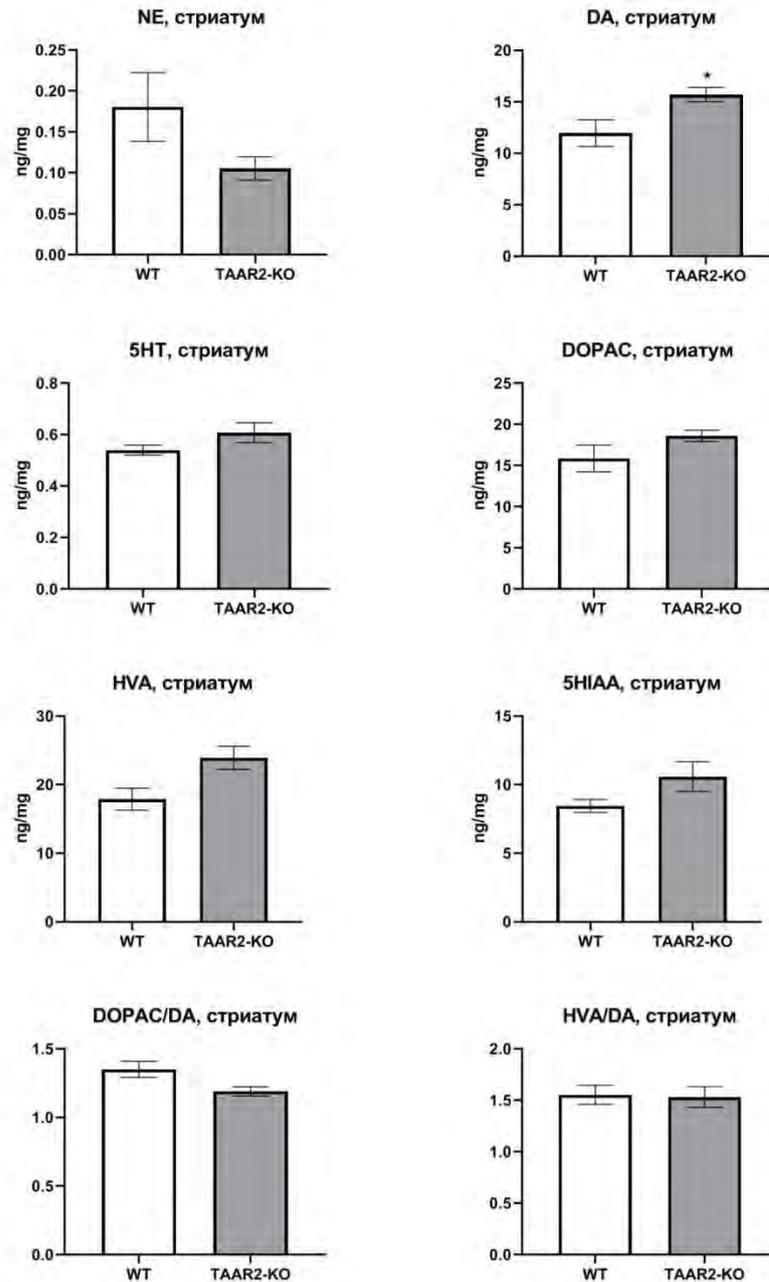
Высокоэффективную жидкостную хроматографию выполняли для исследования содержания серотонина, норадреналина, дофамина, 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты в различных структурах головного мозга. Для забора образцов мышам проводили цервикальную дислокацию, декапитацию, затем на льду в короткое время препарировали лобную кору, стриатум, гипоталамус и гиппокамп. Образцы немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Образцы для анализа гомогенизировали в 0,1 М  $\text{HClO}_4$ , центрифугировали (10 мин,  $+4^{\circ}\text{C}$ ; 14 000 g) и промывали с использованием центрифужных флотаторов (мембрана PVDF, размер пор 0,22 мкм, Millipore). Измерение содержания моноаминов в образцах тканей проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Eicom, HTEC-500, Япония) с угольным электродом WE-3G (Eicom, Япония) при приложенном потенциале +650 мВ. Система была оснащена обращенно-фазовой колонкой SA-50DS ( $150 \times 2,1$  мм, Eicom, Япония) со скоростью потока 200 мкл/мин. Подвижная фаза содержала 100 мМ натрий-фосфатного буфера, 0,17 мМ ЭДТА, 1,8 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты и 18% (об/об) метанола, pH 4,5. Все полученные пики нормировались на внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин, а конечные значения уровней моноаминов и метаболитов выражались в нанogramмах на миллиграмм веса влажной ткани. Статистическая обработка данных производилась при помощи теста Манна-Уитни, анализ выполнялся с использованием статистического пакета GraphPad Prism, значимыми отличия считались при значениях  $p < 0.05$ . Для данного исследования было использовано 9 взрослых мышей линии C57Black/6n дикого типа и 12 нокаутных по гену TAAR2 мышей того же помёта и возраста. Животные содержались по 3-5 голов в плексигласовых клетках, вода и корм на всё время содержания предоставлялись в неограниченном количестве, световой режим был установлен как 12 часов света/12 часов темноты, забор образцов мозга происходил во вторую половину светлой фазы. Температура в комнате содержания животных и в экспериментальном помещении колебалась в пределах 20-23 градусов по Цельсию, относительная влажность воздуха в помещениях поддерживалась в диапазоне 30-70%. Забор образцов головного мозга и хроматографический анализ содержания моноаминов и их метаболитов выполнялся совместно со с.н.с., к.б.н. Евгенией Викторовной Ефимовой и м.н.с. лаборатории Михаэлем Мором.

## Результаты.

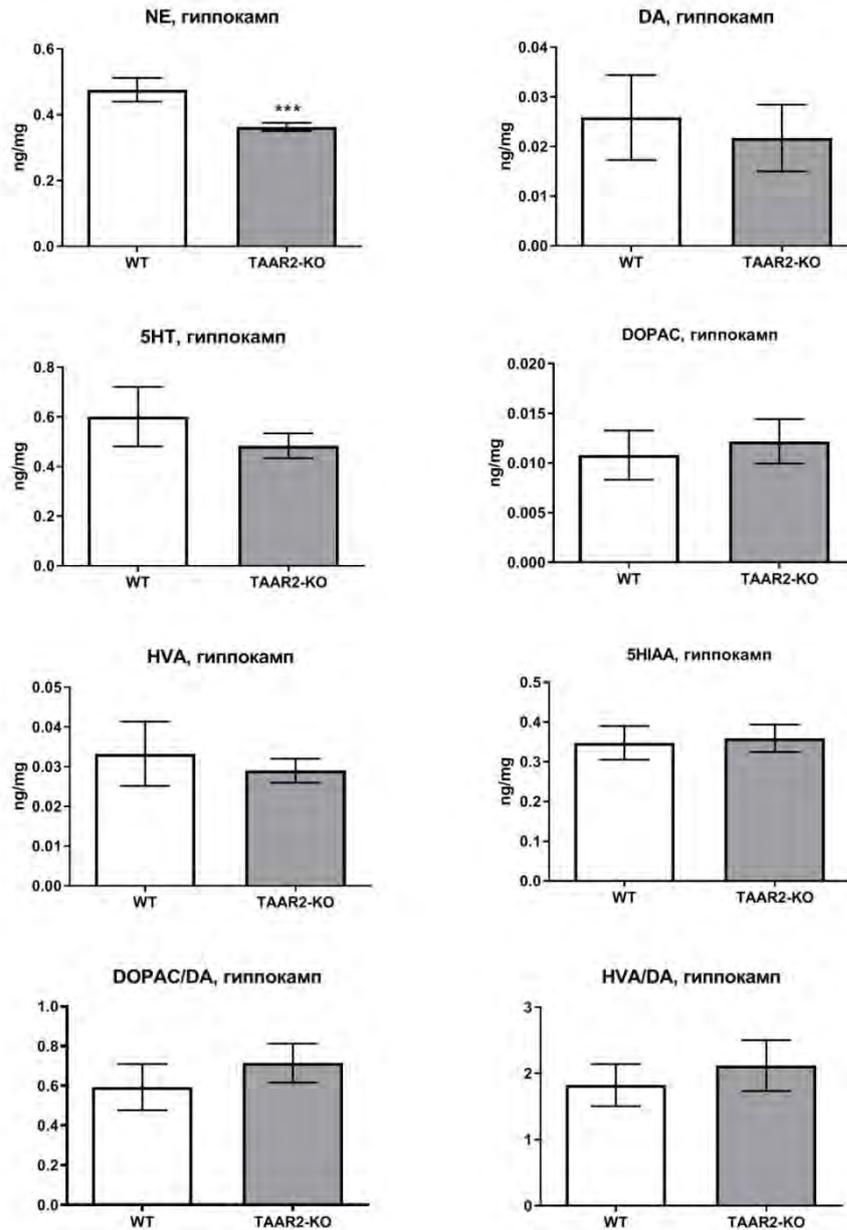


**Рисунок 87.** Содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре TAAR2-нокаутных мышей и мышей дикого типа. Дикий тип, n=6; TAAR2-KO, n=8. На графиках отображены mean  $\pm$  S.E.M.

