Правительство Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

(СПбГУ)

УДК

Рег. № НИОКТР

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | УТВЕРЖДАЮ  Проректор по научной работе  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_С. В. Микушев  «\_\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_202\_ г. |

ОТЧЕТ

о научно-исследовательской работе

Лаборатория биологической психиатрии

(заключительный)

Руководитель НИР:

гл. науч. сотрудник,

д-р биол. наук \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ А.В. Калуев

Санкт-Петербург 2024

**СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Руководитель НИР, должность, звание, степень | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | А. В. Калуев  (введение, заключение, раздел 1) |
| Отв. исполнитель, должность, звание, степень | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Д. С. Галстян  (введение, заключение, раздел 1,2,3) |
| Исполнители: |  |  |
| младший научный сотрудник | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Н. П. Ильин  (введение, раздел 2, 3,4) |
| Инженер-исследователь | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Н. И. Голушко  (введение, раздел 1) |
| Инженер-исследователь | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | Д. Д. Мартынов  (введение, раздел 1) |
| Инженер-исследователь | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_  подпись, дата | А. С. Лебедев  (введение, раздел 1) |
| Нормоконтроль | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_подпись, дата |  |

**РЕФЕРАТ**

Отчет 22 с., 1 рис., 4 табл., 42 источн.

Исследование эффектов фармакологических препаратов антидепрессантного и нормотимического свойств на нейрональный сигналинг у *Danio rerio*.

На данный момент сферами интереса лаборатории являются трансляционная нейробиология и биологическая психиатрия, среди которых особенно выделяются разработка и изучение новых моделей заболеваний центральной нервной системы, создание новых скрининговых платформ, поиск и определение эффектов существующих фармакологических препаратов, трансляция патологических механизмов между видами.

Особый интерес в работе лаборатории представляет использование *Danio rerio*, как ключевого модельного организма. Зебраданио (*Danio rerio*) является перспективным организмом для исследования различных патологий центральной нервной системы, включая комплексные психические расстройства, такие как депрессия и шизофрения. Высокая физиологическая и генетическая гомология, а также простота устройства нервной системы, обеспечивают высокую эффективность использования данного организма в доклиническом скрининге психоактивных веществ, а также позволяет изучать эволюционно консервативные для позвоночных патогенетические элементы расстройств центральной нервной системы. Лаборатория является одной из ведущих в мире и России по данному направлению деятельности.

Также, в лаборатории разрабатываются и внедряются в практику новые модели расстройств центральной нервной системы (ЦНС) и поведенческие тесты, включая модели депрессии, тест на поведение схожее с «отчаянием», нейродегенеративные модели. Изучается возможность использования индивидуальных характеристик организмов для подбора оптимального метода терапии (персонализированная медицина).

В этом году лаборатория сосредоточилась на исследовании влияния фармакологических препаратов антидепрессантного и нормотимического свойств на нейрональную активность и поведение *Danio rerio*.

Таким образом, в рамках исследования по НИР, лаборатория способствует созданию новых лекарственных средств для лечения психических и неврологических расстройств - как путем изучения патогенеза заболеваний мозга, так и путем поиска и тестирования новых эффективных соединений.

**СОДЕРЖАНИЕ**

Оглавление

[ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5](#_Toc184638458)

[ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 6](#_Toc184638459)

[ВВЕДЕНИЕ 7](#_Toc184638460)

[1 **Обоснование исследования** 10](#_Toc184638461)

[**2 Материалы и методы** 11](#_Toc184638462)

[3 **Результаты исследования.** 14](#_Toc184638463)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 17](#_Toc184638464)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 19](#_Toc184638465)

# ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

|  |  |
| --- | --- |
| Зебраданио | - русское название рыб Danio rerio. |

# ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

|  |  |
| --- | --- |
| ТНА | - тест незнакомого аквариума |
| ТПХ | - тест подвешивания за хвост |
| ЦНС | - центральная нервная система |
| GCaMP6s | - (Genetically Encoded Calcium Indicator, GCaMP) шестого поколения, модификацию "s" (slow, медленный) |

