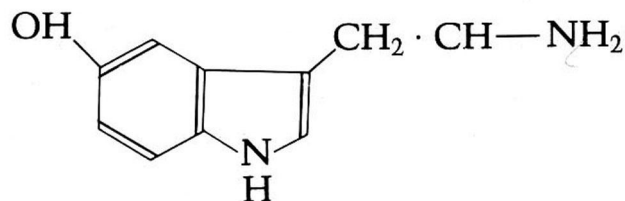


Молекулярные механизмы регуляции
поведения
Лекция 6
Серотонин

История



- Был впервые открыт в кишечнике и назван энтерамином (Espamer, 1940).
- Позже был открыт в плазме крови и назван серотонином (Rapport, Green, 1948). Показана его способность суживать кровеносные сосуды и вызывать сокращение гладкой мускулатуры. Установлена его идентичность с энтерамином.
- В мозге серотонин был обнаружен в 1954 г. (Amin, Crawford, Gaddum, 1954).
- В организме человека 90% серотонина в энтерохромаффинных клетках кишечника. Много в тромбоцитах и тучных клетках кожи. Наивысшая концентрация серотонина в эпифизе, где он является предшественником мелатонина.

Биологически активные индолы

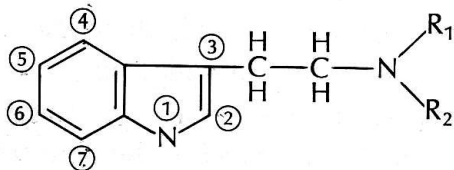
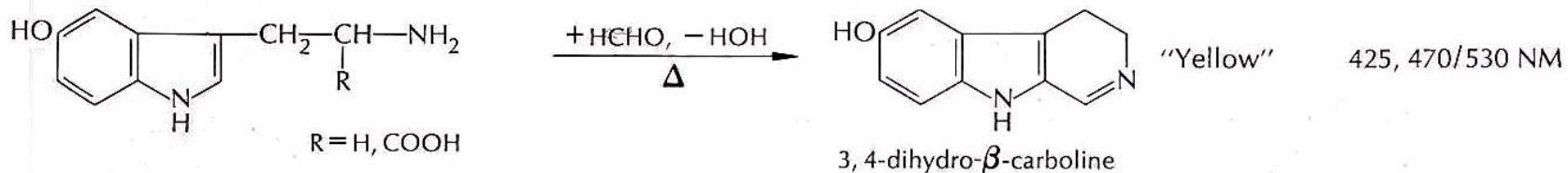


FIGURE. 7-1. Structural relationships of the various indolealkyl amines.

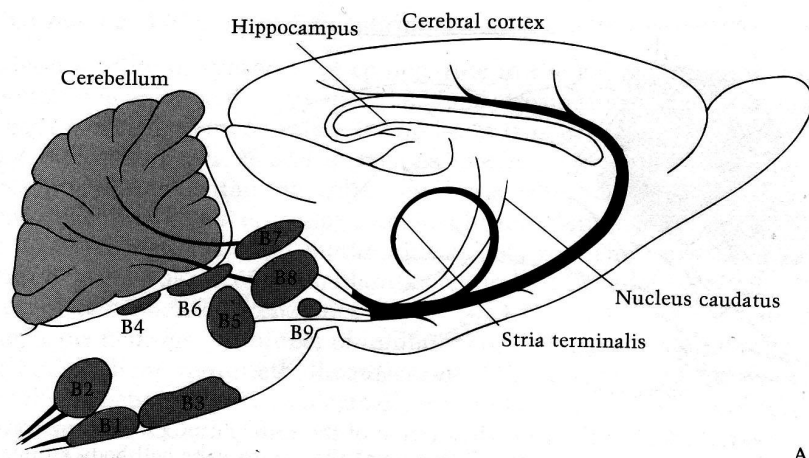
<i>Compound</i>	<i>Substitutions</i>
Tryptamine	R_1 and $R_2 = H$
Serotonin	Tryptamine with 5 Hydroxy
Melatonin	5 methoxy, N-acetyl
DMT*	R_1 and $R_2 = methyl$
DET*	R_1 and $R_2 = ethyl$
Bufotenine*	5 hydroxy, DMT
Szara psychotrope*	6 hydroxy, DET
Psilocin*	4 hydroxy, DMT
Harmaline*	6 methoxy; R_1 forms isopropyl link to C_2 .
5-MT	5-methoxytryptamine
5,6 DHT	5,6 dihydroxytryptamine
5,7 DHT	5,7 dihydroxytryptamine

- Молекула серотонина содержит индольное кольцо и аминогруппу.
- Производные индола широко распространены в природе и обладают значительной биологической активностью.
- LSD-25, N,N-диметилтриптамин — галлюциногены.
- 5-гидрокси диметилтриптамин — буфотенин — сильный яд.

Метод Фалька-Хилларпа

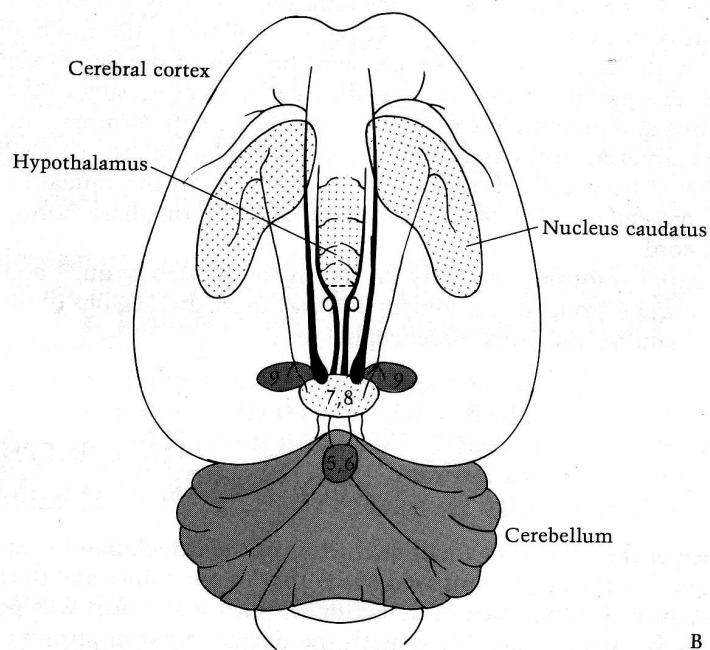


- Картирование серотониновых нейронов и их проекций в мозге *in situ* осуществляется с помощью реакции Фалька (1961) – Хилларпа (1955).
- Серотонин на фиксированных срезах мозга при конденсации с парами формальдегида дает ярко желтый флуоресцирующий продукт.



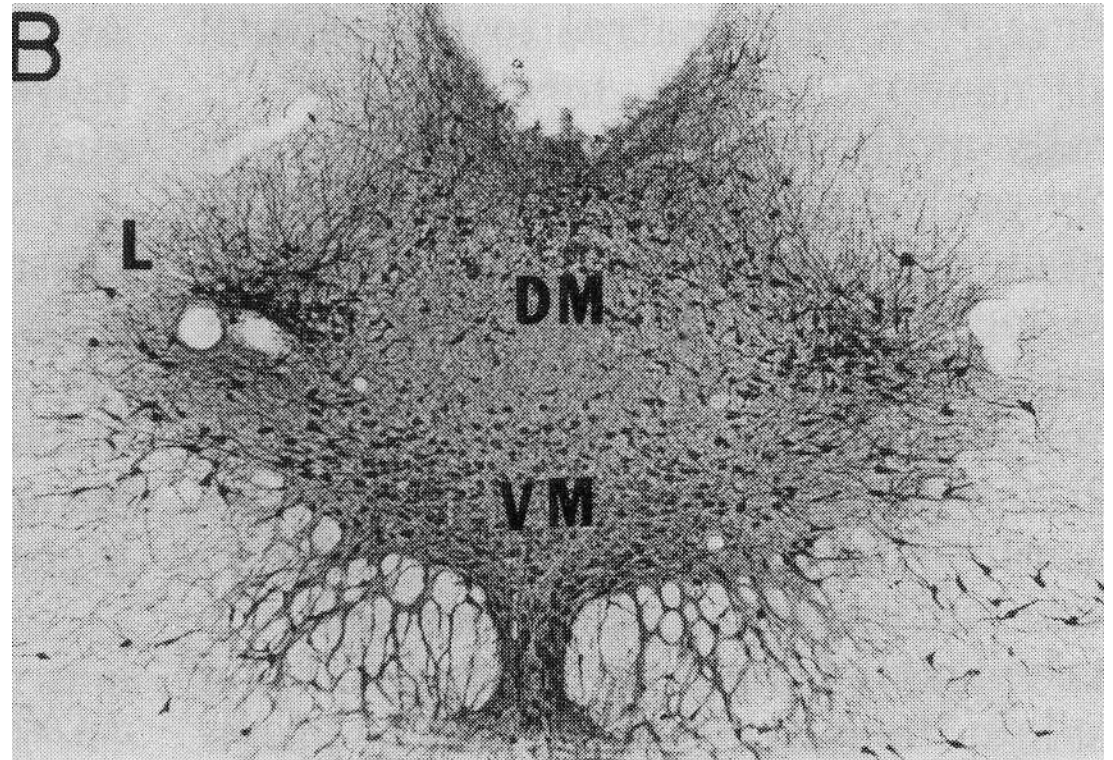
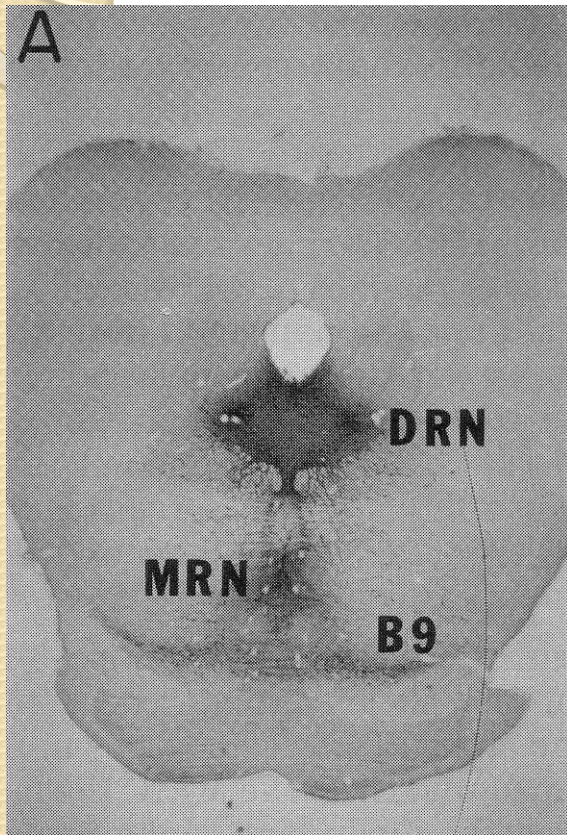
A