При анализе не было выявлено статистически значимых различий по количеству моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре между TAAR2-нокаутными животными и животными дикого типа (тест Манна Уитни,  $U > 11$ ,  $p > 0.05$  для всех изученных показателей), что отражено на рисунке 87.

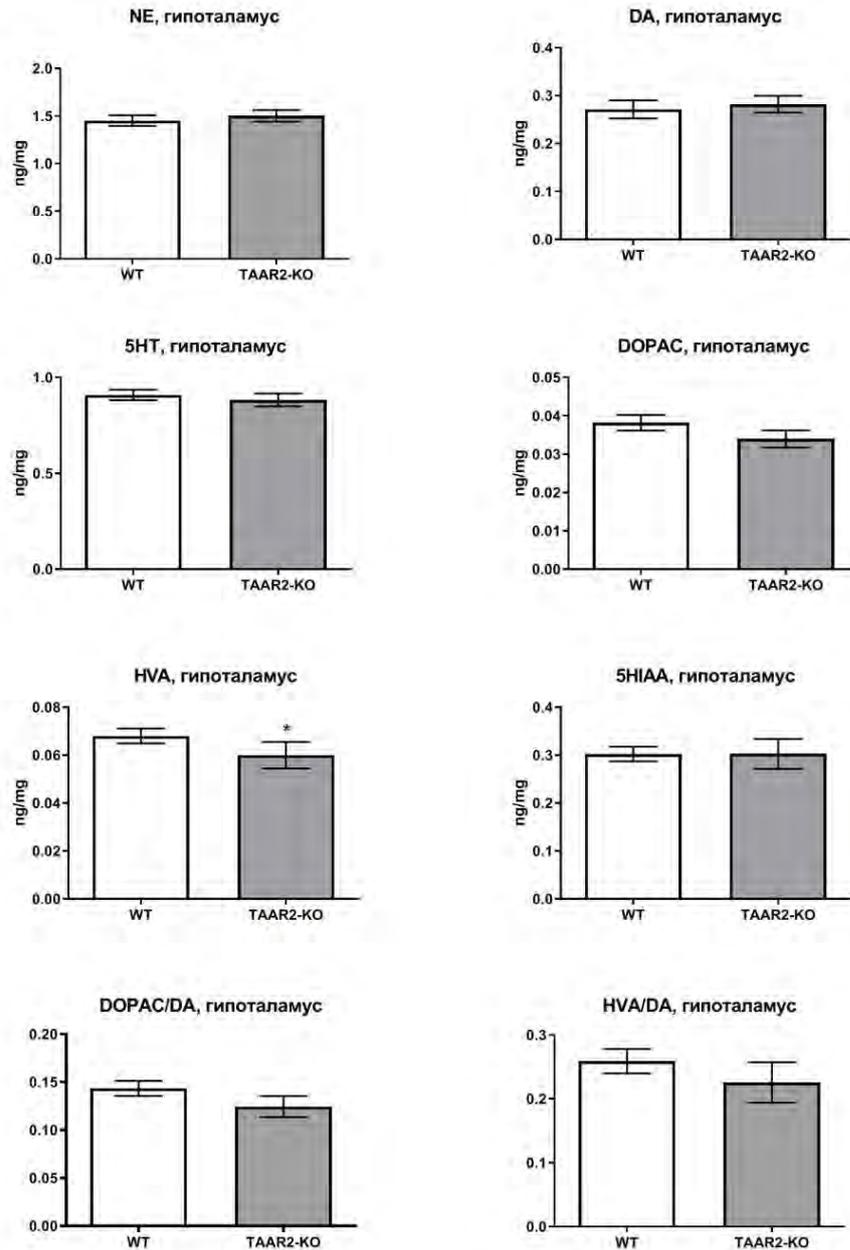


**Рисунок 88.** Содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме TAAR2-нокаутных мышей и мышей дикого типа. Дикий тип, n=9; TAAR2-KO, n=8. На графиках отображены mean  $\pm$  S.E.M. При анализе было выявлено повышение количества дофамина в стриатуме TAAR2-нокаутных животных по сравнению с животными дикого типа (тест Манна Уитни,  $U=10$ ,  $p=0.0111$ ). По остальным изученным показателям статистически значимых различий между группами выявлено не было (тест Манна Уитни,  $U>16$ ,  $p>0.05$ ). Результаты отображены на рисунке 88.



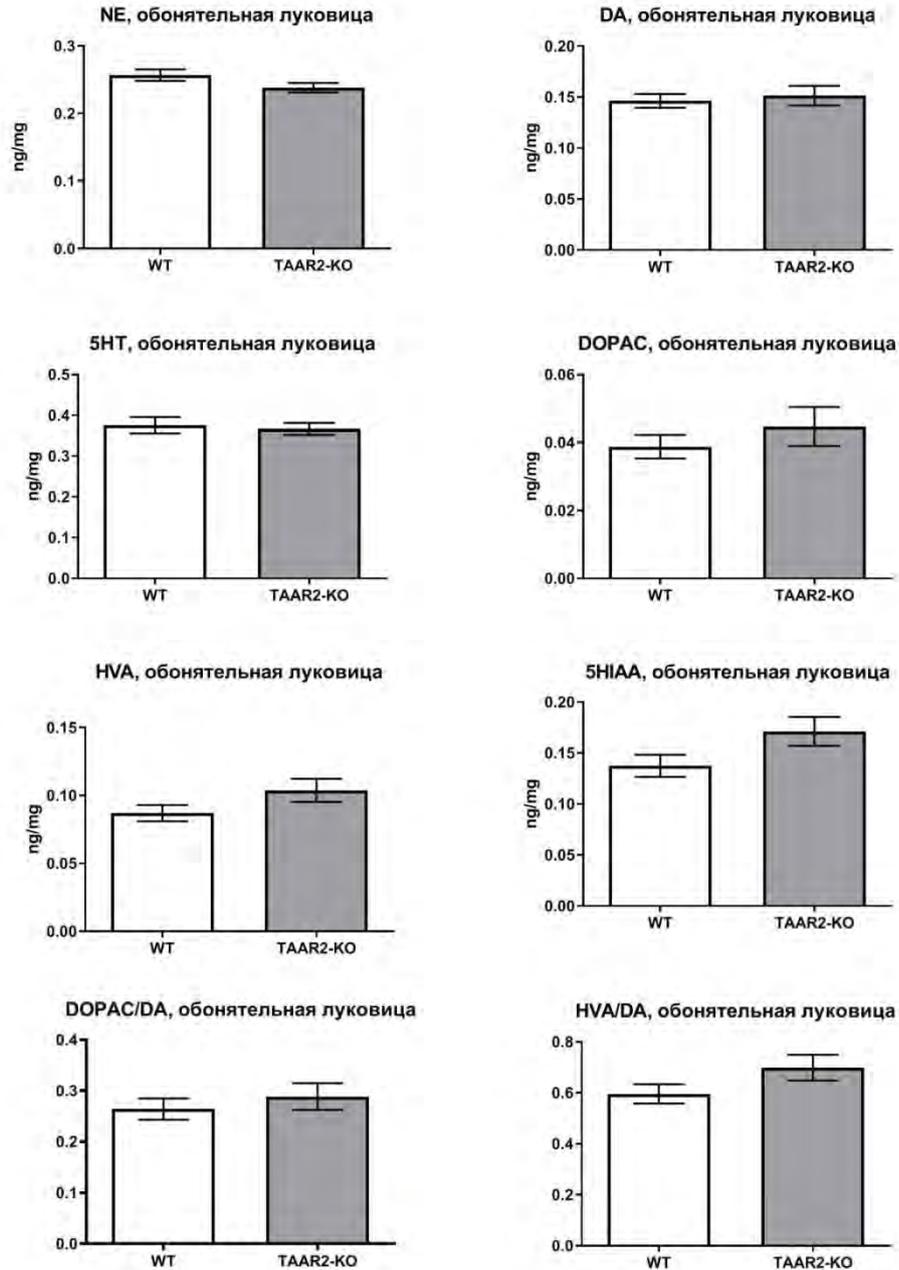
**Рисунок 89.** Содержание моноаминов и их метаболитов в гиппокампе TAAR2-нокаутных мышей и мышей дикого типа. Дикий тип,  $n=9$ ; TAAR2-KO,  $n=12$ . На графиках отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

При анализе было выявлено снижение норэпинефрина в гиппокампе TAAR2-нокаутных животных по сравнению с животными дикого типа (тест Манна Уитни,  $U=8$ ,  $p=0.0005$ ). По остальным изученным показателям статистически значимых различий между группами выявлено не было (тест Манна Уитни,  $U>28$ ,  $p>0.05$ ). Графики представлены на рисунке 89.