# ВВЕДЕНИЕ

Стресс является главным фактором патогенеза ЦНС, а связанные со стрессом аффективные, воспалительные и нейродегенеративные расстройства - наиболее распространенными заболеваниями планеты. Например, по данным Всемирной Организации Здравохранения, тревоге и депрессии подвержены 15-25% населения мира. Таким образом, лечение и профилактика данных расстройств является одной из центральных задач современной биомедицины и нейротехнологий. Ежегодные затраты на лечение психических и неврологических заболеваний мозга существенны, и составляют до 0.25-0.5% валового национального продукта экономически развитых стран мира. По статистике МЗ РФ за последние 10 лет, депрессивные и маниакальные расстройства чрезвычайно распространены в России. Поэтому лечение данных расстройств является не только актуальной биомедицинской проблемой, но и важнейшей социально-экономической задачей для страны. В то же время, главными проблемами при лечении расстройств ЦНС являются их малоизученная нейробиологическая природа, устойчивость к терапии, хронический характер, высокий уровень коморбидности с другими заболеваниями, а также отсутствие эффективных терапевтических препаратов. Также отмечаются недостаточность новых экспериментальных моделей и системных подходов к пониманию всего спектра факторов патогенеза, и необходимость инновационного поиска принципиально новых перспектив их терапии. Поэтому выяснение механизмов, задействованных при лечении данных заболеваний представляет собой также и важную биологическую фундаментальную задачу. С учетом отсутствия (за последние 50 лет) концептуального прогресса в поиске новых средств терапии, решение данной научной задачи является крайне значимым.

Зебраданио – стремительно набирающий популярность модельный объект, который активно используется в международной литературе для поиска, валидации и оптимизации доклинического скрининга новых лекарственных препаратов. Ежегодно публикуются сотни статей, где зебраданио используются как валидная и перспективная модель всех известных физиологических систем человека, в том числе сердечно-сосудистых, эндокринных, метаболических, кожных, скелетных, мышечных, гастроинтестинальных и респираторных систем, дополнительно к сотням публикаций ежегодно в международной печати по зебраданио, как модельного объекта при изучении центральной нервной системы и ее нейрофармакологической модуляции. зебраданио являются высоко-гомологичными в генетическом и физиологическом смысле по отношению к человеку. Кодирующие генные последовательности обладают 71,4% гомологией, а ключевые части генов, отвечающие за связывание с лигандами – 75-100% гомологией. 82% генов заболеваний человека имеют четкие гомологи у зебраданио. Анализ гомологии генов регулирующих аддикцию (наркотическую зависимость) указывает на общую гомологию до 84% между зебраданио и человеком, в том числе среднюю гомологию 89% гомологичных последовательностей белковых продуктов. Многие белки-мишени демонстрируют 100% гомологию с зебраданио. Системные исследования препаратов с кардиоваскулярной активностью у человека обнаруживают консервативность более 95% у зебраданио. От 76 до 96% препаратов с реполяризационной токсичностью у человека, обнаруживает аналогичную активность у зебраданио. Специфичность окулярнотоксичных эффектов фармакологических препаратов на Danio rerio достигает 75-100% по сравнению с клиническими эффектами.

При этом, зебраданио являются особенно пригодными к использованию в нейровизуализационных исследованиях и, в частности, могут быть использованы для цельномозговой визуализации нейрональной активности. В проекте предлагается использовать зебраданио для нейровизуализации путей, ответственных за фармакологические функции препаратов антидепрессантного, противотревожного и противовоспалительного спектра. Долгосрочной целью данного направления исследований является разработка новых методов терапии аффективных расстройств, за счет определения центральных нейрональных путей, ответственных эффекты современных лекарственных средств. Проект способствует достижению этой цели посредством определения эволюционно-консервативных нейрональных путей, активность которых можно будет корректировать при помощи новых фармакологических и физиологических воздействий. Планируемый к использованию метод визуализации нейрональной активности белок GCaMP6s является полностью адаптированной к использованию на зебраданио технологией, в том числе разработаны генетические модификации зебраданио экспрессирующие GCaMP6s и в нейронах. Предлагаемые к использованию методы, являются новейшими методиками и их применение в биологической психиатрии и психофармакологии еще не развито на мировом уровне. Реализация проекта может способствовать внедрению новой методологии международного уровня в постоянное использование коллективом, что в долгосрочной перспективе положительно скажется на научной результативности.

Возглавляет работу лаборатории д.б.н., профессор РАН Калуев А.В. - признанный специалист в области биологической психиатрии, автор более 400 работ (h-индекс 81 по данным Google Scholar). С 2015 года лабораторией опубликовано более 150 статей в рецензируемых международных журналах, что составляет порядка 30% от общего числа статей ИТБМ. Данные работы были процитированы более 26000 раз. В случае с исследованиями, посвященным зебраданио, коллектив является ведущей лабораторией по числу публикаций, опубликованных с 2016 г. как в отечественной науке, так и в международной. Коллектив лаборатории состоит в основном из молодых специалистов (все кроме руководителя младше 30 лет), активно привлекаются к научной работе студенты. Лаборатория активно привлекает стороннее финансирование, так коллективом получены следующие гранты (работы по данным проектам не включены в данный отчет по НИР):

Грант РФФИ 16-04-00851 «Выявление принципиально нового класса генов, регулирующих функции мозга при стрессе» - 2016-2018 гг.