Серотониновая система мозга

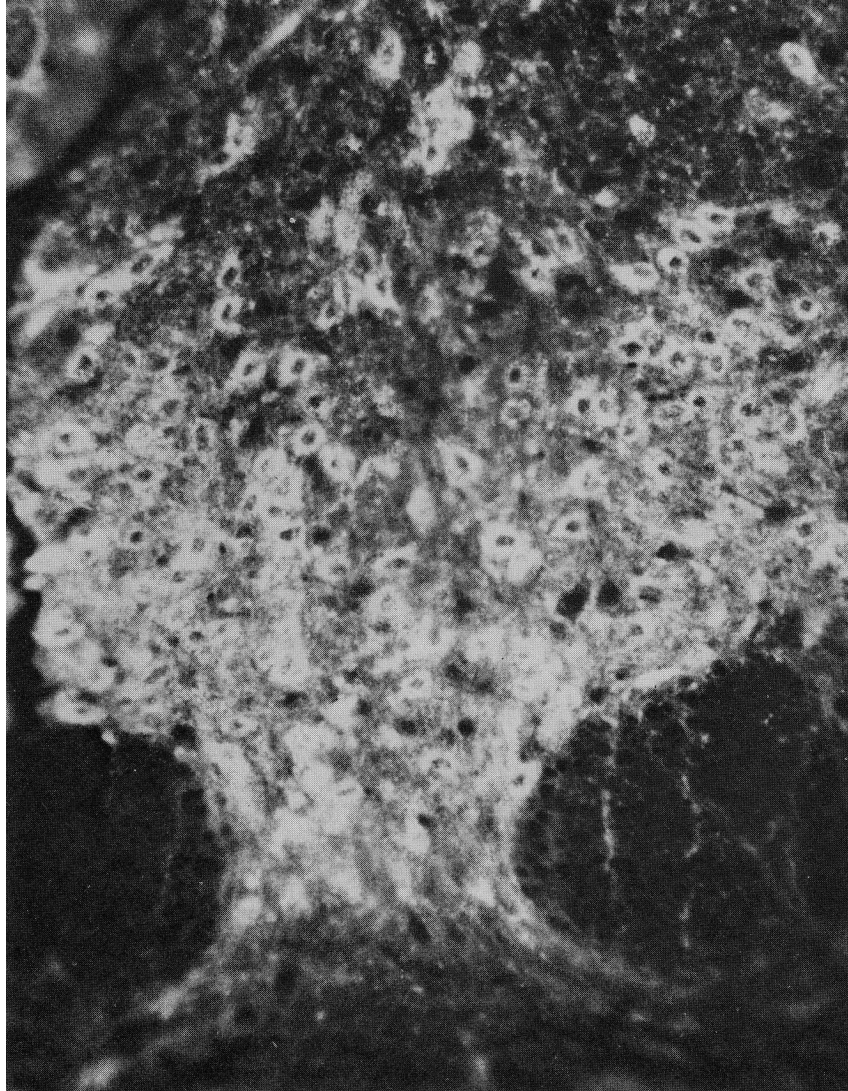


B

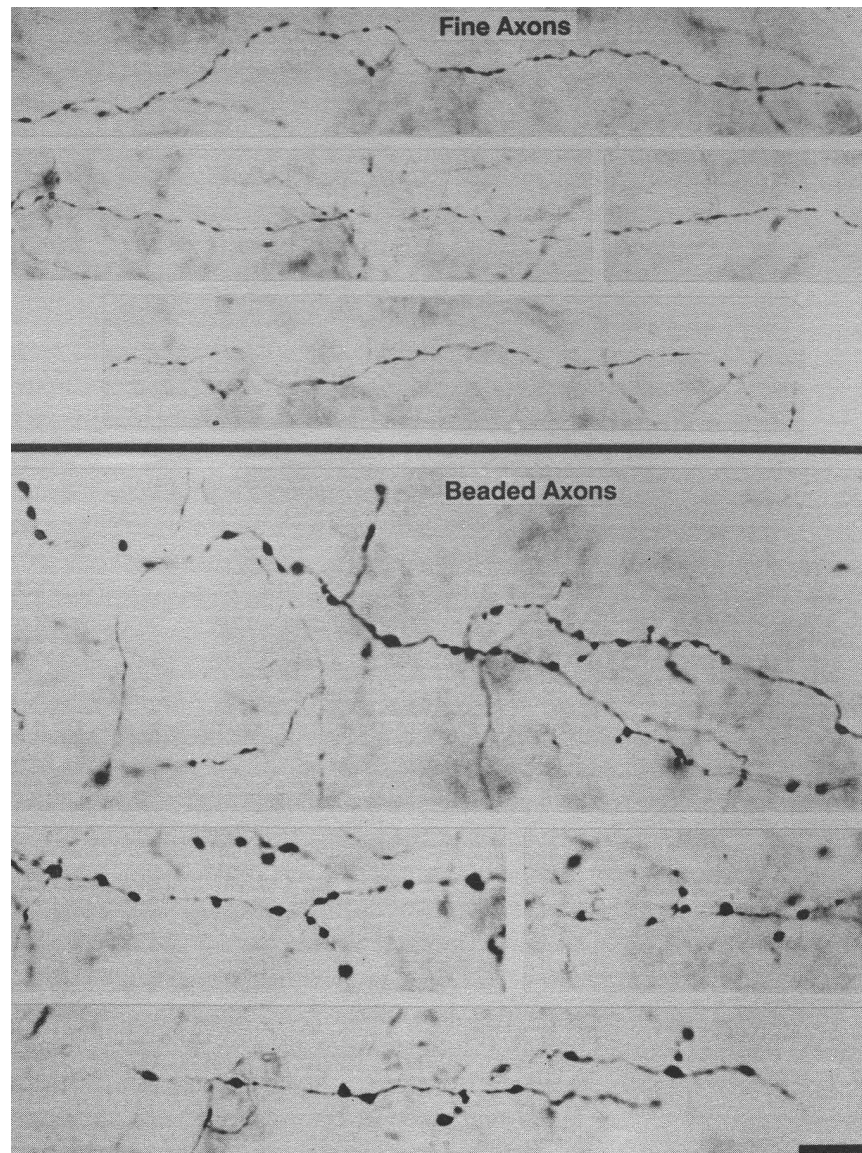
Ядра шва среднего мозга



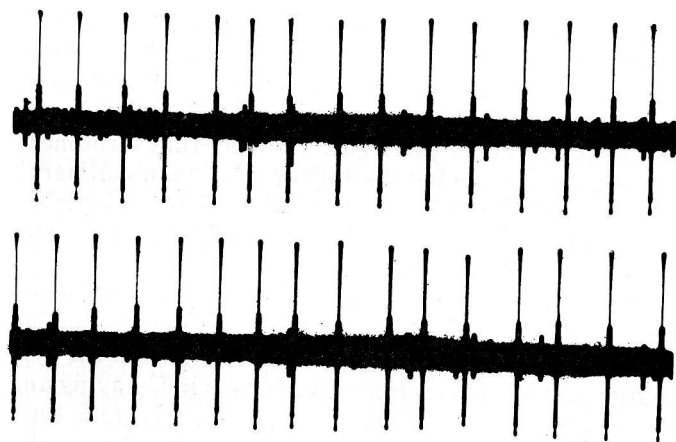
Тела серотониновых нейронов в дорзальном ядре шва среднего мозга



Тонкие и четковидные аксоны в коре мозга крысы

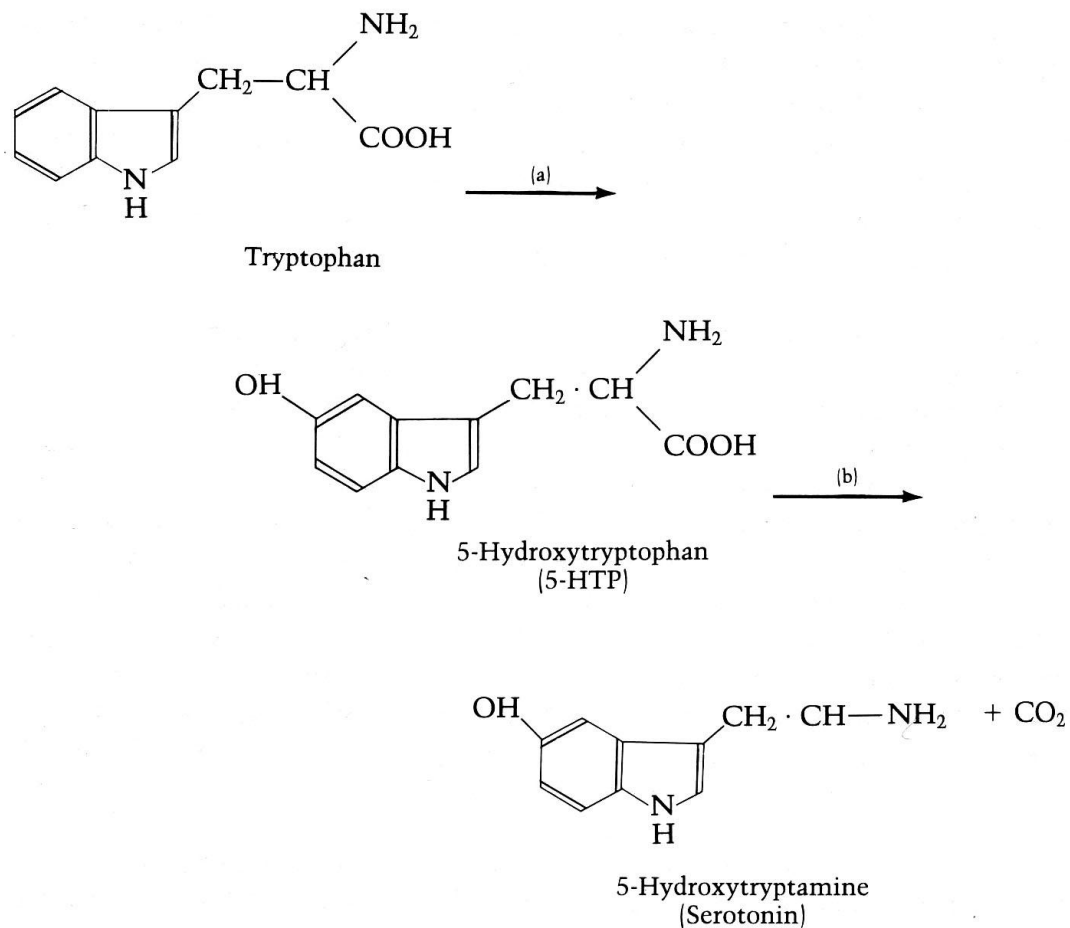


Спайковая активность серотонинового нейрона



- Серотониновые нейроны разряжаются с частотой 1-3 спайка/с.
- Серотониновая система мозга самая экспансивная. На один мм² коры мозга крысы приходит 6 млн серотониновых окончаний (0.5%). Один серотониновый нейрон образует около 500 000 окончаний. Каждый нейрон коры получает 200 серотониновых окончаний.

Синтез серотонина



Enzymatic reaction

Enzyme

Cofactor

(a)

Tryptophan-5-hydroxylase
(EC 1.16.4)

[Tetrahydrobiopterine
molecular O₂
Fe²⁺, NADPH]

(b)

L-Aromatic acid decarboxylase
(EC 4.1.1.28)

Pyridoxal phosphate

Триптофангидроксилаза

- Триптофангидроксилаза (ТПГ, КФ.1.14.16.4) катализирует гидроксилирование триптофана до серотонина – ключевую стадию синтеза медиатора.
- Существуют две изоформы ТПГ: ТПГ-1 и ТПГ-2.
- ТПГ-1 кодируется геном, локализованным в 11 хромосоме человека и 7 хромосоме мыши. Экспрессируется исключительно на периферии: в энтерохромаффинных клетках кишечника, тучных клетках кожи и в эпифизе.
- ТПГ-2 кодируется геном, картированным на 12 хромосоме человека и 10 хромосоме мыши. Экспрессируется в мозге.
- Известна одна функциональная мутация в 11 экзоне гена ТПГ-2, приводящая к замене Arg441/His и Pro447/Arg в тетрамеризационном домене у человека и мыши, соответственно. Эти замены снижают синтез серотонина *in vitro* в клетках PC12.