**Рисунок 90.** Содержание моноаминов и их метаболитов в гипоталамусе TAAR2-нокаутных мышей и мышей дикого типа. Дикий тип, n=9; TAAR2-KO, n=12. На графиках отображены mean  $\pm$  S.E.M

При анализе было выявлено снижение количества гомованилиновой кислоты в гипоталамусе TAAR2-нокаутных животных по сравнению с животными дикого типа (тест Манна Уитни,  $U=26$ ,  $p=0.0491$ ). По остальным изученным показателям статистически значимых различий между группами выявлено не было (тест Манна Уитни,  $U>31$ ,  $p>0.05$ ). Результаты отображены на рисунке 90.



**Рисунок 91.** Содержание моноаминов и их метаболитов в обонятельной луковице TAAR2-нокаутных мышей и мышей дикого типа. Дикий тип,  $n=9$ ; TAAR2-KO,  $n=12$ . На графиках отображены  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$

При анализе не было выявлено статистически значимых различий по количеству моноаминов и их метаболитов в обонятельной луковице между TAAR2-нокаутными животными и животными дикого типа (тест Манна Уитни,  $U > 33$ ,  $p > 0.05$  для всех изученных показателей), графики с результатами отображены на рисунке 91.

## 8. Обсуждение результатов

В процессе выполнения данной работы удалось идентифицировать несколько *in vivo* активных TAAR1-агонистов, используя различные животные модели. Соединение AP163 оказалось эффективно в подавлении двигательной гиперактивности крыс, вызванной мутацией в гене дофаминового транспортера [148]. Модель двигательной гиперактивности, вызванной мутацией в гене транспортера может являться нефармакологической моделью расстройств, в патофизиологии которых по каким-то причинам повышена дофаминергическая нейротрансмиссия. К ним можно отнести шизофрению, синдром дефицита внимания и гиперактивности, маниакальную фазу биполярного расстройства [149–151]. Для дальнейшего изучения терапевтического потенциала соединения при шизофрении возможна проверка его активности на других моделях, таких как РСР- и МК-801-индуцированная гиперактивность, способность влиять на преимпульсное ингибирование, влияние на снижение социального взаимодействия и памяти, вызванных введением фенциклидина. Также остаётся открытым вопрос, насколько эффект препарата в данной модели обусловлен агонизмом к рецепторам TAAR1. В нашей лаборатории на момент исследования имелись ресурсы для определения *in vitro* активности веществ в отношении TAAR1, потенциальное взаимодействие с другими рецепторами не проводилось. К сожалению, на момент написания работы отсутствуют *in vivo* активные TAAR1-антагонисты, использование которых могло бы быть использовано для оценки вклада TAAR1 в эффекты экспериментальных TAAR1-агонистов. Возможным вариантом проверки, является ли снижение гиперактивности TAAR1-обусловленным, может быть сравнение воздействия препарата у TAAR1-нокаутных животных и животных дикого типа в модели гиперактивности, вызванной введением психостимуляторов, что может быть затруднительно в силу низкой доступности этой группы препаратов для научных исследований. Фармакологическая модель с введением психостимуляторов могла бы стать дополнительной, однако она не совсем идентична использованной генетической модели. Наиболее близкой к использованной модели (для идентификации, является ли действие AP163 TAAR1-зависимым) была бы так генетическая модель двойных нокаутов по гену TAAR1 и дофаминому транспортеру, на который было бы можно оценить вклад TAAR1 в эффекты препарата [3], однако это представляется экономически нецелесообразным. Другие препараты данной серии AP161, AP162 и AP164 не снижали гиперактивности у крыс, нокаутных по дофаминому транспортеру, что предположительно может быть проявлением низкого их прохождения через гемато-энцефалический барьер, либо быть результатом эффекта первого прохождения. Для ответа на этот вопрос могли бы быть полезны фармакокинетические исследования, а также

исследования более высоких доз на животных моделях. Возможны также сложные фармакодинамические взаимодействия препаратов с множеством других потенциальных мишеней.

Углублённое исследование другого TAAR1-агониста LK00764 выявило способность экспериментального препарата снижать двигательную гиперактивность мышей, вызванную введением ингибитора дофаминового транспортера GBR 12909. Данная модель также рассматривается исследователями как способ изучения маниакальных состояний, синдрома дефицита внимания и гиперактивности и шизофрении [152–154]. Ранее была обнаружена способность препарата снижать двигательную гиперактивность животных в двух других моделях: гиперактивности, вызванной введением NMDA-антагониста МК-801 и генетической модели – у животных, нокаутных по гену дофаминового транспортера [155].

При исследовании влияния LK00764 на поведение было обнаружено, что при остром интраперитонеальном введении в дозе 10 мг/кг действие препарата может быть описано как седативное, снижающее преимущественно двигательную и исследовательскую активность животных. При подкожном же введении, по всей видимости в силу меньших пиковых концентраций, данные эффекты препарата выражены гораздо менее значительно. Для подробного изучения в будущем следовало бы провести серию экспериментов, в которой бы изучался больший диапазон доз при каждом из способов введения для более точной характеристики эффектов препарата и их продолжительности. Также при остром введении была обнаружена способность LK00764 дозозависимо снижать проявления стресс-индуцированной гипертермии, что может являться предиктором анксиолитического эффекта препарата [144,145]. Интересно, что полученные данные согласуются с прошлыми результатами исследований экспериментальных TAAR1-агонистов [3].

Примечательно, что потенциальные анксиолитические эффекты LK00764 были выявлены и при исследовании его воздействия на поведение при субхроническом подкожном введении в дозе 10 мг/кг. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» животные, получавшие инъекции LK00764, проводили больше времени в открытых лучах и центральной зоне по сравнению с контрольной группой, что классически трактуется как снижение тревожности при выполнении теста [156,157].

Таким образом, LK00764 эффективен в различных животных моделях шизофрении, а также демонстрирует анксиолитические свойства по результатам нескольких экспериментов. Как и в случае с AP163 потенциальное взаимодействие с другими мишенями подлежит

дальнейшему изучению, также целесообразно выявление TAAR1-зависимых эффектов препарата в других экспериментах.

Наблюдаемое у мышей, нокаутных по гену TAAR2, повышение локомоторной активности в новой обстановке может являться аргументом, говорящим в пользу наличия регуляторных функций данного рецептора в центральной нервной системе. В результате хроматографического исследования выявлено повышение уровня дофамина в стриатуме нокаутных животных, что может быть одной из причин наблюдаемых изменений. Повышение количества дофамина может быть как проявлением повышения количества дофаминергических нейронов, так и снижения экспрессии фермента моноаминоксидазы-Б, что было обнаружено при исследовании TAAR2-нокаутов [24]. На поведенческом уровне также выявлено снижение времени иммобилизации в тесте вынужденного плавания, что совместно с повышением локомоторной активности может быть проявлением повышенного дофаминового сигналинга. Для проверки этой гипотезы нами проводилось сравнение локомоторной активности у мышей дикого типа и TAAR2-нокаутов под воздействием блокатора дофаминового транспортера GBR 12909. Однако, по результатам проведённого теста локомоторная активность нокаутов статистически значимо не отличалась от активности мышей дикого типа. Возможным объяснением может быть малое количество животных в обеих группах, в силу чего статистическая мощность оказалась недостаточна для выявления небольших различий в локомоторной активности. Также стоит учитывать вовлечённость других механизмов, задействованных в повышении локомоции, не связанных с повышением количества дофамина, а также адаптационные процессы. Сам факт повышения тканевого дофамина является потенциальным индикатором изменений в процессах передачи сигнала дофаминовыми нейронами, однако для углублённого изучения данных процессов необходимо проведение микродиализного анализа внеклеточного дофамина и электрофизиологических исследований соответствующих групп нейронов. Интересно, что косвенно экспрессия TAAR2 показана и в других структурах мозга, таких как гиппокамп, гипоталамус и ядра шва, изменения в функционировании которых также могут иметь влияние на поведение животных [158].