Грант РФФИ 18-34-00996 «Поиск, описание и детальное изучение депрессивного фенотипа у Danio rerio» - 2018-2020 гг.

Грант РНФ 19-15-00053 «Новые экспериментальные модели и биомаркеры взаимосвязи стресса и нейровоспалительных процессов» - 2019-2021 гг.

Лаборатория активно участвует в международных конференциях и проводит лекции по приглашениям других университетов. При участии лаборатории в Санкт-Петербурге ежегодно организуется международная конференция International Stress and Behavior Society (ISBS) "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference, посвященная нейронаукам и биопсихиатрии.

На данный момент сферами интереса лаборатории являются трансляционная нейробиология и биологическая психиатрия.

**Общая цель НИР**: исследовать эффекты фармакологических препаратов антидепрессантного и нормотимического свойств на нейрональный сигналинг у *Danio rerio*.

**Общие задачи НИР на 2024-2025 гг.:**

1. Исследование эффектов популярных антидепрессантов (сертралин, дулоксетин) на поведение зебраданио в тестах на аффективное поведение – тесте незнакомого аквариума и тесте подвешивания за хвост

2. Изучение эффектов данных антидепрессантов на нейрональный сигналинг обездвиженных зебраданио при помощи анализа свечения GCaMP6s

3. Исследование эффектов популярных стабилизаторов настроения (окскарбамазепин, ламотриджин) на поведение зебраданио в тестах на аффективное поведение – тесте незнакомого аквариума и тесте подвешивания за хвост

4. Изучение эффектов данных нормотимиков на нейрональный сигналинг обездвиженных зебраданио при помощи анализа свечения GCaMP6s

5. При помощи анализа полученных массивов структурных данных нейровизуализации, будет произведено сравнение полученных внутри и между фармакологических групп для сравнения механизмов действия препаратов и выявления ключевых нейрональных каскадов, ответственных за разные формы аффективного поведения у зебраданио, и потенциала их трансляции на другие объекты.

**Основная часть отчета о НИР**

## 1 **Обоснование исследования**

В связи с ростом продолжительности жизни во всем мире, когнитивные нарушения представляет актуальной и острой биомедицинской и социальной проблемой [1, 2]. Эти нарушения не только часто проявляются в процессе здорового старения [3], но также представляют собой характерные симптомы нейродегенеративных [4, 5] и других психиатрических заболеваний. расстройства, такие как шизофрения и депрессия [4] Papazacharias and Nardini, 2012 [6]. Ноотропы (усилители когнитивной деятельности) образуют особый класс психотропных препаратов, которые улучшают когнитивные функции и уменьшают когнитивный дефицит у людей [7-9] и животных [8].

Животные модели представляют собой ценный инструмент для изучения когнитивных нарушений и скрининга различных нейротропных препаратов, включая ноотропы. В дополнение к исследованиям на грызунах рыба зебраданио набирает популярность в качестве трансляционного модельного организма для исследования когнитивных процессов [10]. Их ключевые преимущества включают высокую генетическую (70%) и физиологическую гомологию с человеком, наличие общих, эволюционно консервативных нейромедиаторных систем и нейронных цепей [11, 12], легкую генетическую [13] и фармакологические манипуляции [14], а также потенциал для высокопроизводительного скрининга лекарств от ЦНС. Зебраданио демонстрируют сильные аффективные [15] и когнитивные фенотипы, включая обучение и память [16, 17] [10, 18], которыми можно легко манипулировать экспериментально [19-22] и которые можно оценить с помощью множества хорошо зарекомендовавших себя нейрокогнитивных моделей и тестов [17, 23]. Когнитивные способности рыб зебраданио также высоко чувствительны к фармакологической модуляции, включая как амнестики (например, скополамин, дизоцилпин/МК-801, кетамин) [24-27] и ноотропные средства, такие как традиционные ноотропные препараты пирацетам [28].

Использование трансгенных линий, экспрессирующих кальциево-чувствительные флуоресцентные индикаторы, таких как GCaMP6s, позволило получить новые данные о динамике нейрональной активности в реальном времени. GCaMP6s — это аббревиатура, обозначающая генетически кодируемый индикатор активности кальция (Genetically Encoded Calcium Indicator, GCaMP) шестого поколения, модификацию "s" (slow, медленный). Индикатор используется для визуализации изменений уровня кальция в клетках. Это белок, который объединяет кальций-связывающий белок кальмодулин, модуль связывания кальмодулина M13 и зеленый флуоресцентный белок (GFP). GCaMP6s отличается повышенной чувствительностью и устойчивостью, что делает его полезным для исследования нейронной активности и сигналов в биологических тканях. Эти подходы особенно ценны для изучения нейрофизиологических основ различных состояний, включая депрессивно-подобное и тревожное поведение, а также для анализа нейровоспалительных процессов.