Две формы триптофангидроксилазы

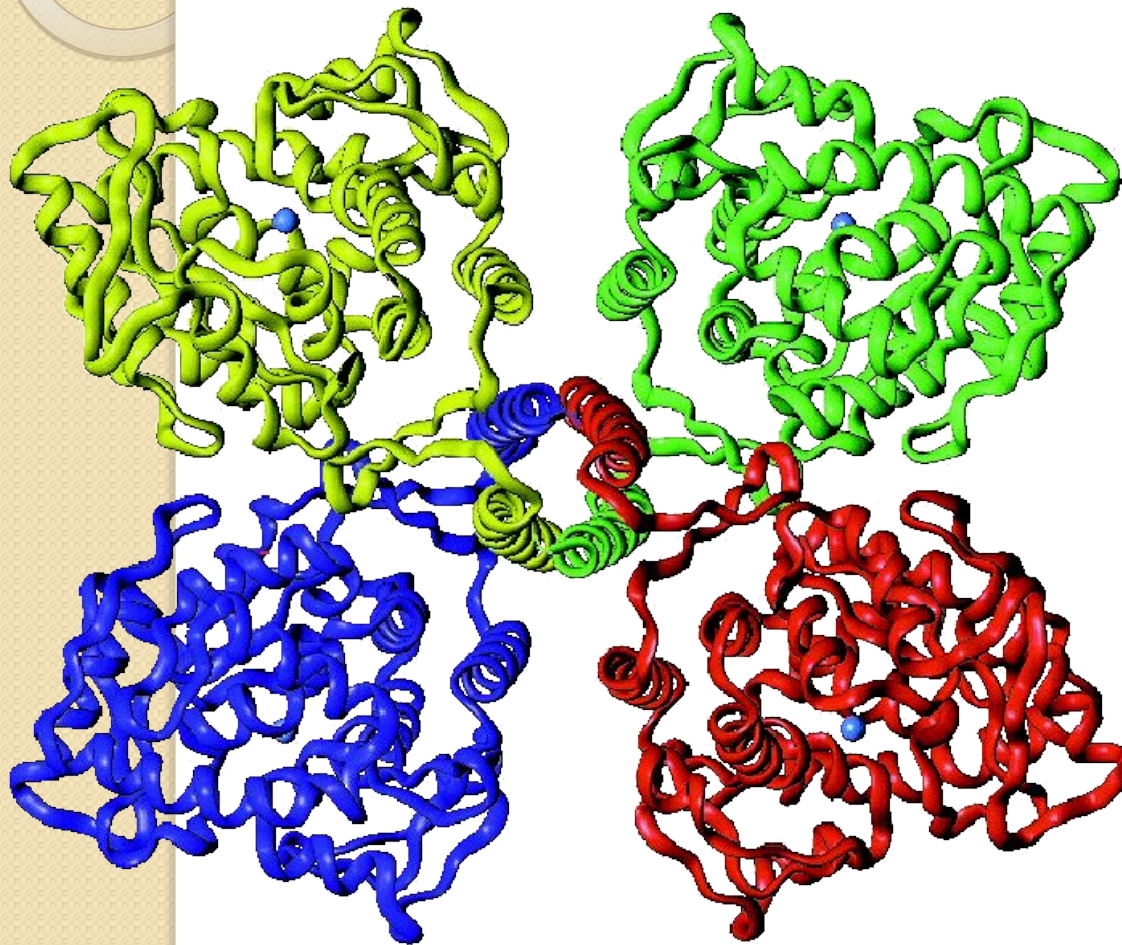
Существуют две формы триптофангидроксилазы, ТПГ1 и

ТПГ2 (Walther et al., 2003). ТПГ2 кодируется геном *tph2* и

Катализирует синтез серотонина в мозге.

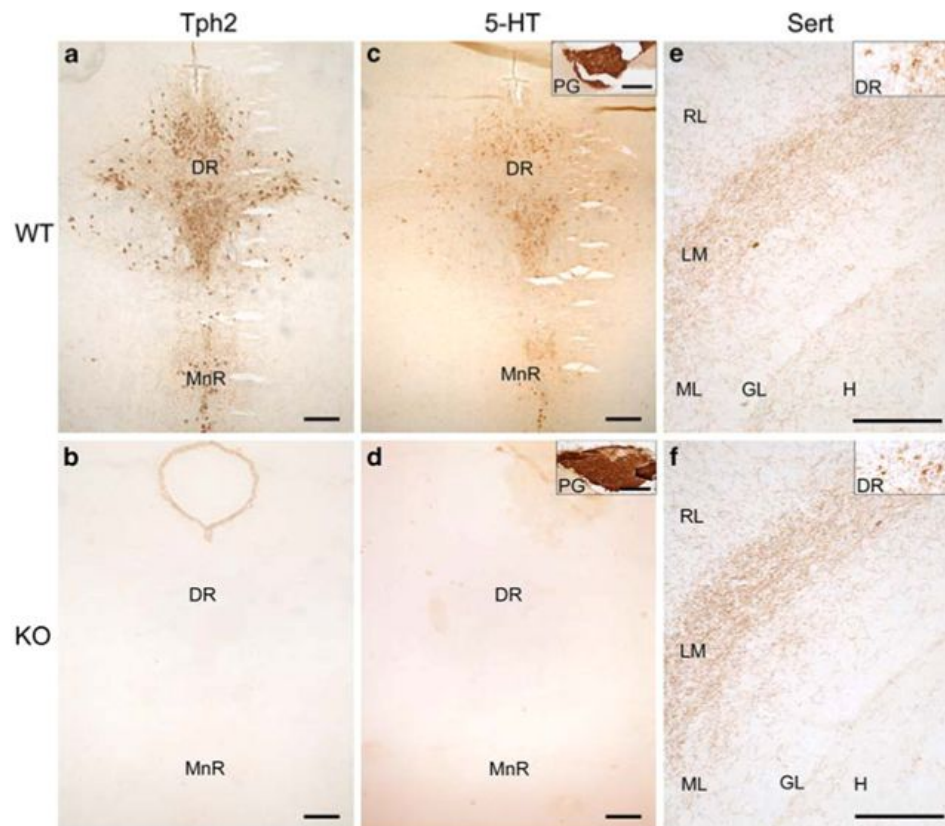
Характеристики	ТПГ1	ТПГ2
Хромосомы человек мышь	11	12
	7	10
Размер гена	≈30 kb	≈120 kb
Число экзонов	11	11
Размер молекулы	444 amino acids	490 amino acids
Экспрессия	Эпифиз, тучные клетки, кишечник	Серотониновые нейроны

C1473G полиморфизм в гене *tph2* мыши найден в 2004 г., а G1463A полиморфизм в гене *TRH2* человека найден в 2005 г. (Zhang et al., 2004,2005)



Обе мутации изменяют экзон 11, вовлеченный в образование четвертичной структуры фермента и снижают скорость синтеза серотонина *in vitro* (Zhang et al. 2004;2005).

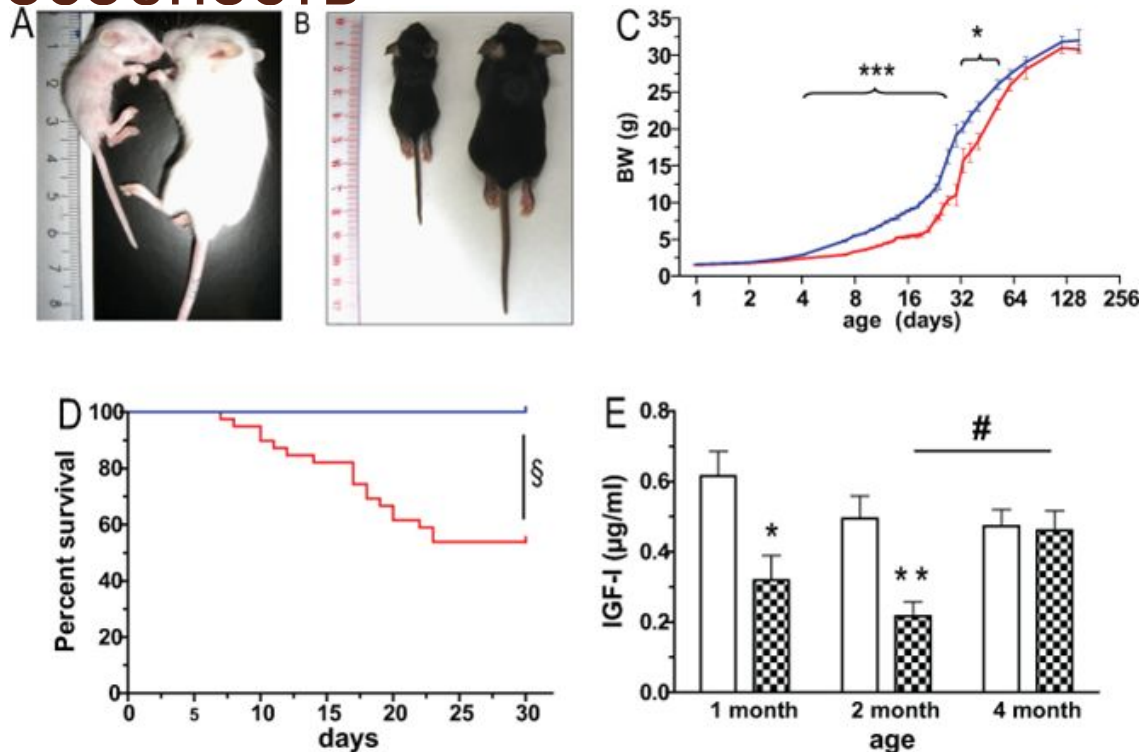
Влияние нокаута гена *mTrph2* на 5-НТ нейроны



from Gutknecht et al., J Neural Transm 2008, 115:1127-1132.

- Нокаут гена *mTrph2* полностью редуцирует Tph2 or 5-НТ в ядрах шва среднего мозга, но не влияет на SERT.
- Следовательно, нокаут не нарушает развитие 5-НТ нейронов (Gutknecht et al., 2008, Alenina et al., 2009).

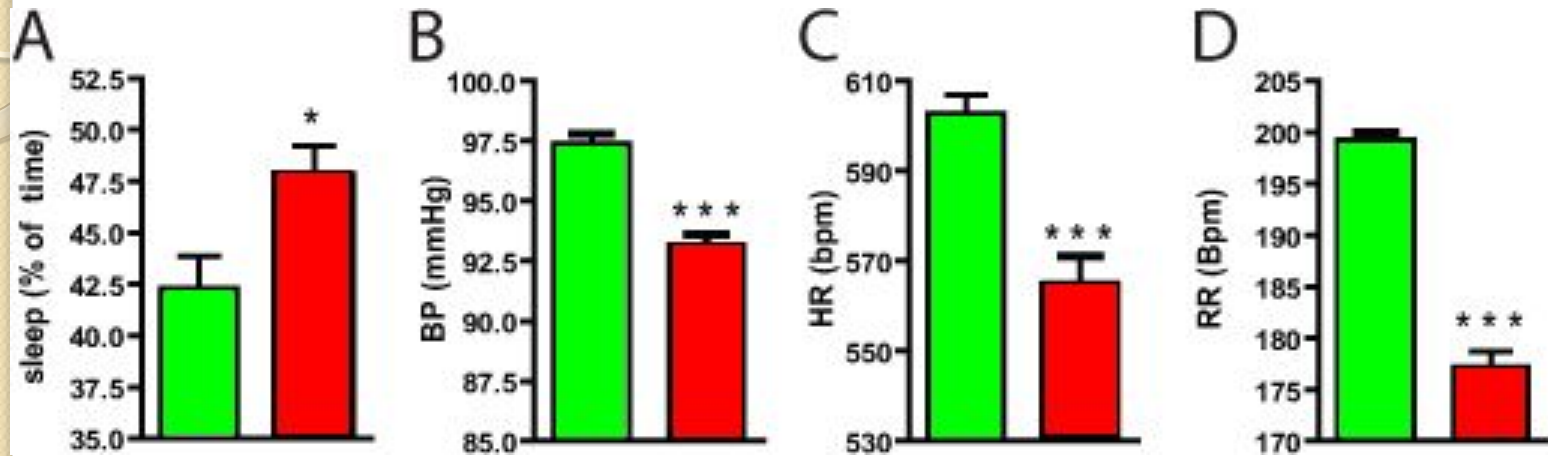
Влияние нокаута гена *mTrp2* на жизнеспособность



from Alenina et al., PNAS 106:10333-10337.