У мышей, мутантных по гену TAAR6, при проведении поведенческих тестов также были выявлены изменения по сравнению с мышами дикого типа. Одним из таких тестов был приподнятый крестообразный лабиринт. Приподнятый крестообразный лабиринт является простым методом оценки тревожных реакций у грызунов. Основывается этот тест на склонности грызунов к тёмным закрытым пространствам и безусловном страхе перед открытыми пространствами и высотой. Соотношение пребывания в закрытых и открытых

рукавах в данном тесте отражает конфликт между врожденной мотивацией к исследованию новой среды и предпочтением грызуном защищенных пространств. Данный тест имеет предиктивную валидность при исследовании анксиогенных и анксиолитических фармакологических препаратов. Анксиолитические препараты повышают время, проведенное животным в открытых рукавах лабиринта, могут также увеличивать время, проведенное в центральной зоне лабиринта и количество свешиваний с открытых рукавов, анксиогенные же оказывают обратный эффект [156]. TAAR6-мутантные мыши демонстрируют повышение времени, проведенного в открытых лучах и центральной зоне приподнятого крестообразного лабиринта, а также понижение времени, проведенного TAAR6-мутантными мышами в закрытых лучах лабиринта. Данные показатели классически интерпретируются как снижение тревожного поведения [157]. Увеличение времени, проведенного в центральной зоне, так же может быть косвенным показателем повышения импульсивности у грызунов [159].

TAAR6-мутантные животные оставляли больше фекальных болюсов при прохождении теста «Открытое поле». Есть различные мнения касательно интерпретации данного показателя. Некоторыми исследователями количество фекальных болюсов оценивается как повышенная эмоциональность и тревожность во время выполнения теста, что может обратно коррелировать с двигательной активностью [160]; эта точка зрения была позже оспорена [161]. Другой возможный показатель изменения тревожного поведения во время теста «Открытое поле» не был изменен, а именно количество заходов в центральную зону и время, проведенное в ней. Горизонтальная двигательная активность во время теста «Открытое поле» не отличалась между мутантными мышами и мышами дикого типа. Вертикальная же активность была повышена у TAAR6-мутантных мышей, о чём свидетельствует повышение подьёмов на задние лапы во время теста. Подъёмы на задние лапы рассматриваются исследователями как вариант исследовательской активности животных. Повышение этого показателя может быть так же интерпретировано, как снижение тревожности во время теста [146].

В тесте закапывания шариков TAAR6-мутантные мыши закапывали больше шариков, чем мыши дикого типа. Существует множество интерпретаций данного теста [147]. Увеличение количества закопанных шариков может быть проявлением тревожности в отношении неизвестных объектов, а также усилением стереотипного или компульсивного поведения [162]. Стоит отметить, что само копание не было изменено у TAAR6-мутантных мышей.

Тревожность может иметь несколько различных модальностей зависящих от контекста, для различных аспектов тревожного поведения существуют отдельные тесты, акцентирующие

внимание на определённом факторе [163]. Полученные результаты могут о том, что мутация в гене TAAR6 по всей видимости способна оказывать эффект только на тревожность, связанную с открытым пространством и высотой, так как в светло-тёмной камере не было выявлено изменений в показателях, обычно интерпретирующихся как индикаторы тревожного поведения, в то время как в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте была изменена часть таких параметров. Для углублённого изучения изменений в тревожном поведении мутантных животных возможно проведение дополнительных тестов, делающих акцент на факторах, не исследованных при данном скрининге [164].

В результате исследования гипотермического воздействия агониста 5HT1A рецепторов 8-OH-DPAT было выявлено усиление гипотермического эффекта препарата у мутантных по гену TAAR6 мышей. В совокупности с полученными коллективом нашей лаборатории данными об изменениях в уровнях серотонина в нескольких структурах головного мозга мутантных животных, можно говорить об определённых изменениях в серотониновом сигналинге и функционировании серотониновых рецепторов 1A подтипа [165,166]. Для дифференцировки в будущих исследованиях следует исключить собственное взаимодействие 8-OH-DPAT и рецептора TAAR6, так как подобное взаимодействие так же может играть свою роль в изменённом гипотермическом ответе на препарат у TAAR6-мутантных мышей. Интересно, что описанные в работе результаты частично совпадают с ранее описанными изменениями, наблюдаемыми у мышей, нокаутных по гену TAAR5 [6]. Дальнейшие исследования функционирования различных типов серотониновых рецепторов могут помочь ответить на вопрос, какие именно сигнальные процессы изменяются под воздействием TAAR6-мутации.

## 9. Заключение

В работе исследованы синтезированные на базе Института химии СПбГУ агонисты TAAR1 рецепторов AP161-AP164, а также LK00764 в различных *in vivo* моделях. Выполнена поведенческая и нейрохимическая характеристика мышей, нокаутных по гену TAAR2, и мышей, мутантных по гену TAAR6, проведено несколько фармакологических тестов на данных животных.

В результате проведенных исследований в соответствии с поставленными задачами были сделаны изложенные ниже выводы:

### Выводы

1) Идентифицирован активный *in vivo* TAAR1-агонист AP163, способный дозозависимо снижать двигательную гиперактивность крыс, нокаутных по гену дофаминового транспортера, что может являться предиктором как антипсихотической, так и антиманиакальной активности данного соединения

2) Выявлены потенциальные анксиолитические свойства TAAR1-агониста LK00764, также показана его способность подавлять гиперактивность мышей, вызванную введением блокатора дофаминового транспортера GBR 12909

3) Впервые охарактеризованы TAAR2-нокаутные и TAAR6-мутантные мыши. Обнаружено влияние нокаута гена TAAR2 на двигательную активность животных, а также влияние мутации в гене TAAR6 на тревожное поведение и повышение гипотермического ответа на введение 5HT1A-агониста 8-OH-DPAT. При нейрохимическом анализе обнаружены изменения в содержании моноаминов и их метаболитов в мозге TAAR2-нокаутных и TAAR6-мутантных мышей

## Благодарности

Выражаю благодарность своему научному руководителю Раулю Радиковичу Гайнетдинову за возможность выполнять научную работу в ИТБМ и за предоставление свободы в выбираемой тематике. Михаилу Юрьевичу Красавину и всем членам его группы за огромную работу в области синтеза новых TAAR1-агонистов. Евгении Викторовне Ефимовой и Анне Борисовне Вольновой – за обучение и постоянную помощь в проведении экспериментов, а также за внимательное и доброжелательное отношение. Евгению Викторовичу Канову – за кропотливую работу в выявлении *in vitro* активности множества соединений. Коллективу ИТБМ – за длительную совместную работу и создание уникальной рабочей атмосферы, Елене Ивановне Леоновой – за создание линии мышей с мутацией в гене TAAR6. Коллективу НИИ Фармакологии им. Вальдмана, особенно Ирине Владимировне Белозерцевой и Ольге Андреевне Драволиной – за помощь в освоении специальности и большую эмоциональную поддержку на начальных этапах. Илье Михайловичу Суханову – за помощь в подготовке рукописи диссертации и советы по проведению и обработке экспериментов. Антону Юрьевичу Беспалову – за тот базис, без которого невозможно бы было осуществлять дальнейшее развитие в специальности, а также за моральную поддержку.