Настоящее исследование направлено на комплексное изучение поведенческих и нейрофизиологических эффектов фармакологических воздействий на зебраданио.

## **2 Материалы и методы**

2.1. Материалы и методы. В исследовании были использованы 3-5-месячные короткохвостые экспериментально наивные зебраданио дикого типа (соотношение полов 1:1). Рыбы содержались в стандартных условиях, группами по 10-15 рыб в 4-литровых аквариумах, заполненных фильтрованной системной водой с постоянной температурой 27±0.5°C и pH 7.4 в виварии ИТБМ СПбГУ. Освещение (950-960 люкс) обеспечивалось 18-ваттными флуоресцентными лампами с 12/12 циклом освещения. Рыбы кормились дважды в день гранулами Neon Micro Granules (Dajana Pet, Bohuňovice, Czech Republic), в соответствии со стандартами ухода за зебраданио [29]. Все рыбы принадлежали к одной популяции и были распределены по экспериментальным группам случайным образом.

Все экспериментальные вмешательства проводилась в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» № 755 от 12.08.1977, «Правилами лабораторной практики в Российской федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 и в соответствии с международными нормами по проведению медико-биологических исследований с использованием животных.

**2.2. Кальциевый имиджинг.**

Подготовка плазмидного материала.

Для экспериментов использовались плазмиды, содержащие последовательность GCaMP6s, клонированную в эукариотический вектор с нейрон-специфическим промотором.

Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием набора для высокоэффективной очистки согласно инструкции производителя. После выделения, концентрация и чистота плазмидной ДНК оценивались спектрофотометром (260/280 и 260/230). Для подтверждения вставки GCaMP6s проводился анализ на агарозном геле (1%) после рестрикции эндонуклеазами, а также секвенирование.

Инъекции в икру зебраданио.

1. Подготовка икры: Взрослые зебраданио содержались в стандартных условиях с контролируемым циклом света/темноты (14/10 ч) при температуре 28 °C. После нереста икра собиралась с помощью сетки и промывалась системной водой.
2. Подготовка инъекционного материала. Плазмидная ДНК разводилась до концентрации 50 нг/мкл в инъекционном буфере с добавлением красителя (0.05% фенолового красного) для визуализации инъекций.
3. Процесс инъекций. Инъекции проводились в одноклеточную стадию икры с использованием микроинжектора (Narishige IM-300) под контролем стереомикроскопа. Объем вводимого раствора составлял ~1 нл. Процедура выполнялась на субстрате из 1% агарозы.
4. Инкубация икры. После инъекции икру инкубировали в стандартной аквариумной воде при температуре 28 °C.

Проверка экспрессии GCaMP6s.

Через 48 часов после инъекций икра и вылупившиеся эмбрионы Danio rerio исследовались на наличие флуоресценции.

Микроскопия

Перед началом микроскопии эмбрионы анестезировали раствором трикаина (MS-222, 0.02%). Для минимизации движений эмбрионы помещались в фиксационную камеру, залитую раствором агарозы (0.8%). Голова фиксировалась в положении, обеспечивающем доступность теленцефалона и мозжечка для визуализации. Для визуализации использовался прибор ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Выраженная флуоресценция в области головного мозга (мозжечок и теленцефалон) подтверждала успешность введения и экспрессии GCaMP6s. Наблюдаемые вспышки флуоресценции интерпретировались как изменения внутриклеточной концентрации кальция.

**2.3. Поведенческое тестирование.**

Поведенческое тестирование проводилось с 10:00 до 17:00. Перед тестированием рыбу переводили из домашних аквариумов в комнату акклиматизации на 3 часа. Для оценки поведения зебраданио, мы применили тесты: тест незнакомого аквариума (ТНА) и тест подвешивания за хвост (ТПХ). Все анализы записывались с помощью веб-камер SJcam (Sjcam Global, Inc., Шэньчжэнь, Гуандун, Китай) со скоростью 30 кадров в секунду и автоматически количественно оценивались в автономном режиме с помощью программного обеспечения Ethovision XT17 (Noldus IT, Вагенинген, Нидерланды) [30, 31] на основе местоположения центральной точки тела.

Поведение зебраданио оценивалось после острой 20-минутной предварительной обработки сертралином и алимемазином (тералиджен). Препараты вводился в пластиковом стакане объемом 1 л в концентрации 5 и 10 мг/л для сертралина и 1.25, 2.5 и 5 мг/л растворенным в пресной воде.