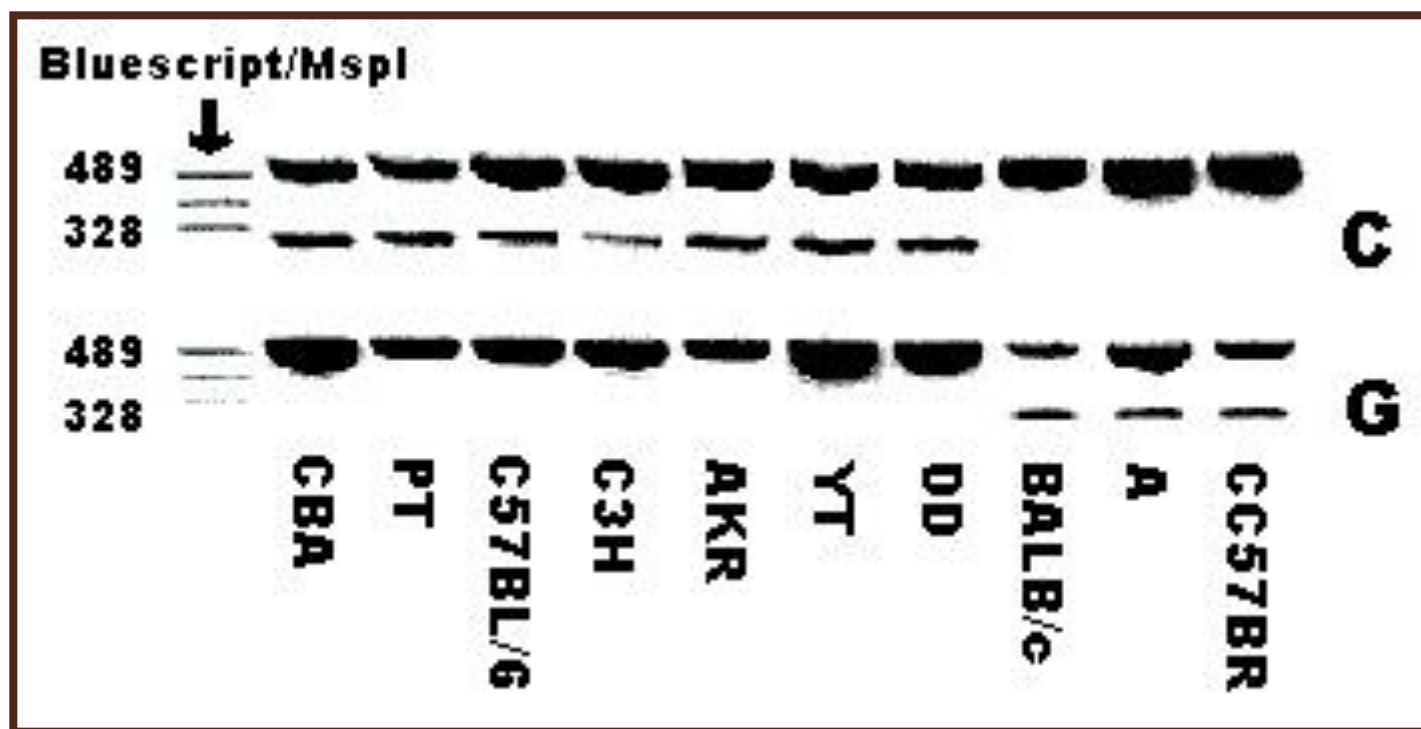
- *Trp2*^{-/-} мыши характеризуются задержкой роста и дефицитом IGF-1 в крови по сравнению с мышами *Trp2*^{+/+}. Эти нарушения нормализуются с возрастом.
- *Trp2*^{-/-} самки мало заботятся о потомстве, что приводит к смерти 48% детенышей.
- Не выявлено изменений в других нейротрансмиттерных системах в мозге у мышей *Trp2*^{-/-} по сравнению с *Trp2*^{+/+} (Alenina et al., 2009).

Влияние нокаута гена *mTrph2* на физиологические функции и поведение

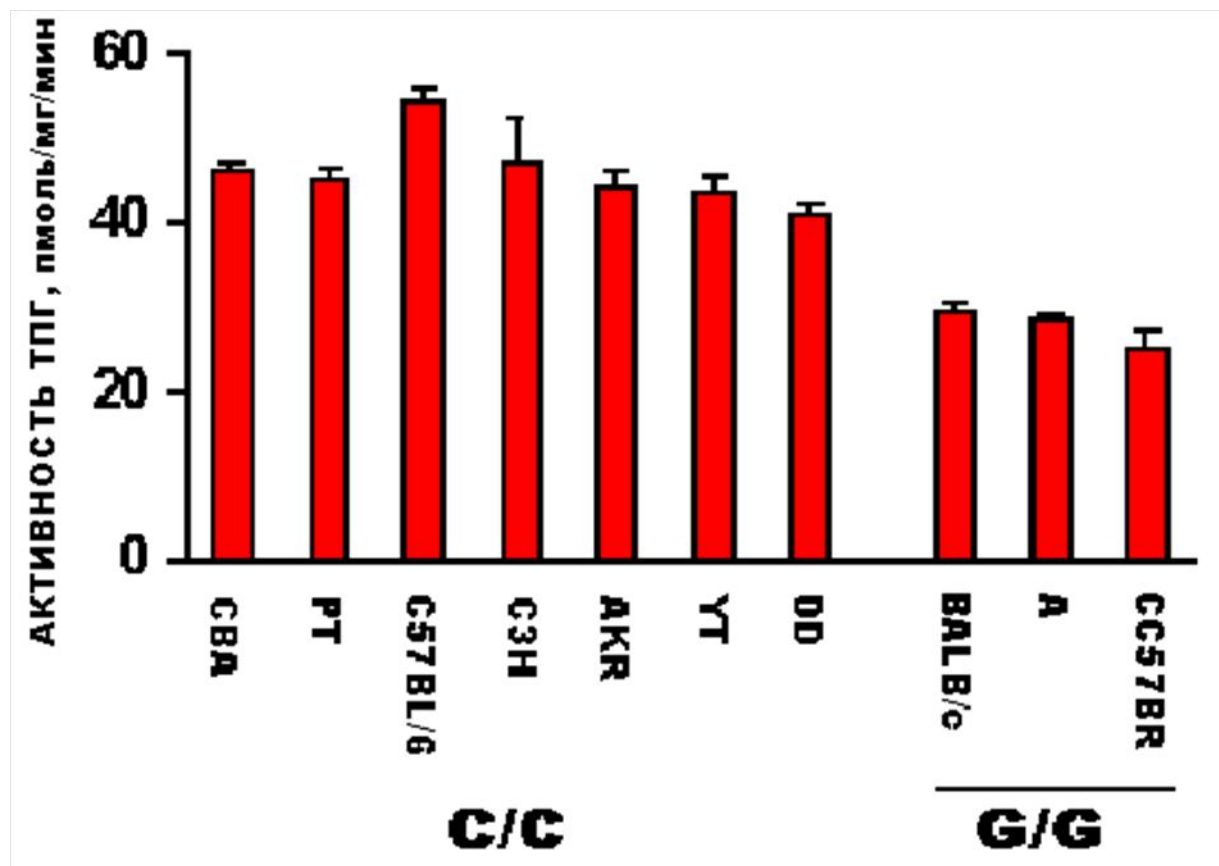


- *Trph2*^{-/-} мыши характеризуются увеличением времени сна, снижением давления, частоты сердечных сокращений и дыхания (Alenina et al., 2009).
- В то же время, *mTrph2* нокаут не влияет на двигательную активность, тревожность и депрессивность (Savelieva et al., 2008).

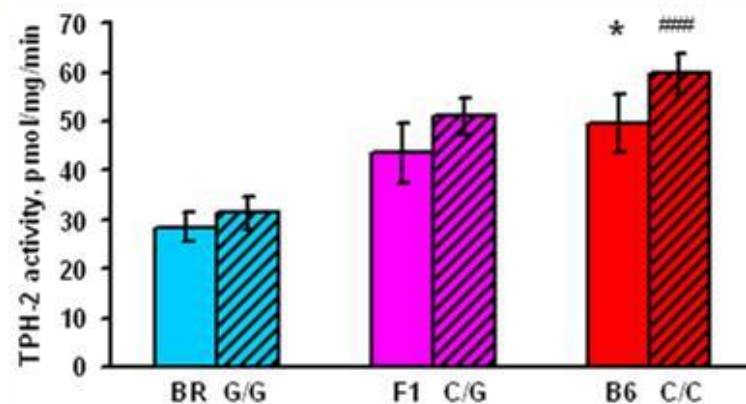
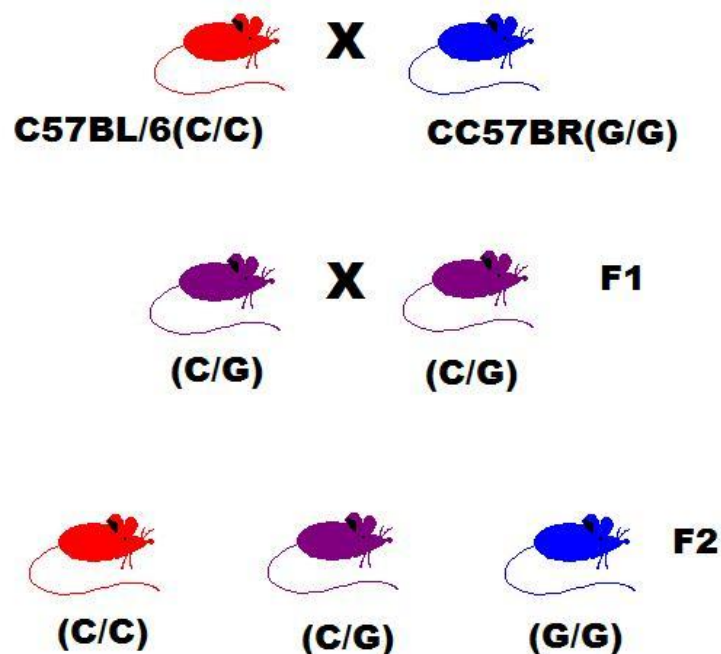
ДНК мышей 10 линий генотипировали с праймерами, специфическими для С или G аллелей. Обнаружено 7 линий с генотипом С/С (Pro) и 3 – с генотипом G/G (Arg)



Активность ТПГ в среднем мозге мышей с генотипом C/C (Pro) вдвое выше, чем с генотипом G/G (Arg)



Сцепление C1473G полиморфизма с активностью ТПГ2 в мозге мышей F2 между линиями C57BL/6 и CC57BR



Активность ТПГ2 в мозге мышей F₂ генотипа C/C вдвое выше, чем у мышей G/G. Активность фермента у мышей F₂ генотипов G/G, C/G и C/C не отличается от таковой у CC57BR, F₁ и C57BL/6.

*¹p<0.05 vs BR, ###p<0.001 vs GG.