## Список использованной литературы

1. Bunzow J.R. et al. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxyamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor // *Mol. Pharmacol. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001. Vol. 60, № 6. P. 1181–1188.
2. Borowsky B. et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 16. P. 8966–8971.
3. Revel F.G. et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 20. P. 8485–8490.
4. Espinoza S. et al. TAAR1 Modulates Cortical Glutamate NMDA Receptor Function // *Neuropsychopharmacology*. 2015. Vol. 40, № 9. P. 2217–2227.
5. Kuvarzin S.R. et al. Unlocking the Therapeutic Potential of Ulotaront as a Trace Amine-Associated Receptor 1 Agonist for Neuropsychiatric Disorders // *Biomed.* 2023, Vol. 11, Page 1977. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 11, № 7. P. 1977.
6. Espinoza S. et al. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13, № March.
7. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nat.* 2006 4427103. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 442, № 7103. P. 645–650.
8. Liberles S.D. Trace amine-associated receptors: ligands, neural circuits, and behaviors // *Curr. Opin. Neurobiol. Elsevier Current Trends*, 2015. Vol. 34. P. 1–7.
9. Dewan A. Olfactory signaling via trace amine-associated receptors // *Cell Tissue Res. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*, 2021. Vol. 383, № 1. P. 395–407.
10. Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane receptors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002 39. Nature Publishing Group, 2002. Vol. 3, № 9. P. 639–650.
11. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines . Pharmacologic amphetamines , physiologic neuromodulators. 2004. P. 257–271.
12. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace amines and their receptors // *Pharmacol. Rev.* 2018. Vol. 70, № 3. P. 549–620.
13. Murtazina R.Z., Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. TAARs and Neurodegenerative and Psychiatric Disorders // *Handbook of Neurotoxicity / ed. Kostrzewa R.M. Cham: Springer International Publishing*, 2021. P. 1–18.
14. Bradaia A. et al. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 47. P. 20081–20086.
15. Revel F.G. et al. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight // *Mol. Psychiatry. Mol Psychiatry*, 2013. Vol. 18, № 5. P. 543–556.
16. Espinoza S. et al. Functional Interaction between Trace Amine-Associated Receptor 1 and Dopamine D2 Receptor // *Mol. Pharmacol. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011. Vol. 80, № 3. P. 416–425.
17. Wolinsky T.D. et al. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to

- schizophrenia // *Genes, Brain Behav.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 6, № 7. P. 628–639.
18. Revel F.G. et al. Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics // *Biol. Psychiatry.* Elsevier Inc., 2012. Vol. 72, № 11. P. 934–942.
  19. Sukhanov I. et al. TAAR1-dependent effects of apomorphine in mice // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* Oxford Academic, 2014. Vol. 17, № 10. P. 1683–1693.
  20. Lindemann L. et al. Trace Amine-Associated Receptor 1 Modulates Dopaminergic Activity // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. Vol. 324, № 3. P. 948–956.
  21. Cara B. Di et al. Genetic Deletion of Trace Amine 1 Receptors Reveals Their Role in Auto-Inhibiting the Actions of Ecstasy (MDMA) // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 47. P. 16928–16940.
  22. Ito J. et al. Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice // *Cell Tissue Res.* Springer, 2009. Vol. 338, № 2. P. 257–269.
  23. Babusyte A. et al. Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2 // *J. Leukoc. Biol.* Oxford Academic, 2013. Vol. 93, № 3. P. 387–394.
  24. Efimova E. V et al. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 847410.
  25. Zeng Z. et al. Cloning of a Putative Human Neurotransmitter Receptor Expressed in Skeletal Muscle and Brain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Academic Press, 1998. Vol. 242, № 3. P. 575–578.
  26. Zhang J. et al. Ultrasensitive Detection of Amines by a Trace Amine-Associated Receptor // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2013. Vol. 33, № 7. P. 3228–3239.
  27. Dinter J. et al. Inverse Agonistic Action of 3-Iodothyronamine at the Human Trace Amine-Associated Receptor 5 // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 2. P. e0117774–e0117774.
  28. Carnicelli V. et al. Expression of trace amine-associated receptors in human nasal mucosa // *Chemosens. Percept.* 2010. Vol. 3, № 2. P. 99–107.
  29. Kalinina D.S. et al. Role of the trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 23092.
  30. Peng X. et al. Alpha-NETA, as a CMKLR1 Small Molecule Antagonist, Protects against Renal Ischemia Reperfusion Injury in Mice // *Protein Pept. Lett.* Bentham Science Publishers Ltd., 2022. Vol. 29, № 11. P. 962–970.
  31. Rama Sastry B. V. et al. Relationships between chemical structure and inhibition of choline acetyltransferase by 2-( $\alpha$ -naphthoyl)ethyltrimethylammonium and related compounds // *Pharmacol. Res. Commun.* Academic Press, 1988. Vol. 20, № 9. P. 751–771.
  32. Aleksandrov A.A. et al. TAAR5 receptor agonist affects sensory gating in rats // *Neurosci. Lett.* Elsevier, 2018. Vol. 666. P. 144–147.
  33. Aleksandrov A.A. et al. Effect of alpha-NETA on auditory event related potentials in sensory gating study paradigm in mice // *Neurosci. Lett.* Elsevier, 2019. Vol. 712. P. 134470.
  34. Aleksandrov A.A. et al. Identification of TAAR5 Agonist Activity of Alpha-NETA and Its Effect on Mismatch Negativity Amplitude in Awake Rats // *Neurotox. Res.* Springer New York LLC, 2018. Vol. 34, № 3. P. 442–451.
  35. Aleksandrov A.A. et al. Putative TAAR5 agonist alpha-NETA affects event-related potentials in oddball paradigm in awake mice // *Brain Res. Bull.* Elsevier, 2020. Vol. 158. P. 116–121.
  36. Bon C. et al. Discovery of Novel Trace Amine-Associated Receptor 5 (TAAR5) Antagonists Using a

- Deep Convolutional Neural Network // *Int. J. Mol. Sci. MDPI*, 2022. Vol. 23, № 6. P. 3127.
37. Horowitz L.F. et al. Olfactory Receptor Patterning in a Higher Primate // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2014. Vol. 34, № 37. P. 12241–12252.
  38. Duan J. et al. Polymorphisms in the trace amine receptor 4 (TRAR4) gene on chromosome 6q23.2 are associated with susceptibility to schizophrenia // *Am. J. Hum. Genet. University of Chicago Press*, 2004. Vol. 75, № 4. P. 624–638.
  39. Vaganova A.N. et al. Public Transcriptomic Data Meta-Analysis Demonstrates TAAR6 Expression in the Mental Disorder-Related Brain Areas in Human and Mouse Brain // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 9. P. 1259.
  40. Pae C.U. et al. Investigation of an epistatic effect between a set of TAAR6 and HSP-70 genes variations and major mood disorders // *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. John Wiley & Sons, Ltd*, 2010. Vol. 153B, № 2. P. 680–683.
  41. Pae C.U. et al. Epistasis between a set of variations located in the TAAR6 and HSP-70 genes toward schizophrenia and response to antipsychotic treatment // *Eur. Neuropsychopharmacol. Elsevier*, 2009. Vol. 19, № 11. P. 806–811.
  42. Pae C.U. et al. TAAR 6 and HSP-70 variations associated with bipolar disorder // *Neurosci. Lett. Elsevier*, 2009. Vol. 465, № 3. P. 257–261.
  43. Pae C.U. et al. TAAR6 variation effect on clinic presentation and outcome in a sample of schizophrenic in-patients: An open label study // *Eur. Psychiatry. Cambridge University Press*, 2008. Vol. 23, № 6. P. 390–395.
  44. Pae C.U. et al. TAAR6 variations possibly associated with antidepressant response and suicidal behavior // *Psychiatry Res. Elsevier*, 2010. Vol. 180, № 1. P. 20–24.
  45. Vladimirov V. et al. A region of 35 kb containing the trace amine associated receptor 6 (TAAR6) gene is associated with schizophrenia in the Irish study of high-density schizophrenia families // *Mol. Psychiatry 2007* 129. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 12, № 9. P. 842–853.
  46. Abou Jamra R. et al. A family-based and case–control association study of trace amine receptor genes on chromosome 6q23 in bipolar affective disorder // *Mol. Psychiatry 2005* 107. Nature Publishing Group, 2005. Vol. 10, № 7. P. 618–620.
  47. Rutigliano G., Zucchi R. Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2020. Vol. 40, № 2. P. 239–255.
  48. Ikeda M. et al. No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with schizophrenia in Japanese patients // *Schizophr. Res. Elsevier*, 2005. Vol. 78, № 2–3. P. 127–130.
  49. Duan S. et al. Failure to find association between TRAR4 and schizophrenia in the Chinese Han population // *J. Neural Transm. Springer*, 2006. Vol. 113, № 3. P. 381–385.
  50. Venken T. et al. No association of the trace amine-associated receptor 6 with bipolar disorder in a northern Swedish population // *Psychiatr. Genet.* 2006. Vol. 16, № 1. P. 1–2.
  51. Vladimirov V.I. et al. The trace amine associated receptor (TAAR6) gene is not associated with schizophrenia in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia (ICCS) sample // *Schizophr. Res. Elsevier*, 2009. Vol. 107, № 2–3. P. 249–254.
  52. Chiellini G. et al. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function // *FASEB J. Wiley*, 2007. Vol. 21, № 7. P. 1597–1608.
  53. Ferrero D.M. et al. Agonists for 13 trace amine-associated receptors provide insight into the molecular basis of odor selectivity // *ACS Chem. Biol. American Chemical Society*, 2012. Vol. 7, № 7. P. 1184–