Тест с незнакомого аквариума (ТНА) был выбран в качестве чувствительного и часто используемого поведенческого теста на основе новизны, разработанного для оценки тревожного поведения и локомоции у зебраданио [32-35]. Аппарат ТНА представлял собой квадратный акриловый резервуар (высота 20 × длина 20 × ширина 5 см), заполненный водой и фактически разделенный на верхнюю и нижнюю половины. Задняя и боковые стенки резервуара были покрыты белой непрозрачной пленкой снаружи для увеличения контраста во время записи и снижения внешних визуальных стимулов во время записи поведения. Поведение рыб регистрировалось в течение 5 минут, оценивалось общее пройденное расстояние (см), частота заходов наверх и общее время, проведенное наверху (с) резервуара, как в [36, 37], а также общая продолжительность замирания (с), определяемая здесь как полная неподвижность, за исключением движения глаз и жабр, как в [15].

Тест подвешивания за хвост зебраданио (ТПХ) исследует поведение, подобное депрессии, концептуально аналогично широко используемым поведенческим тестам «отчаяния» у грызунов, таким как тест принудительного плавания и тест подвешивания за хвост (ТПХ) [38-41]. Исходя из парадигмы выученной беспомощности, животное обычно подвергается в этих тестах неконтролируемому стрессору и в конечном итоге прекращает попытки избежать аверсивного стимула, демонстрируя неподвижность [42]. Аналогично в ТПХ хвостовая часть рыбы была иммобилизована на 5 минут с помощью влажной вискозной губки (длина 8 × высота 4 × ширина 5 см), разрезанной пополам на глубину 2 см от дна острым скальпелем. Затем губку прикрепляли к верхней части стакана с двумя дополнительными надрезами по 2 см по бокам, чтобы обеспечить фиксацию стенками стакана. Эта установка позволяла черепной части рыбы свободно висеть в небольшой прозрачной пластиковой чашке (7 × 5,5 × 4,8 см) в форме усеченного конуса, наполненной водой, как в [42]. Задняя часть и боковые стороны контейнера были выложены белыми пластиковыми листами для усиления контраста во время видеозаписи, пересекающими общее расстояние, пройденное (см) центральной точкой видимой ростральной части тела рыбы.

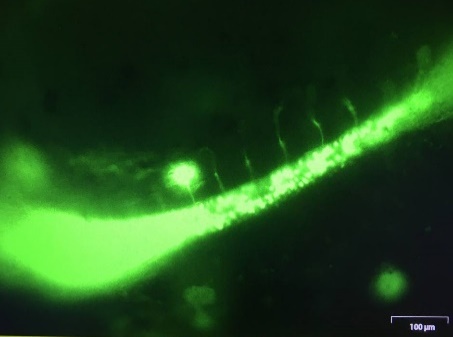
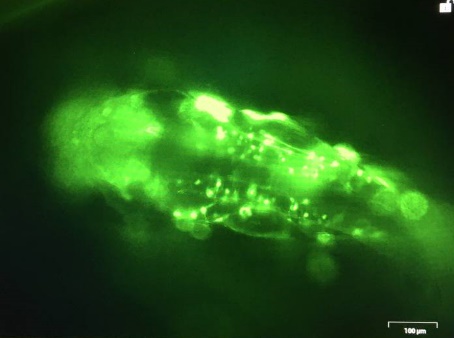
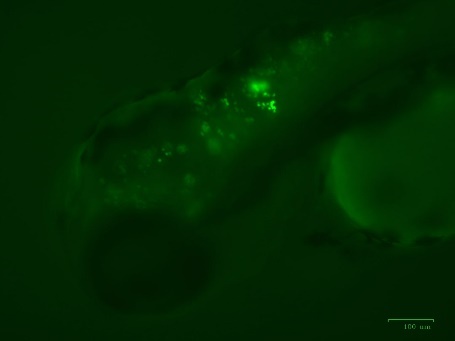
**2.4. Статистический анализ**

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения Statistica 12 (Dell Inc., Round Rock, США). Тест Краскела-Уоллиса (КУ) с апостериорным тестом Данна для значимых данных KW для группового сравнения, где это применимо. Все данные были представлены как медиана ± 25%(Q1)-75%(Q3) квартиль. Уровень статистической значимости был установлен на уровне p <0,05. Графики были созданы с использованием языка программирования Python (3.10.12) с использованием пакетов Matplotlib 3.7.1, Seaborn 0.11.2 и Statannotations 0.6.0.

## 3 **Результаты исследования.**

Флуоресцентный белок GCaMP6s позволил визуализировать активность нейронов в различных областях мозга, включая дорсальное теленцефалон и мозжечок. Использование конфокального микроскопа обеспечило получение высококачественных изображений с высоким разрешением, что позволило подробно рассмотреть структурную организацию головного мозга на уровне отдельных нейронов (рис 1).