Распределение полиморфизма C1473G в популяциях диких мышей

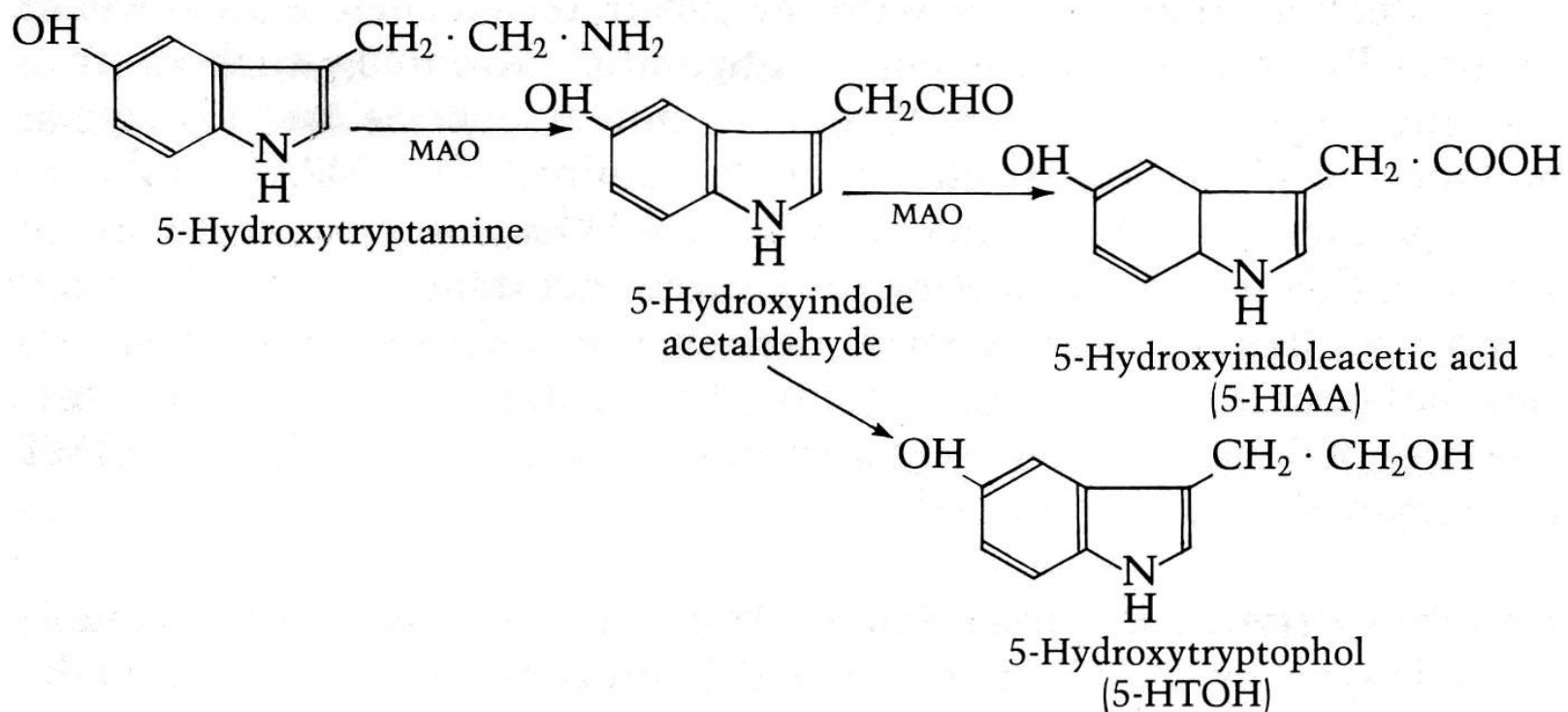
Район	N	C/C	C/G	G/G
Сибирь	35	35	0	0
Москва	10	10	0	0
Армения	11	11	0	0
Калмыкия	19	19	0	0
Итого	75	75	0	0

- (Osipova et al., Genes Brain Behav, 2010).

Регуляция активности ТПГ2

- Изменения активности, вызванные мутациями 11 экзона гена ТПГ2, названы конститутивными.
- Другая изменчивость активности фермента, связанная с обратимым фосфорилированием молекулы фермента, названа регуляторной.
- Единственным механизмом регуляторной изменчивости активности ТПГ2 является обратимое фосфорилирование, катализируемое ПК-II, которое запускается ионами Ca^{+2} .
- В экспериментах *in vitro* показано, что протеинкиназа А способна фосфорилировать молекулы ТПГ2. Однако это фосфорилирование не изменяет активность фермента.
- Ингибиторы – п-хлорфенилаланин и флуоротриптофан.

Разрушение серотонина

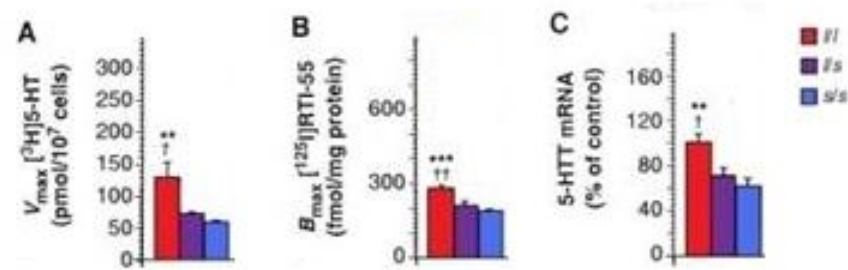
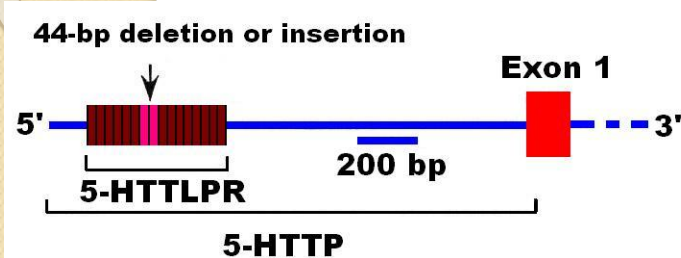


Мыши и люди с генетическим нокаутом гена MAO

А

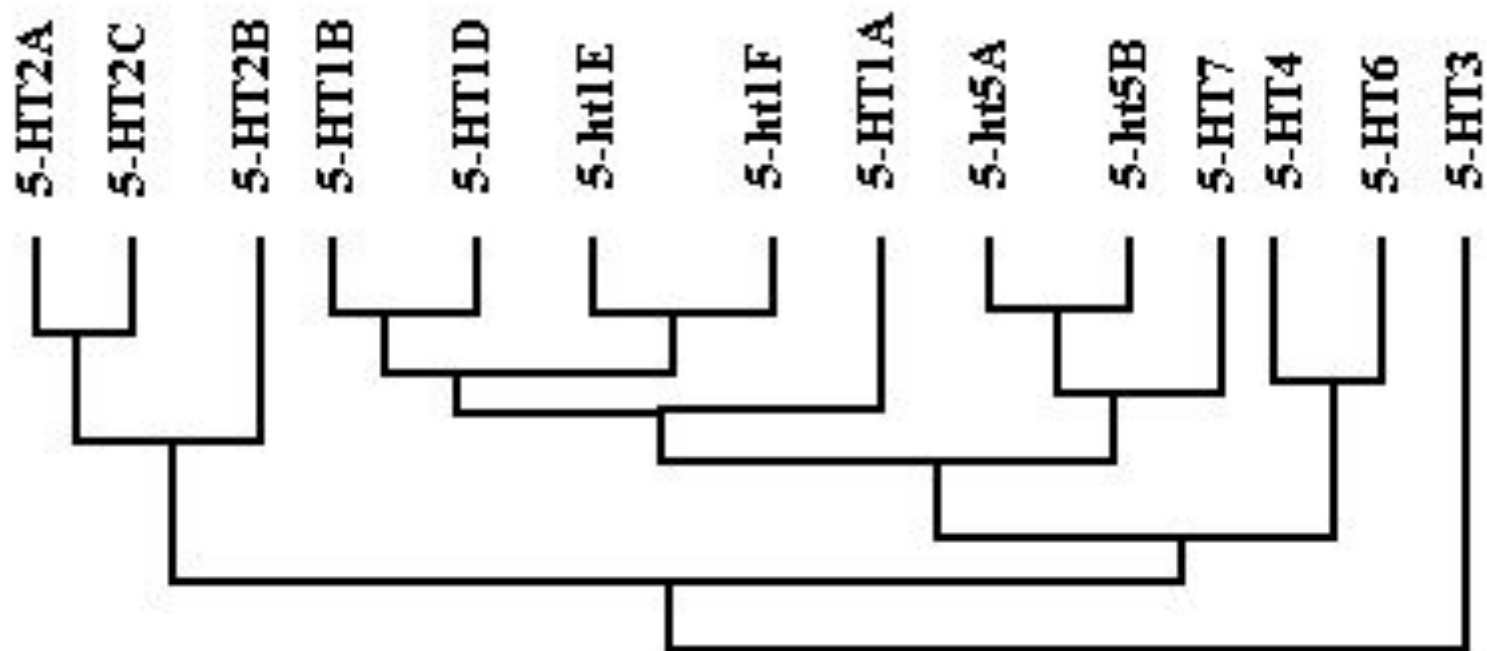
характеризуются высокой агрессивностью.

Полиморфизм 5-HTTLPR промоторе гена транспортера серотонина человека



- 5-HTT является молекулярным фактором пространственной и временной регуляции функции серотонинового синапса и мишенью для антидепрессантов.
- Промотор 5-HTT включает тандемный повтор из 16 (L) or 14(S) элементов (Lesch et al., 1996).
- Короткий вариант снижает экспрессию гена, концентрацию белка транспортера и скорость транспорта серотонина.

Рецепторы серотонина



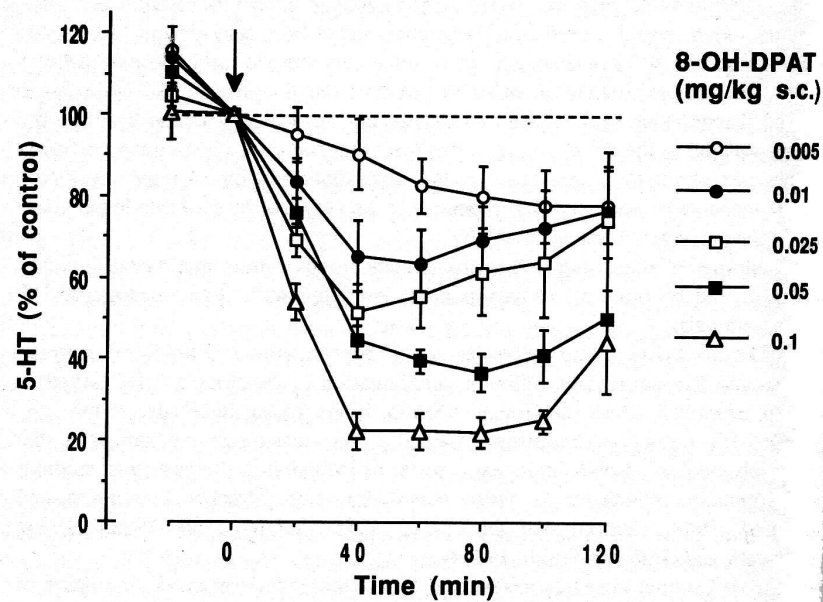
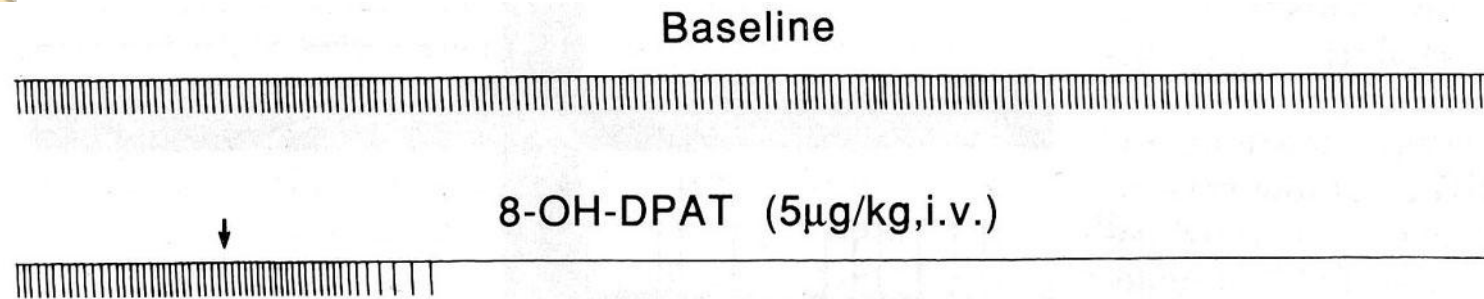
Рецепторы серотонина (механизм)

ТИП	ПОДТИП	СОПРЯЖЕНИЕ
5-HT ₁	5-HT _{1A}	G _i AC↓
	5-HT _{1B}	
	5-HT _{1D}	
	5-HT _{1E}	
	5-HT _{1F}	
5-HT ₂	5-HT _{2A}	G _q Ca ⁺² ↑
	5-HT _{2B}	
	5-HT _{2C}	
5-HT ₃	5-HT ₃	K ⁺ /Na ⁺ каналы
5-HT ₄	5-HT ₄	G _s , AC↑
5-HT ₅	5-HT _{5A}	G _i AC↓
	5-HT _{5B} у человека неактивен	
5-HT ₆	5-HT ₆	G _s , AC↑
5-HT ₇	5-HT ₇	G _s , AC↑

5-HT_{1A} рецептор

- Кодирован безинтронным геном, локализованным в 13 хромосоме мыши и 5 хромосоме человека.
- Является пресинаптическим ауторецептором.
- Агонисты – флетиноксан, буспирон, 8-OH-DPAT.
- Антагонисты – WAY100635.
- Является мишенью для анксиолитиков буспиронового типа.
- Вовлечен в механизм действия трициклических антидепрессантов.
- Нокаутные мыши характеризуются повышенной тревожностью.