- 1189.
54. Li Q. et al. Non-classical amine recognition evolved in a large clade of olfactory receptors // *Elife*. eLife Sciences Publications Ltd, 2015. Vol. 4, № OCTOBER2015.
  55. Pacifico R. et al. An olfactory subsystem that mediates high-sensitivity detection of volatile amines // *Cell Rep*. Elsevier, 2012. Vol. 2, № 1. P. 76–88.
  56. Ohta H. et al. Tyramine and  $\beta$ -phenylethylamine, from fermented food products, as agonists for the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) in the stomach // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. Oxford Academic, 2017. Vol. 81, № 5. P. 1002–1006.
  57. Murtazina R.Z. et al. Genetic Deletion of Trace-Amine Associated Receptor 9 (TAAR9) in Rats Leads to Decreased Blood Cholesterol Levels // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 22, № 6. P. 2942.
  58. Vanti W.B. et al. Discovery of a null mutation in a human trace amine receptor gene // *Genomics*. Academic Press, 2003. Vol. 82, № 5. P. 531–536.
  59. Gozal E.A. et al. Anatomical and functional evidence for trace amines as unique modulators of locomotor function in the mammalian spinal cord // *Front. Neural Circuits*. Frontiers Media S.A., 2014. Vol. 8, № November. P. 97157.
  60. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression // *Cell*. Elsevier B.V., 2008. Vol. 135, № 3. P. 561–571.
  61. D'Andrea G. et al. HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes // *Neurosci. Lett*. Elsevier Ireland Ltd, 2003. Vol. 346, № 1–2. P. 89–92.
  62. Ferrero D.M. et al. Detection and avoidance of a carnivore odor by prey // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2011. Vol. 108, № 27. P. 11235–11240.
  63. Feldmesser E. et al. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes // *BMC Genomics*. BioMed Central, 2006. Vol. 7, № 1. P. 1–18.
  64. Kalra S. et al. Challenges and possible solutions for decoding extranasal olfactory receptors // *FEBS J*. John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 288, № 14. P. 4230–4241.
  65. Wojcik S. et al. Functional characterization of the extranasal OR2A4/7 expressed in human melanocytes // *Exp. Dermatol*. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 27, № 11. P. 1216–1223.
  66. Pluznick J.L. et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2013. Vol. 110, № 11. P. 4410–4415.
  67. Yang Z. et al. Emerging roles of olfactory receptors in glucose metabolism // *Trends Cell Biol*. Elsevier Ltd, 2023. Vol. 33, № 6. P. 463–476.
  68. Tong T. et al. Olfactory receptor 10J5 responding to  $\alpha$ -cedrene regulates hepatic steatosis via the cAMP–PKA pathway // *Sci. Reports* 2017 71. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
  69. Wu C. et al. Activation of OR1A1 suppresses PPAR- $\gamma$  expression by inducing HES-1 in cultured hepatocytes // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. Pergamon, 2015. Vol. 64. P. 75–80.
  70. Orecchioni M., Matsunami H., Ley K. Olfactory receptors in macrophages and inflammation // *Front. Immunol*. Frontiers Media S.A., 2022. Vol. 13. P. 1029244.
  71. Spehr M. et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis // *Science* (80-. ). American Association for the Advancement of Science, 2003. Vol. 299, № 5615. P. 2054–2058.

72. Veitinger T. et al. Chemosensory Ca<sup>2+</sup> dynamics correlate with diverse behavioral phenotypes in human sperm // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2011. Vol. 286, № 19. P. 17311–17325.
73. Ferrand N. et al. Olfactory receptors, Golf $\alpha$  and adenylyl cyclase mRNA expressions in the rat heart during ontogenic development // *J. Mol. Cell. Cardiol. Academic Press*, 1999. Vol. 31, № 5. P. 1137–1142.
74. Naressi R.G., Schechtman D., Malnic B. Odorant receptors as potential drug targets // *Trends Pharmacol. Sci. Elsevier Ltd*, 2023. Vol. 44, № 1. P. 11–14.
75. Lee S.J., Depoortere I., Hatt H. Therapeutic potential of ectopic olfactory and taste receptors // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018 182. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 18, № 2. P. 116–138.
76. Busse D. et al. A synthetic sandalwood odorant induces wound-healing processes in human keratinocytes via the olfactory receptor OR2AT4 // *J. Invest. Dermatol. Nature Publishing Group*, 2014. Vol. 134, № 11. P. 2823–2832.
77. Chéret J. et al. Olfactory receptor OR2AT4 regulates human hair growth // *Nat. Commun.* 2018 91. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 1. P. 1–12.
78. Vaganova A.N. et al. Deregulation of Trace Amine-Associated Receptors (TAAR) Expression and Signaling Mode in Melanoma // *Biomolecules.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 114.
79. Vattai A. et al. Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol. Springer Verlag*, 2017. Vol. 143, № 9. P. 1637–1647.
80. Olfson M. et al. Premature Mortality Among Adults With Schizophrenia in the United States // *JAMA Psychiatry. American Medical Association*, 2015. Vol. 72, № 12. P. 1172–1181.
81. Velligan D.I., Rao S. The Epidemiology and Global Burden of Schizophrenia // *J. Clin. Psychiatry. Physicians Postgraduate Press, Inc.*, 2023. Vol. 84, № 1. P. 45094.
82. Correll C.U., Schooler N.R. <p>Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and Treatment</p> // *Neuropsychiatr. Dis. Treat. Dove Press*, 2020. Vol. 16. P. 519–534.
83. McCutcheon R.A., Reis Marques T., Howes O.D. Schizophrenia—An Overview // *JAMA Psychiatry. American Medical Association*, 2020. Vol. 77, № 2. P. 201–210.
84. Kahn R.S. et al. Schizophrenia // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015. Vol. 1, № 1. P. 15067.
85. Cummings J. et al. Pimavanserin for patients with Parkinson’s disease psychosis: A randomised, placebo-controlled phase 3 trial // *Lancet. Elsevier B.V.*, 2014. Vol. 383, № 9916. P. 533–540.
86. Bugarski-Kirola D. et al. Pimavanserin for negative symptoms of schizophrenia: results from the ADVANCE phase 2 randomised, placebo-controlled trial in North America and Europe // *The Lancet Psychiatry. Elsevier Ltd*, 2022. Vol. 9, № 1. P. 46–58.
87. Correll C.U. et al. Safety and efficacy of KarXT (Xanomeline Trospium) in Schizophrenia in the Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled EMERGENT-2 Trial // *CNS Spectr. Cambridge University Press*, 2023. Vol. 28, № 2. P. 220–220.
88. Sauder C. et al. Effectiveness of KarXT (xanomeline-trospium) for cognitive impairment in schizophrenia: post hoc analyses from a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study // *Transl. Psychiatry* 2022 121. Nature Publishing Group, 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–8.
89. Bodick N.C. et al. Effects of Xanomeline, a Selective Muscarinic Receptor Agonist, on Cognitive Function and Behavioral Symptoms in Alzheimer Disease // *Arch. Neurol.* 1997. Vol. 54, № 4. P. 465–473.

90. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview // World Psychiatry. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 7, № 1. P. 58–62.
91. Huhn M. et al. Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis // Lancet. Lancet Publishing Group, 2019. Vol. 394, № 10202. P. 939–951.
92. Kane J.M. et al. Clinical Guidance on the Identification and Management of Treatment-Resistant Schizophrenia // J. Clin. Psychiatry. Physicians Postgraduate Press, Inc., 2019. Vol. 80, № 2. P. 2783.
93. Wagner E. et al. Efficacy and safety of clozapine in psychotic disorders—a systematic quantitative meta-review // Transl. Psychiatry 2021 111. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–18.
94. Cerveri G., Gesi C., Mencacci C. <p>Pharmacological treatment of negative symptoms in schizophrenia: update and proposal of a clinical algorithm</p> // Neuropsychiatr. Dis. Treat. Dove Press, 2019. Vol. 15. P. 1525–1535.
95. McCutcheon R.A., Keefe R.S.E., McGuire P.K. Cognitive impairment in schizophrenia: aetiology, pathophysiology, and treatment // Mol. Psychiatry 2023. Nature Publishing Group, 2023. P. 1–17.
96. Kirschner M., Aleman A., Kaiser S. Secondary negative symptoms — A review of mechanisms, assessment and treatment // Schizophr. Res. Elsevier B.V., 2017. Vol. 186. P. 29–38.
97. Koblan K.S. et al. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia // N. Engl. J. Med. 2020. Vol. 382, № 16. P. 1497–1506.
98. Shao L. et al. *In vivo* phenotypic drug discovery: applying a behavioral assay to the discovery and optimization of novel antipsychotic agents // Medchemcomm. 2016. Vol. 7, № 6. P. 1093–1101.
99. Achtyes E.D. et al. Ulotaront: review of preliminary evidence for the efficacy and safety of a TAAR1 agonist in schizophrenia // Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2023.
100. Dedic N. et al. SEP-363856, a Novel Psychotropic Agent with a Unique, Non-D2 Receptor Mechanism of Action // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2019. Vol. 371, № 1. P. 1–14.
101. Heffernan M.L.R. et al. Ulotaront: A TAAR1 Agonist for the Treatment of Schizophrenia // ACS Med. Chem. Lett. 2022. Vol. 13, № 1. P. 92–98.
102. Saarinen M. et al. TAAR1 dependent and independent actions of the potential antipsychotic and dual TAAR1/5-HT1A receptor agonist SEP-363856 // Neuropsychopharmacology. 2022. Vol. 47, № 13. P. 2319–2329.
103. Xiao G. et al. In Vitro ADME and Preclinical Pharmacokinetics of Ulotaront, a TAAR1/5-HT1A Receptor Agonist for the Treatment of Schizophrenia // Pharm. Res. 2022. Vol. 39, № 5. P. 837–850.
104. Galluppi G.R. et al. Population Pharmacokinetic Analysis of Ulotaront in Subjects with Schizophrenia // CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. 2021. Vol. n/a, № n/a.
105. Chen Y.L. et al. Comparative Bioequivalence of Tablet and Capsule Formulations of Ulotaront and the Effect of Food on the Pharmacokinetics of the Tablet Form in Humans // Neurol. Ther. Adis, 2023. Vol. 12, № 3. P. 815–832.
106. Arvid Carlsson Susanna Holm-Waters N.W., Joakim Tedroff and Maria L. Carlsson M.N. INTERACTIONS BETWEEN MONOAMINES, GLUTAMATE, AND GABA IN SCHIZOPHRENIA: New Evidence // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001. Vol. 41. P. 237–260–237–260.
107. McCutcheon R.A., Abi-Dargham A., Howes O.D. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms // Trends Neurosci. 2019. Vol. 42, № 3. P. 205–220.
108. Sams-Dodd F. A Test of the Predictive Validity of Animal Models of Schizophrenia Based on Phencyclidine and D-Amphetamine // Neuropsychopharmacology. 1998. Vol. 18, № 4. P. 293–304.

109. Begni V. et al. Towards Novel Treatments for Schizophrenia: Molecular and Behavioural Signatures of the Psychotropic Agent SEP-363856 // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 8. P. 4119.
110. Liang L. et al. Effect of Co-Treatment of Olanzapine with SEP-363856 in Mice Models of Schizophrenia // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 8. P. 2550.
111. Corbett R. et al. Effects of atypical antipsychotic agents on social behavior in rodents // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993. Vol. 45, № 1. P. 9–17.
112. Corbett R. et al. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors // *Psychopharmacology (Berl).* 1995. Vol. 120, № 1. P. 67–74.
113. Geyer M.A. et al. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review // *Psychopharmacology (Berl).* Springer, 2001. Vol. 156, № 2–3. P. 117–154.
114. Nuñez N.A. et al. Augmentation strategies for treatment resistant major depression: A systematic review and network meta-analysis // *J. Affect. Disord. Elsevier,* 2022. Vol. 302. P. 385–400.
115. Vázquez G.H. et al. Efficacy and Tolerability of Combination Treatments for Major Depression: Antidepressants plus Second-Generation Antipsychotics vs. Esketamine vs. Lithium // *J. Psychopharmacol.* SAGE Publications Ltd, 2021. Vol. 35, № 8. P. 890–900.
116. Ren X. et al. The Potential Antidepressant Action of Duloxetine Co-Administered with the TAAR1 Receptor Agonist SEP-363856 in Mice // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 9. P. 2755.
117. Correll C.U. et al. Safety and effectiveness of ulotaront (SEP-363856) in schizophrenia: results of a 6-month, open-label extension study // *npj Schizophr.* 2021 71. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
118. Milanovic S. et al. M208. MEASURES OF COGNITION AND SOCIAL FUNCTIONING IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS RECEIVING SEP-363856 // *Schizophr. Bull.* 2020. Vol. 46, № Supplement\_1. P. S215–S216.
119. Tsukada H. et al. A randomized, single-dose, crossover study of the effects of ulotaront on electrocardiogram intervals in subjects with schizophrenia // *Clin. Transl. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2023. Vol. 16, № 6. P. 1063–1074.
120. Tewksbury A., Olander A. Management of antipsychotic-induced hyperprolactinemia // *Ment. Heal. Clin.* Allen Press, 2016. Vol. 6, № 4. P. 185–190.
121. Isaacson S.H. et al. Ulotaront, a Trace Amine-Associated Receptor 1/Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> Agonist, in Patients With Parkinson Disease Psychosis // *Neurol. Clin. Pract.* Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 2023. Vol. 13, № 4. P. e200175.
122. Szabo S.T. et al. A multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized, Phase 1b crossover trial comparing two doses of ulotaront with placebo in the treatment of narcolepsy-cataplexy // *Sleep Med.* 2023. Vol. 107. P. 202–211.
123. Hopkins S.C., Dedic N., Koblan K.S. Effect of TAAR1/5-HT<sub>1A</sub> agonist SEP-363856 on REM sleep in humans // *Transl. Psychiatry.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–10.
124. Feemster J.C. et al. Treatment with the novel TAAR1 agonist ulotaront is associated with reductions in quantitative polysomnographic REM sleep without atonia in healthy human subjects: Results of a post-hoc analysis // *Sleep Med.* Elsevier, 2023. Vol. 101. P. 578–586.
125. Bortnikov N.S. et al. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами: новая мишень для разработки антиаддиктивных средств? // *Вопросы наркологии. Journal of Addiction Problems,* V. Serbsky NMRCPN, 2021. № 8. P. 52–72.
126. Negus S.S., Miller L.L. Intracranial Self-Stimulation to Evaluate Abuse Potential of Drugs // *Pharmacol.*