В продольных и поперечных сечениях были отчетливо видны активные зоны нейрональной активности, которые выявлялись в виде вспышек флуоресценции, соответствующих изменениям концентрации кальция в клетках. Наблюдаемые сигналы имели высокую специфичность и соответствовали ожидаемой нейрональной активности в условиях покоя и стимуляции.

Эти данные подтверждают возможность использования GCaMP6s для цельномозговой визуализации активности нейронов у зебраданио и демонстрируют потенциал метода для анализа функциональной активности нейронных сетей в исследованиях аффективных, воспалительных и нейродегенеративных расстройств. **** ****

**Рисунок 1. Флуоресцентное свечение у рыб зебраданио** **через 48 часов после инъекции GCaMP6s.**

В проведенном исследовании острые поведенческие эффекты тералиджена и сертралина у зебраданио были оценены в тестах на тревожность и депрессивно-подобное поведение. Тералиджен в дозах 1,25 мг/л и 2,5 мг/л проявил выраженный анксиолитический эффект, что проявилось увеличением времени, проведенного в верхней зоне, и повышением активности рыб в тесте нового аквариума. В то же время, при дозе 5 мг/л наблюдалось снижение общей двигательной активности, что может указывать на седацию. Сертралин в дозе 10 мг/л вызывал депрессивно-подобное поведение, выражающееся снижением пройденной дистанции, при отсутствии существенных изменений по другим параметрам. Выявленные эффекты подтверждают возможность использования данных препаратов для моделирования и изучения тревожных и депрессивно-подобных состояний в доклинических исследованиях.

**Таблица 1.** Острые поведенческие эффекты воздействия тералиджена в дозах 1.25 мг/л, 2.5 мг/л и 5 мг/л у взрослых зебраданио, протестированные в 5-минутном НТТ. КУ тест с пост хот тестом Дана для попарных сравнений \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 – против контроля.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Параметр | Контроль | 1,25 мг/л | 2,5 мг/л | 5 мг/л |
| Дистанция (см) | 593.90 ± 278.36 | 583.33 ± 311.65 | 723.76 ± 257.59 | **\*\***  **374.83 ± 138.88** |
| Суммарное время в верхней зоне (с) | 11.85 ± 23.28 | **\***  **120.59 ± 108.84** | **\*\*\***  **211.89 ± 77.59** | **\*\*\***  **235.33 ± 100.12** |
| Частота переходов в верхнюю зону | 1.38 ± 2.31 | 3.69 ± 4.74 | 4.13 ± 3.98 | **0.81 ± 1.60\*** |
| Время высокой подвижности (с) | 0.10 ± 0.12 | 0.33 ± 0.33 | **0.49 ± 0.50\*** | **0.77 ± 0.93\*\*** |
| Время замирания (с) | 96.11 ± 86.40 | **\***  **101.10 ± 82.58** | **\***  **62.24 ± 54.58** | **\*\***  **176.84 ± 51.94** |

**Таблица 2.**

Острые поведенческие эффекты воздействия тералиджена в дозах 1.25 мг/л, 2.5 мг/л и 5 мг/л у взрослых зебровых рыб, протестированных в 5-минутной ТПХ. КУ тест с пост хок тестом Данна для попарных сравнений.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Параметр | Контроль | 1,25 мг/л | 2,5 мг/л | 5 мг/л |
| Дистанция | 95.4 ± 5.8 | 97.3 ± 6.1 | 96.2 ± 5.9 | 94.8 ± 6.0 |
| Активность (%) | 1.9 ± 0.9 | 1.9± 0.4 | 2.9 ± 0.2 | 1.6 ± 0.2 |
| Продолжительность неактивности (c) | 287 ± 2.1 | 264 ± 3.1 | 276 ± 2.3 | 298 ± 3.2 |

**Таблица 3.** Острые поведенческие эффекты воздействия сертралина в дозах 5 мг/л и 10 мг/л у взрослых зебраданио, протестированные в 5-минутном НТТ. КУ тест с постхок-тестом Данна для попарных сравнений \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 – против контроля.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Параметр | Контроль | 5 мг/л | 10 мг/л |
| Пройденная дистанция (см) | 520.47 ± 245.36 | 512.47 ± 240.32 | 474.83 ± 138.88 |
| Суммарное время в верхней зоне (с) | 65.85 ± 20.28 | 74.67 ± 18.55 | 82.12 ± 15.43 |
| Частота переходов в верхнюю зону | 2.85 ± 2.50 | 2.92 ± 2.15 | 1.85 ± 1.62 |
| Время эрратики (с) | 0.2 ± 0.10 | 0.15 ± 0.20 | 0.13 ± 0.18 |
| Время фризинга (с) | 58.11 ± 78.40 | 69.25 ± 78.47 | 62.34 ± 91.18 |

**Таблица 4.** Острые поведенческие эффекты воздействия сертралина в дозах 5 мг/л и 10 мг/л у взрослых зебровых рыб, протестированных в 5-минутной ТПХ. КУ тест с постхок тестом Данна для попарных сравнений H (2,37), p \* - против контроля (p < 0,05), ! - против 5 мг/л (p < 0,05).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Параметр | Контроль | 5 мг/л | 10 мг/л |
| Дистанция | 84.4 ± 7.8 | 77 ± 6.7 | **!**  **130.1 ± 13.8** |
| Активность (%) | 1.8 ± 0.2 | 1.5 ± 0.1 | 2.1 ± 0.3 |
| Продолжительность неактивности (c) | 292± 1.8 | **\***  **291.7 ± 1.6** | **!\***  **275.8 ± 4.1** |

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Визуализация нейронной активности с помощью GCaMP6s.

• Флуоресцентный белок GCaMP6s использован для визуализации активности нейронов в различных областях мозга, включая дорсальный теленцефалон и мозжечок. • Конфокальный микроскоп: обеспечил высококачественные изображения с высоким разрешением, позволяя детально изучить структурную организацию головного мозга на уровне отдельных нейронов.

• Активные зоны нейронной активности: наблюдались вспышки флуоресценции, соответствующие изменениям концентрации кальция в клетках, что свидетельствует о нейрональной активности как в состоянии покоя, так и при стимуляции.

• Специфичность сигналов: наблюдаемые сигналы имели высокую специфичность и соответствовали ожидаемой нейрональной активности.

2. Поведенческие эффекты сертралина.

• Доза 10 мг/л сертралина: вызывала депрессивно-подобное поведение у рыб, проявляющееся снижением пройденной дистанции в тесте нового аквариума.

• Несмотря на снижение двигательной активности, другие параметры поведения не показали значительных изменений, что указывает на специфический эффект сертралина.

3. Поведенческие эффекты тералиджена.

• Дозы 1,25 мг/л и 2,5 мг/л: обнаружили анксиолитический эффект, увеличивая время пребывания рыб в верхней зоне и повышая их активность в тесте нового аквариума. Доза 5 мг/л: привела к снижению общей двигательной активности рыб, что может указывать на седацию.

• ТПХ показали минимальное влияние тералиджена на поведение рыб, за исключением дозозависимого уменьшения неактивности при применении сертралина.

4. Полученные результаты демонстрируют значительный потенциал трансляции выявленных механизмов на другие модели и объекты исследований, что открывает новые горизонты для дальнейших научных изысканий в области нейробиологии и психофармакологии. Таким образом, данное исследование не только углубляет понимание фармакологических эффектов на уровне нейронных сетей, но и создает основу для разработки более эффективных подходов к лечению аффективных расстройств, учитывающих индивидуальные особенности пациентов.

# СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Anstey, K.J. and J. Wood, *Chronological age and age-related cognitive deficits are associated with an increase in multiple types of driving errors in late life.* Neuropsychology, 2011. **25**(5): p. 613-21.

2. Bennett, S.J., M.J. Sauve, and R.M. Shaw, *A conceptual model of cognitive deficits in chronic heart failure.* J Nurs Scholarsh, 2005. **37**(3): p. 222-8.

3. Backman, L., et al., *Age-related cognitive deficits mediated by changes in the striatal dopamine system.* Am J Psychiatry, 2000. **157**(4): p. 635-7.

4. Etkin, A., A. Gyurak, and R. O'Hara, *A neurobiological approach to the cognitive deficits of psychiatric disorders.* Dialogues Clin Neurosci, 2013. **15**(4): p. 419-29.

5. Hamm, R.J., et al., *Cognitive deficits following traumatic brain injury produced by controlled cortical impact.* J Neurotrauma, 1992. **9**(1): p. 11-20.

6. Ravnkilde, B., et al., *Cognitive deficits in major depression.* Scand J Psychol, 2002. **43**(3): p. 239-51.

7. Colucci, L., et al., *Effectiveness of nootropic drugs with cholinergic activity in treatment of cognitive deficit: a review.* J Exp Pharmacol, 2012. **4**: p. 163-72.

8. Froestl, W., A. Muhs, and A. Pfeifer, *Cognitive enhancers (nootropics). Part 1: drugs interacting with receptors.* J Alzheimers Dis, 2012. **32**(4): p. 793-887.

9. Rose, S.P., *'Smart drugs': do they work? Are they ethical? Will they be legal?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(12): p. 975-9.

10. Stewart, A.M. and A.V. Kalueff, *The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research.* Curr Neuropharmacol, 2012. **10**(3): p. 263-71.

11. Horzmann, K.A. and J.L. Freeman, *Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity.* Toxics, 2016. **4**(3).

12. Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.* Nature, 2013. **496**(7446): p. 498-503.

13. Rafferty, S.A. and T.A. Quinn, *A beginner's guide to understanding and implementing the genetic modification of zebrafish.* Prog Biophys Mol Biol, 2018. **138**: p. 3-19.

14. Kalueff, A.V., D.J. Echevarria, and A.M. Stewart, *Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014. **55**: p. 1-6.

15. Cachat, J., et al., *Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17597.

16. Gerlai, R., *Learning and memory in zebrafish (Danio rerio).* Methods Cell Biol, 2016. **134**: p. 551-86.

17. Meshalkina, D.A., et al., *Adult zebrafish in CNS disease modeling: a tank that's half-full, not half-empty, and still filling.* Lab Anim (NY), 2017. **46**(10): p. 378-387.

18. Roberts, A.C., B.R. Bill, and D.L. Glanzman, *Learning and memory in zebrafish larvae.* Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 126.

19. Best, J.D. and W.K. Alderton, *Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases.* Neuropsychiatr Dis Treat, 2008. **4**(3): p. 567-76.

20. Kalueff, A.V., A.M. Stewart, and R. Gerlai, *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders.* Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(2): p. 63-75.

21. Richetti, S.K., et al., *Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish.* Behav Brain Res, 2011. **217**(1): p. 10-5.

22. Seibt, K.J., et al., *Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (Danio rerio).* Behav Brain Res, 2011. **224**(1): p. 135-9.

23. Bailey, J.M., A.N. Oliveri, and E.D. Levin, *Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (Danio rerio).* Pharmacol Biochem Behav, 2015. **139 Pt B**(0 0): p. 103-11.

24. Kenney, J.W., et al., *Contextual fear conditioning in zebrafish.* Learn Mem, 2017. **24**(10): p. 516-523.

25. Riehl, R., et al., *Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish.* Neurotoxicol Teratol, 2011. **33**(6): p. 658-67.

26. Stefanello, F.V., et al., *Exploring Object Discrimination in Zebrafish: Behavioral Performance and Scopolamine-Induced Cognitive Deficits at Different Retention Intervals.* Zebrafish, 2019. **16**(4): p. 370-378.

27. Swain, H.A., C. Sigstad, and F.M. Scalzo, *Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (Danio rerio).* Neurotoxicol Teratol, 2004. **26**(6): p. 725-9.

28. Grossman, L., et al., *Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish.* Brain Res Bull, 2011. **85**(1-2): p. 58-63.

29. Watts, S.A., M. Powell, and L.R. D'Abramo, *Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition.* ILAR J, 2012. **53**(2): p. 144-60.

30. Wong, K., et al., *Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish.* Brain research, 2010. **1348**: p. 209-215.

31. Stewart, A.M., et al., *Building zebrafish neurobehavioral phenomics: effects of common environmental factors on anxiety and locomotor activity.* Zebrafish, 2015. **12**(5): p. 339-348.

32. Stewart, A., et al., *The developing utility of zebrafish in modeling neurobehavioral disorders.* International Journal of Comparative Psychology, 2010. **23**(1).

33. Kysil, E.V., et al., *Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests.* Zebrafish, 2017. **14**(3): p. 197-208.

34. Fontana, B.D., N. Alnassar, and M.O. Parker, *The zebrafish (Danio rerio) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light-dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds.* Psychopharmacology (Berl), 2022. **239**(1): p. 287-296.

35. Sabadin, G.R., et al., *A novel behavioral paradigm to measure anxiety-like behaviors in zebrafish by the concomitant assessment of geotaxis and scototaxis.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2022. **118**: p. 110579.

36. Stewart, A., et al., *Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review.* Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 135-43.

37. Wong, K., et al., *Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (Danio rerio).* Behav Brain Res, 2010. **208**(2): p. 450-7.

38. Bernal-Morales, B., C.M. Contreras, and J. Cueto-Escobedo, *Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test.* Behav Processes, 2009. **82**(2): p. 219-22.

39. Swiergiel, A.H., I.L. Leskov, and A.J. Dunn, *Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice.* Behav Brain Res, 2008. **186**(1): p. 32-40.

40. Ostadhadi, S., et al., *Involvement of opioid system in antidepressant-like effect of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM-251 after physical stress in mice.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016. **43**(2): p. 203-12.

41. Haj-Mirzaian, A., et al., *Opioid/NMDA receptors blockade reverses the depressant-like behavior of foot shock stress in the mouse forced swimming test.* Eur J Pharmacol, 2014. **735**: p. 26-31.

42. Demin, K.A., et al., *The zebrafish tail immobilization (test as a new tool to assess stress-related behavior and a potential screen for drugs affecting despair-like states.* J Neurosci Methods, 2020. **337**: p. 108637.