Агонисты 5-HT_{1A} рецепторов тормозят спайковую активность серотониновых нейронов и снижают секрецию медиатора



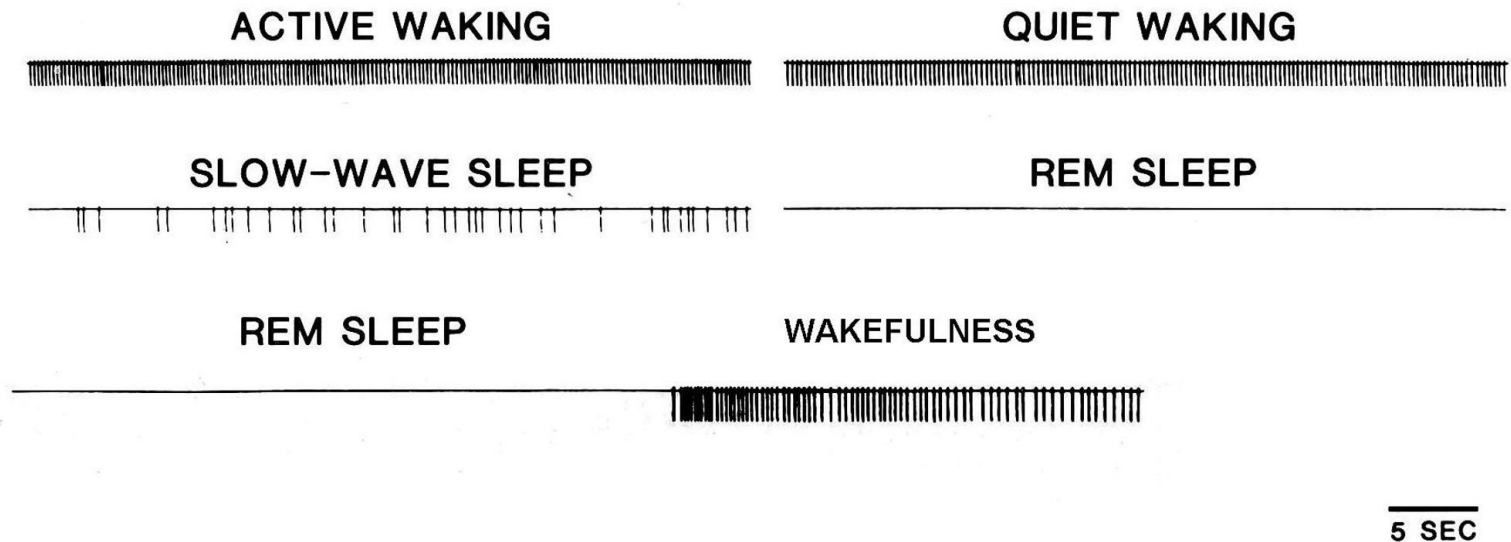
5-HT_{1B} рецепторы

- Кодируются безинтронным геном локализованным на 9 хромосоме мыши и 6 хромосоме человека.
- Пресинаптические рецепторы. Регулируют (ингибируют) секрецию серотонина, ацетилхолина, дофамина, глутамата и ГАМК.
- Агонисты 5-HT_{1B} рецепторов усиливают локомоторную активность, секрецию пролактина и кортикостерона, гипофагию и гипотермию.
- Ген 5-HT_{1B} рецептора был первым геном рецепторов, для которого получен нокаут в 1994.
- Мыши с нокаутом по гену 5-HT_{1B} рецептора характеризуются повышенной агрессивностью.

5-HT_{2A} рецептор

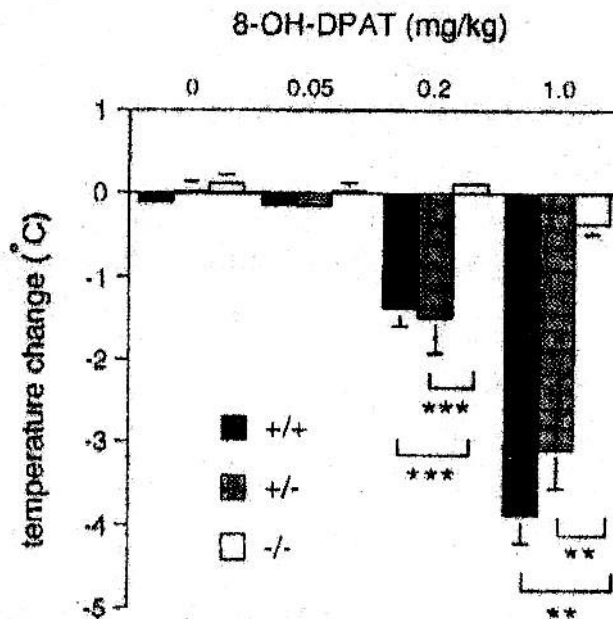
- Кодировается геном, локализованным на 14 хромосоме мыши и 13 хромосоме человека.
- Содержит два интрона.
- Экспрессируется как в мозге, так и на периферии.
- Низкое сродство к агонистам, но высокое сродство к антагонистам серотонина, таким как спиперон, кетансерин, ритансерин.
- Имеет сайты для связывания агонистов (DOI) и антагонистов.
- Является мишенью типичных и атипичных нейролептиков и галлюциногенов.
- Вовлечен в механизм депрессии и других психопатологий.
- Агонисты вызывают стереотипию - синдром мокрой собаки и встряхивания головы.

Серотонин и сон



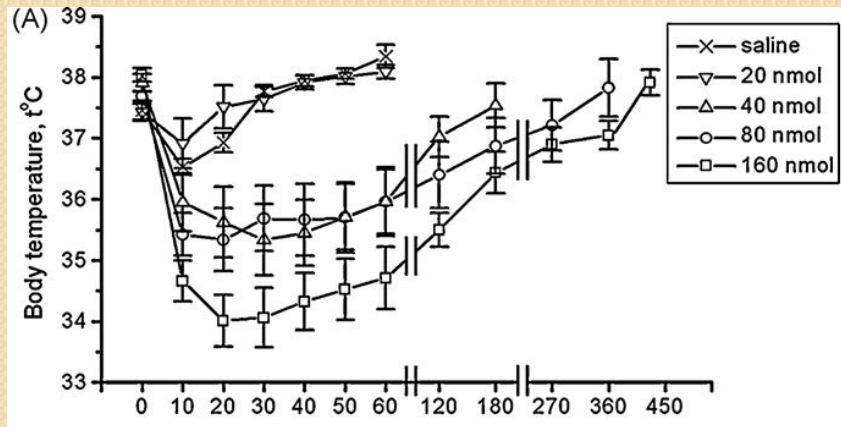
- М. Jouvet (1967-1969) впервые показал, что снижение уровня серотонина ведет к нарушению сна. Блокада синтеза серотонина п-ХФА уменьшает длительность медленноволновой и парадоксальной фаз сна. Разрушение серотониновых нейронов и их окончаний вызывает бессонницу.
- Во время медленноволновой фазы наблюдается снижение частоты и потеря регулярности спайковой активности серотониновых нейронов в ядрах шва.
- Во время парадоксального сна наблюдается полное отсутствие спайковой активности. При пробуждении наблюдается активация серотониновых нейронов.

5-HT_{1A} вовлечены в регуляцию температуры тела

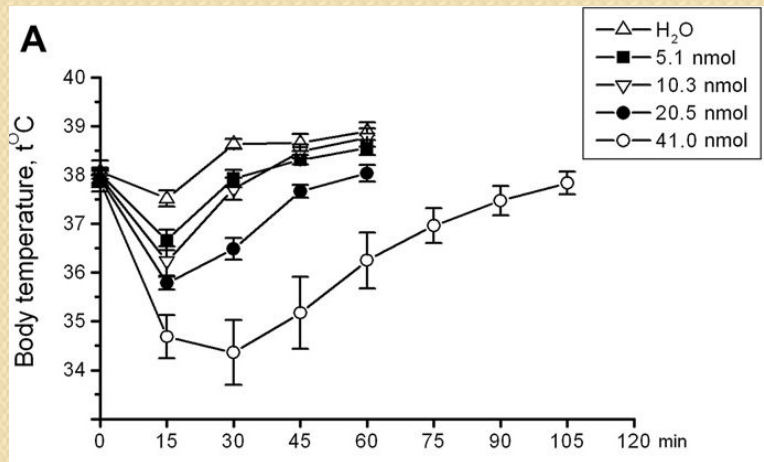


- Агонист 5-HT_{1A} рецептора, 8-OH-DPAT, вызывает дозозависимое снижение температуры тела у мышей.
- Однако, препарат не оказывает гипотермического эффекта у животных с нокаутом гена 5-HT_{1A} рецептора.

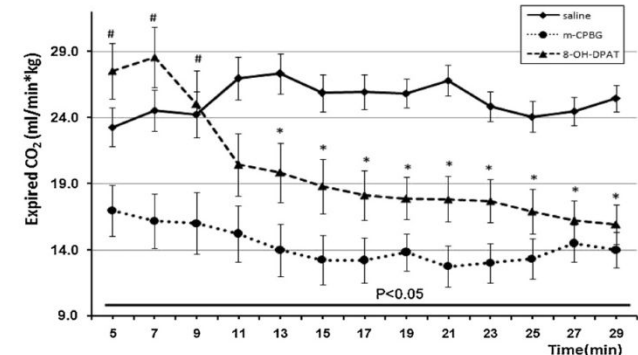
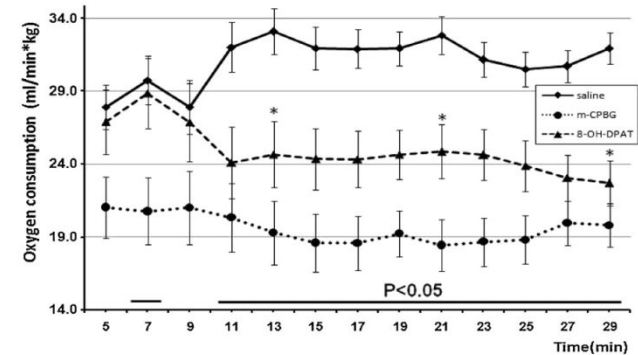
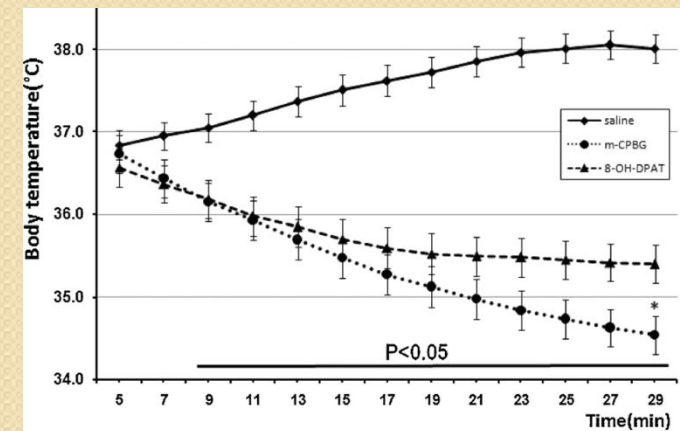
5-HT в терморегуляции



Влияние агониста 5-HT₃ рецепторов m-CPBG на температуру тела мышей

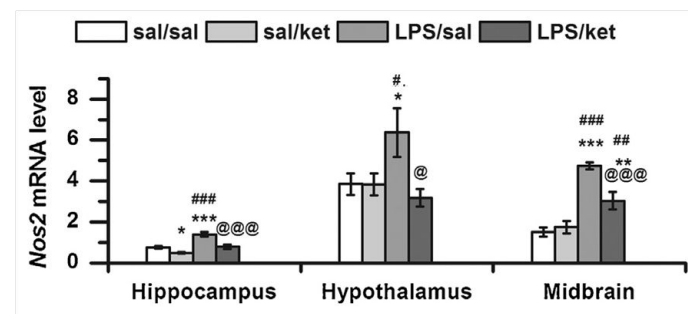
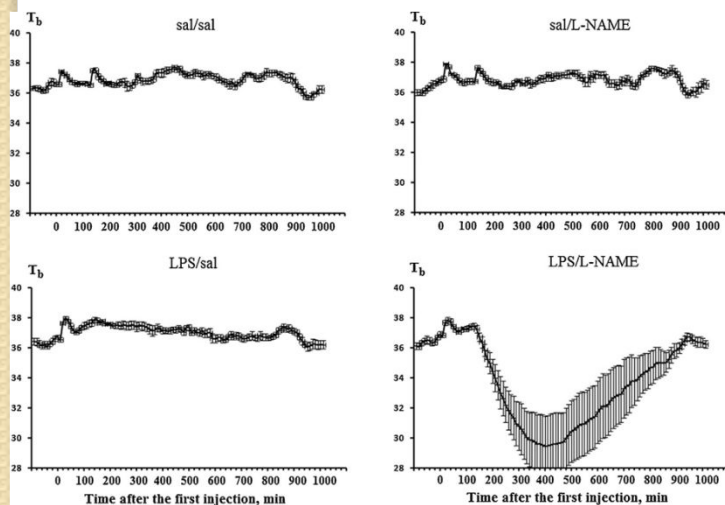
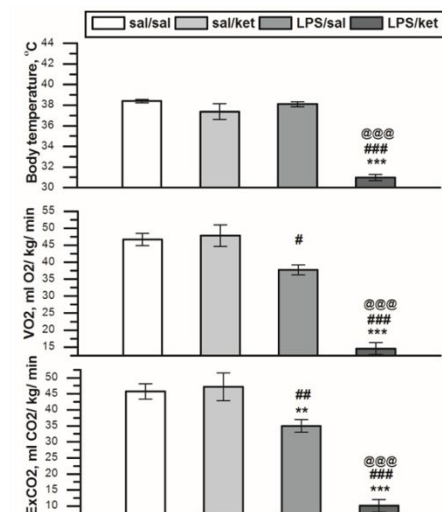
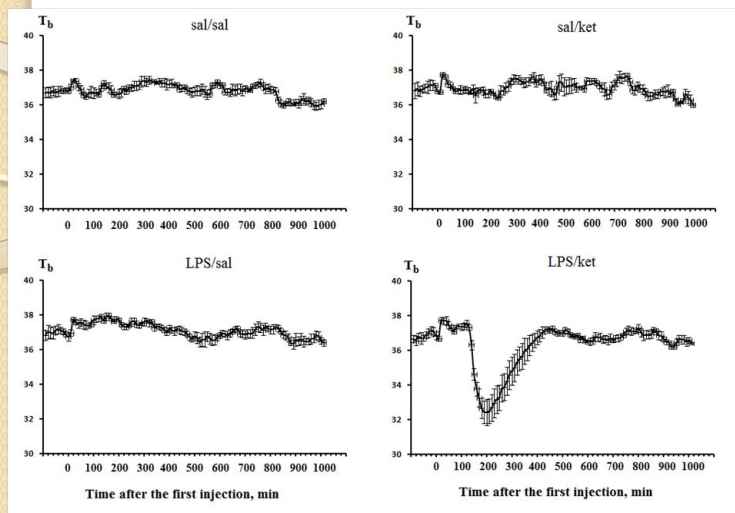


Влияние агониста 5-HT₇ рецепторов LP44 на температуру тела мышей

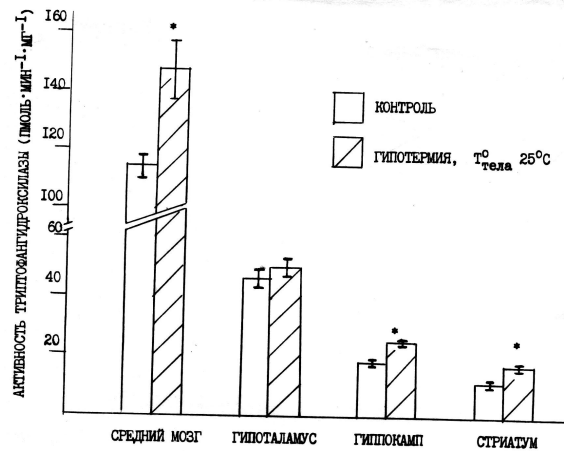


Влияние агонистов 5-HT_{1A} (8OH-DPAT) и 5-HT₃ (m-CPBG) Рецепторов на температуру тела и метаболизм мышей

Участие 5-HT_{2A} рецепторов в регуляции температуры тела у мышей



Серотонин и гипотермия



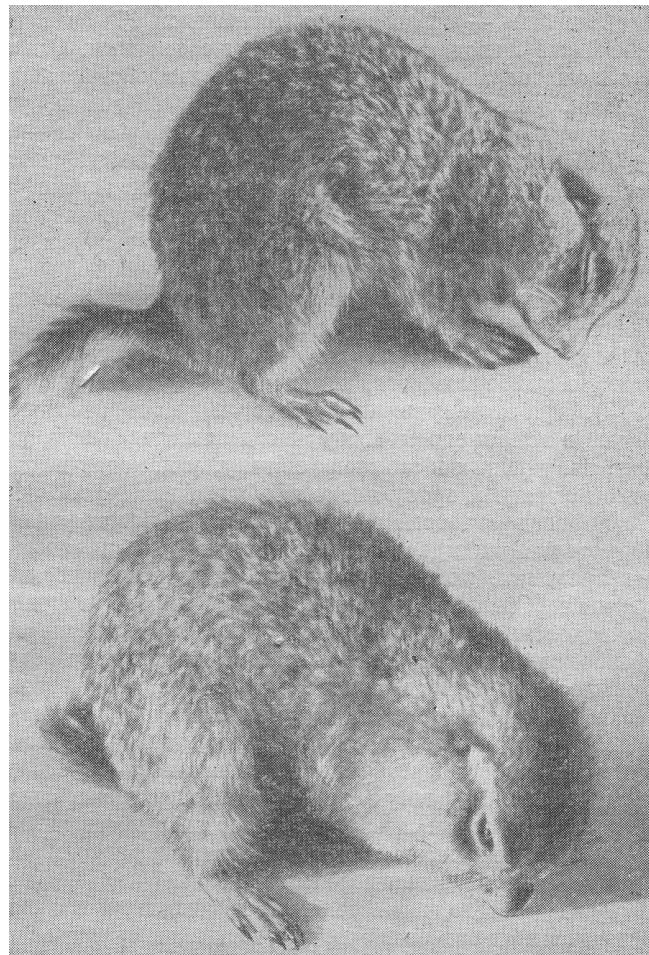
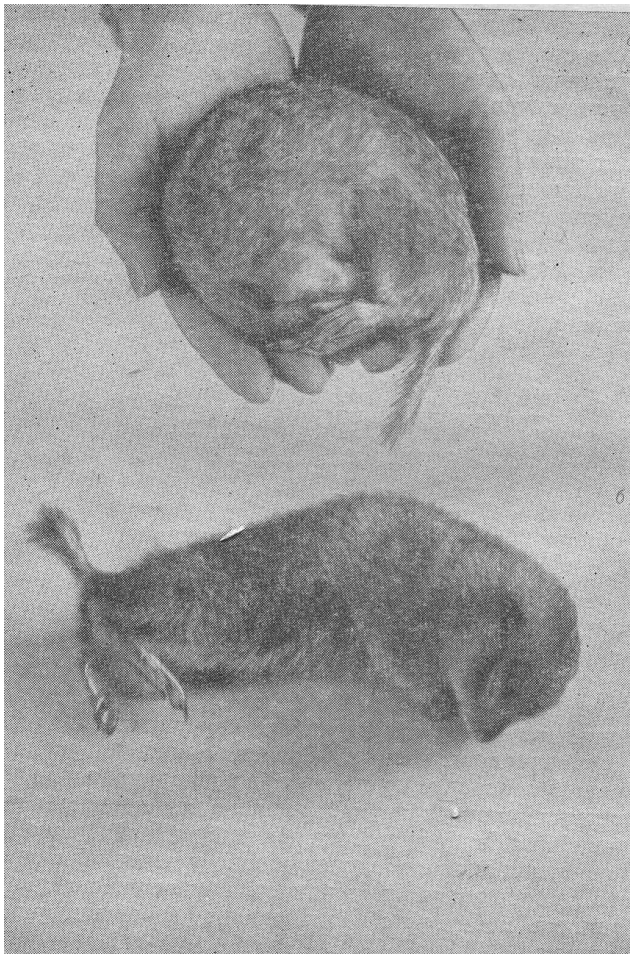
- Глубокая гипотермия, сопровождающаяся снижением температуры тела до $20-25^{\circ}\text{C}$, приводит к обратимой активации ТПГ2 (фосфорилирование).

Зимняя спячка у сусликов



- Уникальная природная адаптация к переживанию неблагоприятных условий – сочетание сна с глубокой гипотермией ($+4^{\circ}\text{C}$).
- На протяжении спячки суслик несколько раз просыпается и снова засыпает.
- Попова Н.К. (1976) впервые установила ключевую роль серотонина в механизме зимней спячки.

Пробуждение от зимней спячки



Блокада синтеза серотонина п-ХФА вызывает пробуждение

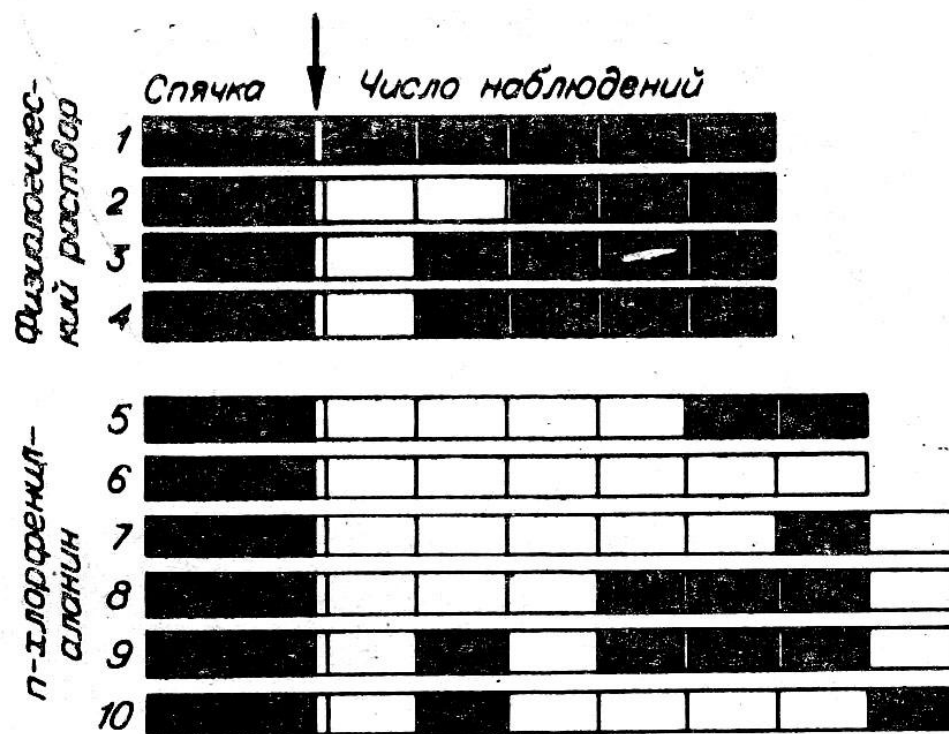


Рис. 26. Влияние *p*-хлорфенилаланина на пробуждение сусликов от зимней спячки (Кудрявцева, 1976). 1—10 — порядковый номер животных; стрелкой указан момент введения препаратов; черные клетки обозначают состояние сна в момент наблюдения; белые — состояние активности.

5-гидрокситриптофан тормозит пробуждение

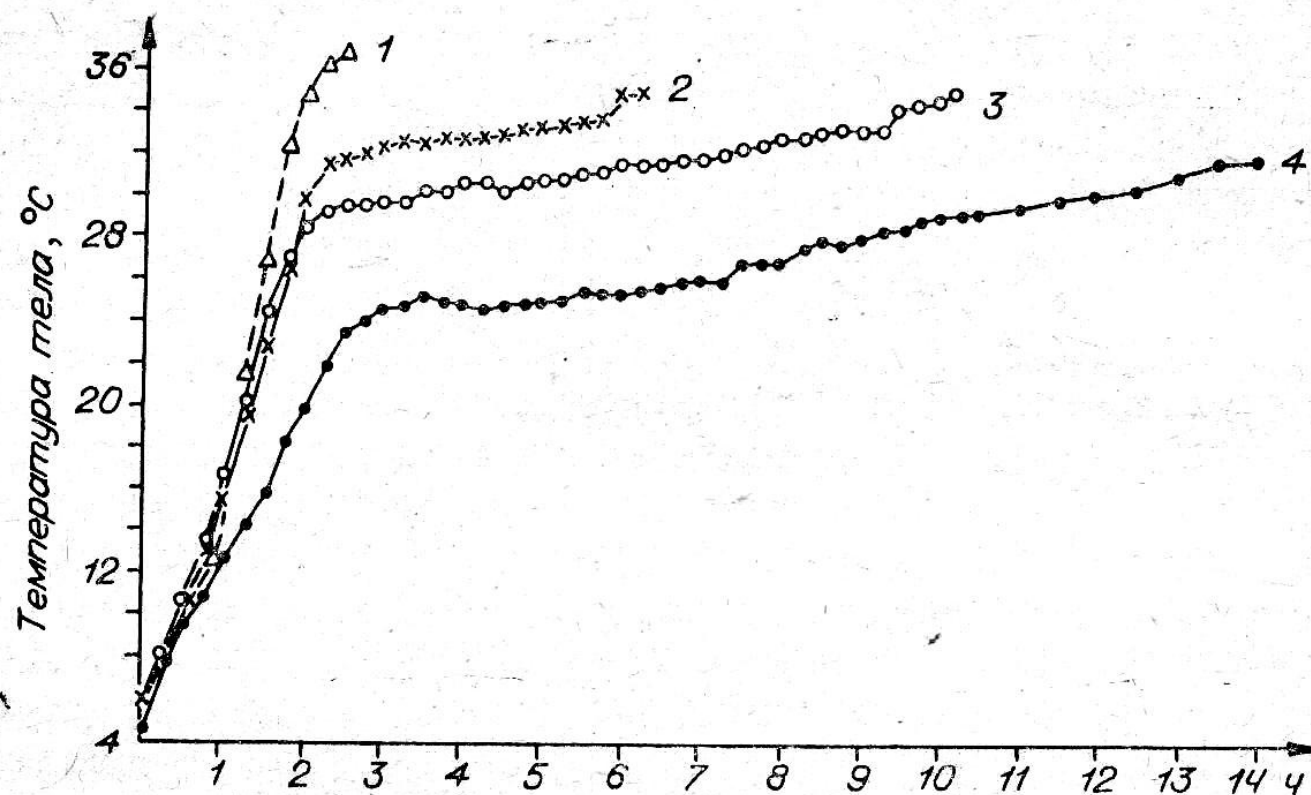
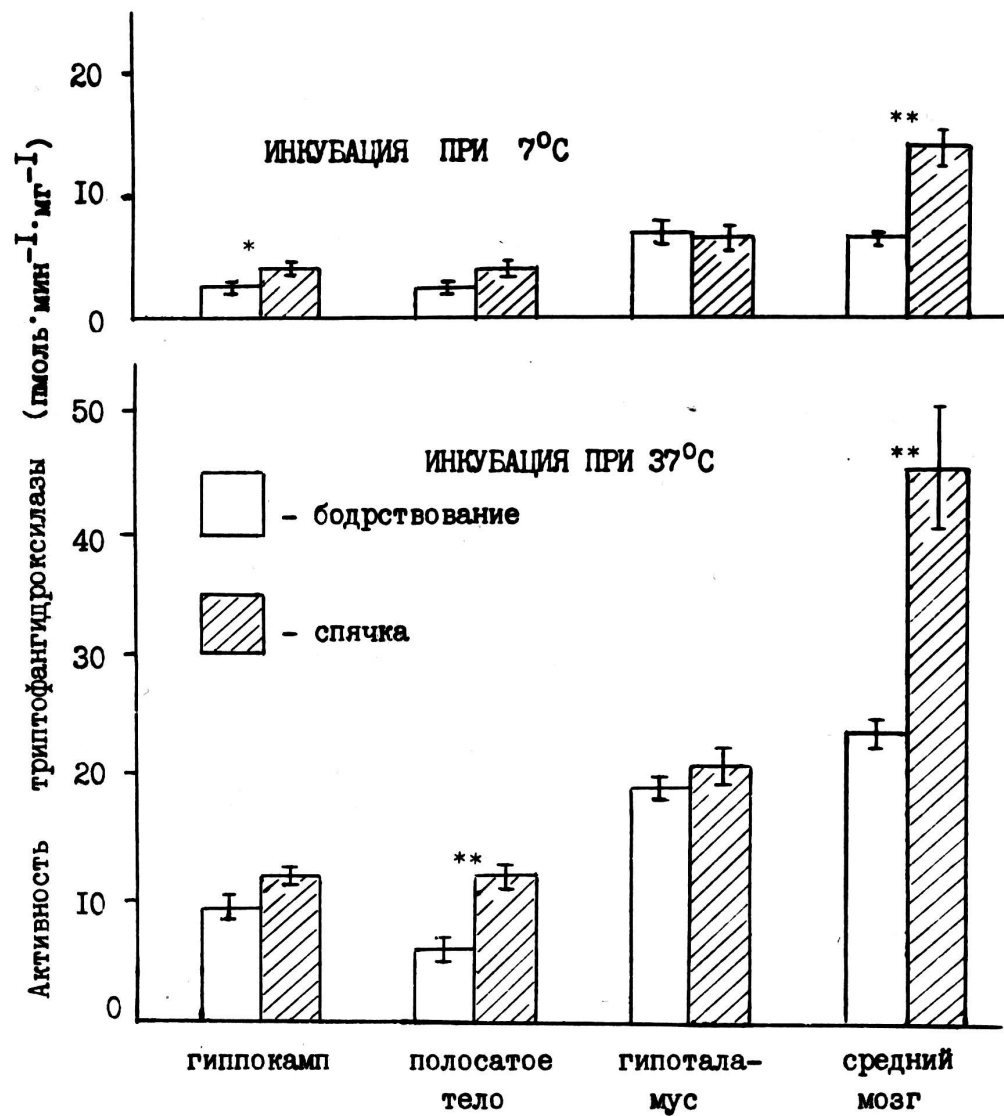


Рис. 27. Влияние различных доз 5-окситриптофана на повышение температуры тела пробуждающихся от зимней спячки сусликов (Попова, Кудрявцева, 1976).

1 — контроль; 2 — 20 мг/кг; 3 — 50 мг/кг; 4 — 100 мг/кг.

Увеличение активности ТПГ-2 у спящих сусликов



ВПАДЕНИЕ В ЗИМНЮЮ СПЯЧКУ АКТИВИРУЕТ ТПГ-2

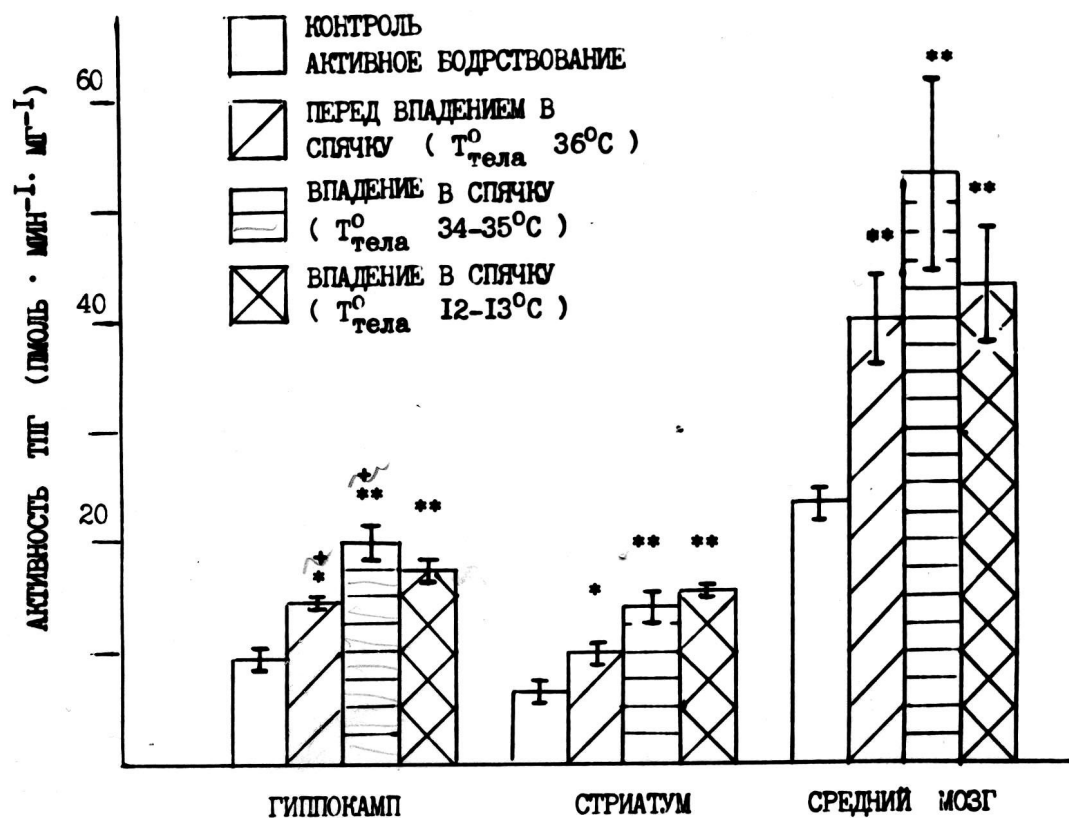


Рис. 8. Активность ТПГ в отделах мозга сусликов, находящихся на разных стадиях подготовки к спячке и впадения в нее.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ по сравнению с контролем;

+ $P < 0.05$ по сравнению с предыдущим состоянием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Серотониновая система мозга является самой экспансивной и полифункциональной.
- Она участвует в регуляции практически всех видов поведения.
- Серотониновая система является ключевой для терморегуляции, сна и зимней спячки.
- Нарушения серотониновой системы связывают с риском патологических форм поведения.
- Серотониновый транспортер является мишенью антидепрессантов.
- Серотониновые рецепторы – мишени для галлюциногенов, нейролептиков и анксиолитиков.