- Rev. / ed. Nader M.A. 2014. Vol. 66, № 3. P. 869–917.
127. Pei Y. et al. Selective activation of the trace amine-associated receptor 1 decreases cocaine's reinforcing efficacy and prevents cocaine-induced changes in brain reward thresholds // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 2015. Vol. 63. P. 70–75.
  128. Hunt W.A., Barnett L.W., Branch L.G. Relapse rates in addiction programs // *J. Clin. Psychol.* 1971. Vol. 27, № 4. P. 455–456.
  129. O'Brien C.P. Anticraving Medications for Relapse Prevention: A Possible New Class of Psychoactive Medications // *Am. J. Psychiatry*. 2005. Vol. 162, № 8. P. 1423–1431.
  130. Wit H. de. Priming effects with drugs and other reinforcers. - *PsycNET*. 1996. Vol. 4, № 1. P. 5–10.
  131. O'Brien C.P. et al. Classical Conditioning in Drug-Dependent Humans // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 654, № 1. P. 400–415.
  132. Sinha R., Shaham Y., Heilig M. Translational and reverse translational research on the role of stress in drug craving and relapse // *Psychopharmacology (Berl)*. 2011. Vol. 218, № 1. P. 69–82.
  133. Shaham Y. et al. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings // *Psychopharmacology (Berl)*. 2003. Vol. 168, № 1. P. 3–20.
  134. Holtz N.A. et al. Reinstatement of methamphetamine seeking in male and female rats treated with modafinil and allopregnanolone // *Drug Alcohol Depend.* 2012. Vol. 120, № 1. P. 233–237.
  135. Shaham Y., Stewart J. Stress reinstates heroin-seeking in drug-free animals: An effect mimicking heroin, not withdrawal // *Psychopharmacology (Berl)*. Springer-Verlag, 1995. Vol. 119, № 3. P. 334–341.
  136. Katz J.L., Higgins S.T. The validity of the reinstatement model of craving and relapse to drug use // *Psychopharmacology (Berl)*. 2003. Vol. 168, № 1. P. 21–30.
  137. Bossert J.M. et al. The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research // *Psychopharmacology (Berl)*. 2013. Vol. 229, № 3. P. 453–476.
  138. Pei Y. et al. Activation of the Trace Amine-Associated Receptor 1 Prevents Relapse to Cocaine Seeking // *Neuropsychopharmacology*. 2014. Vol. 39, № 10. P. 2299–2308.
  139. Liu J. et al. Activation of trace amine-associated receptor 1 selectively attenuates the reinforcing effects of morphine // *Br. J. Pharmacol.* 2021. Vol. 178, № 4. P. 933–945.
  140. Pei Y. et al. A partial trace amine-associated receptor 1 agonist exhibits properties consistent with a methamphetamine substitution treatment. 2014. P. 1–11.
  141. Jing L., Zhang Y., Li J.-X. Effects of the Trace Amine Associated Receptor 1 Agonist RO5263397 on Abuse-Related Behavioral Indices of Methamphetamine in Rats // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2015. Vol. 18, № 4.
  142. Liu J.-F. et al. Role of trace amine-associated receptor 1 in nicotine's behavioral and neurochemical effects // *Neuropsychopharmacology*. 2018. Vol. 43, № 12. P. 2435–2444.
  143. Liu J.-F. et al. Role of TAAR1 within the Subregions of the Mesocorticolimbic Dopaminergic System in Cocaine-Seeking Behavior // *J. Neurosci.* 2017. Vol. 37, № 4. P. 882–892.
  144. Adriaan Bouwknecht J., Olivier B., Paylor R.E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: A review of pharmacological and genetic studies in the mouse // *Neurosci. Biobehav. Rev. Pergamon*, 2007. Vol. 31, № 1. P. 41–59.
  145. Van Der Heyden J.A.M., Zethof T.J.J., Olivier B. Stress-Induced Hyperthermia in Singly Housed Mice // *Physiol. Behav. Elsevier*, 1997. Vol. 62, № 3. P. 463–470.

146. Sturman O., Germain P.L., Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test // *Stress*. Taylor and Francis Ltd, 2018. Vol. 21, № 5. P. 443–452.
147. de Brouwer G. et al. A critical inquiry into marble-burying as a preclinical screening paradigm of relevance for anxiety and obsessive–compulsive disorder: Mapping the way forward // *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 2018 191. Springer, 2018. Vol. 19, № 1. P. 1–39.
148. Krasavin M. et al. Discovery and In Vivo Efficacy of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 4-(2-Aminoethyl)-N-(3,5-dimethylphenyl)piperidine-1-carboxamide Hydrochloride (AP163) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Int. J. Mol. Sci. MDPI*, 2022. Vol. 23, № 19. P. 11579.
149. Gainetdinov R.R., Mohn A.R., Caron M.G. Genetic animal models: Focus on schizophrenia // *Trends Neurosci.* Elsevier, 2001. Vol. 24, № 9. P. 527–533.
150. Efimova E. V. et al. Dopamine transporter mutant animals: a translational perspective // <http://dx.doi.org/10.3109/01677063.2016.1144751>. Taylor & Francis, 2016. Vol. 30, № 1. P. 5–15.
151. Kwiatkowski M.A. et al. Dopamine transporter knockdown mice in the behavioral pattern monitor: A robust, reproducible model for mania-relevant behaviors // *Pharmacol. Biochem. Behav.* Elsevier, 2019. Vol. 178. P. 42–50.
152. Young J.W. et al. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: Mimicking quantitative assessment of manic behavior // *Psychopharmacology (Berl)*. Springer, 2010. Vol. 208, № 3. P. 443–454.
153. Castagné V., Cuénod M., Do K.Q. An animal model with relevance to schizophrenia: Sex-dependent cognitive deficits in osteogenic disorder-Shionogi rats induced by glutathione synthesis and dopamine uptake inhibition during development // *Neuroscience*. Elsevier Ltd, 2004. Vol. 123, № 4. P. 821–834.
154. Hewitt K.N. et al. Behavioural characterisation of the effects of acute and repeated administration of GBR 12909 in rats: Further evaluation of a potential model of ADHD // *Neuropharmacology*. Pergamon, 2009. Vol. 57, № 7–8. P. 678–686.
155. Krasavin M. et al. Discovery of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 2-(5-(4'-Chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine (LK00764) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1650.
156. Pellow S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // *J. Neurosci. Methods*. Elsevier, 1985. Vol. 14, № 3. P. 149–167.
157. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // *Nat. Protoc.* 2007 22. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 2, № 2. P. 322–328.
158. Kuvarzin S. et al. Trace amine-associated receptor 2: brain expression and it's role in neurochemistry and behaviour // *Eur. Neuropsychopharmacol.* Elsevier B.V., 2020. Vol. 40. P. S41–S42.
159. Rico J.L. et al. Time in the central area of the elevated plus-maze correlates with impulsivity-related measures during an operant task // *Univ. psychol.* Pontificia Universidad Javeriana, 2016. Vol. 15, № 5. P. 1–9.
160. Denenberg V.H. OPEN-FIELD BEHAVIOR IN THE RAT: WHAT DOES IT MEAN? // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 1969. Vol. 159, № 3. P. 852–859.
161. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review // *Anim. Behav.* Academic Press, 1973. Vol. 21, № 2. P. 205–235.
162. Angoa-Pérez M. et al. Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice // *JoVE (Journal Vis. Exp.)* 2013. № 82. P. e50978.
163. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? // *Trends Pharmacol. Sci.* Elsevier, 2008. Vol. 29, № 10. P. 493–498.

164. Lezak K.R., Missig G., Carlezon W.A. Behavioral methods to study anxiety in rodents // <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon>. Taylor & Francis, 2022. Vol. 19, № 2. P. 181–191.
165. Kuvarzin S. et al. Identifying the function of trace amine-associated receptor 6 and its role in behavior, physiology and brain neurochemistry // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2019. Vol. 29. P. S92–S93.
166. Kuvarzin S., Efimova E., Gainetdinov R. TAAR6 mutant mice have changes in the brain serotonin levels and enhanced hypothermic response to serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT // *Eur. Neuropsychopharmacol.* Elsevier, 2021. Vol. 53. P. S212–S213.

## Список сокращений

ЦНС – центральная нервная система

УРС – угашенная реакция самовведения

AP 163 – 4-(2-аминоэтил)-N-(3,5-диметилфенил)пиперидин-1-карбоксамид гидрохлорид

BNSS – краткая шкала оценки негативных симптомов шизофрении

DAT – дофаминовый транспортер

DRN – дорсальное ядро шва

EPPTB – N-(3-этокси-фенил)-4-пирролидин-1-ил-3-трифторметил-бензамид

GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком

LK00764 – 2-(5-(4'-Chloro-(1,1'-biphenyl)-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine hydrochloride

NMDA – N-метил-D-аспартат

PANSS – шкала оценки позитивных и негативных синдромов шизофрении

PCP – фенциклидин

TAAR – рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами

VTA – вентральная область покрышки

WT – дикий тип

5HT1A – серотониновый рецептор 1A-типа

8-OH-DPAT – ((±)-2-дипропиламино-8-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидронафталин