

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

## **ВЛИЯНИЕ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС, ИМЕЮЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ D2 РЕЦЕПТОРА**

**Ахмадеев А.В., Галиева Л.Ф.**

*ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет Минобрнауки РФ», Уфа, e-mail: mpha@ufanet.ru*

Целью работы явился сравнительный анализ двигательной активности на разных стадиях эстрального цикла двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij с генетически детерминированным изменением экспрессии изоформ D2 рецептора. Исследования проведены на половозрелых крысах с генотипами A1/A1 и A2/A2 по локусу Taq 1 ADRD2. Двигательную активность крыс (всего 20, 10 с генотипом A1A1 и 10 – с A2A2) изучали в установке «открытое поле» по общепринятой методике. Стадии эстрального цикла определяли по цитологии влагалищных мазков. Результаты работы показали, что высокий плазменный уровень эстрадиола на стадиях проэструс и эструс у крыс с генетически детерминированным снижением экспрессии короткой изоформы (генотип A1A1 по локусу Taq 1 ADRD2) повышает локомоторную активность. У крыс генотипом A2A2 по локусу Taq 1 ADRD2 колебание уровней половых стероидов в плазме крови в динамике эстрального цикла подобных изменений не вызывает.

Ключевые слова: половые стероиды, изоформы D2 рецептора, локус Taq 1 ADRD2.

## **THE INFLUENCE OF SEX STEROIDS ON BEHAVIOR OF RATS WITH GENETICALLY DETERMINED DIFFERENCES IN EXPRESSION OF ISOFORMS OF THE D2 RECEPTOR**

**Akhmadeev A.V., Galieva L.F.**

*Bashkir state University, Ufa, e-mail: mpha@ufanet.ru*

The aim of this work was a comparative analysis of locomotor activity at different stages of the estrous cycle of the two subpopulations of WAG/Rij rats with genetically determined differences in the expression of the isoforms of the D2 receptor. The research was conducted on two groups of mature rats with the genotypes A1/A1 and A2/A2 on the locus Taq 1 A DRD2. Locomotor activity of rats (total amount 20, 10 with genotype A1A1 and 10 – A2A2) studied in the "open field" system according to the standard methods. Estrus phases identified through a vaginal smear. The results showed that a high plasma level of estradiol on stages of proestrus and estrus increases locomotor activity in rats with a genetically determined reduced expression of the short isoforms (genotype A1A1 on the locus Taq 1 A DRD2). In rats with the genotype A2A2 at locus Taq 1 A DRD2 there were no changes in levels of sex steroids in the blood plasma in the dynamics of the estrous cycle.

Keywords: sex steroids, dopaminergic transmission, locus Taq 1 A DRD2.

Дофаминергическая система вовлечена в патогенез многих тяжелых психоневрологических заболеваний (шизофрения, эпилепсия и др.). Ведущее значение при этом имеют нарушения в функциях дофаминавого рецептора второго типа (D2), приводящие либо к повышению, либо к снижению дофаминергической трансмиссии. Для устранения указанных дисфункций используются агонисты и антагонисты D2 рецептора, лечебный эффект которых, к сожалению, часто сопровождается побочными эффектами в виде экстрапирамидных расстройств. Полагают, что устранение побочных расстройств может быть достигнуто путем выяснения механизмов взаимодействия фармакологических препаратов с изоформами D2 рецептора и сигнал-трансдукторных путей, в формировании которых они принимают участие.

Установлено, что существует две изоформы D<sub>2</sub> рецептора, которые получили названия длинной (D<sub>2</sub>L) и короткой (D<sub>2</sub>S). Они образуются в результате альтернативного сплайсинга гетероядерной РНК, синтезируемой на шестом экзоне гена рецептора дофамина второго типа [7]. На ход альтернативного сплайсинга, наряду с генетическими факторами – полиморфизмами DRD2 [10] могут влиять нейротрофические факторы и половые стероиды [5,9].

Предполагается, что изоформы имеют разные функции. Длинная изоформа (D<sub>2</sub>L) локализуется преимущественно на постсинаптическом компоненте синапсов, в то время как D<sub>2</sub>S располагается пресинаптически, и выполняет функции ауторецептора [8]. Основная роль ауторецепторов сводится к торможению и модуляции дофаминовой трансмиссии. Активация D<sub>2</sub>S нарушает синтез и выделение дофамина, ограничивая эти процессы, и приводит к снижению двигательной активности, в то время как активация D<sub>2</sub>L повышает локомоторную активность [4].

Из данных по молекулярной генетики известно, что минорный аллель (T=A1) локуса Taq 1ADRD2 находится в неравновесии по сцеплению с минорными аллелями двух фланкирующих 6 экзонинтронных локусов (rs 2283265 и rs 1076560) гена D<sub>2</sub> рецептора (D'<sup>2</sup>=0,855), снижающими экспрессию короткой изоформы [10].

**Целью работы** явился сравнительный анализ двигательной активности на разных стадиях эстрального цикла как компонента ориентировочно-исследовательского поведения двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа локуса Taq 1ADRD2.

#### **Материал и методы исследования**

Исследования проведены на двух группах половозрелых крыс: гомозиготных крысах линии WAG/Rijс генотипами A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1ADRD2 с массой тела 250–320 г. Крысы линии WAG/Rij были получены от родительских особей, предоставленных профессором Г.Д. Кузнецовой (Институт ВНД, г. Москва). Две субпопуляции крыс линии WAG/Rij, имеющих генотипы A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1 ADRD2, впервые получены на кафедре морфологии и физиологии человека и животных БашГУ профессором Л.Б. Калимуллиной путем скрещивания гомозиготных особей, выявленных генетическим анализом указанного локуса в исходной популяции этих крыс [3]. Генетический анализ полиморфного локуса Taq 1 ADRD2 у крыс линии WAG/Rij был выполнен под руководством заведующего отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН профессора Э.К. Хуснутдиновой.

К настоящему времени две группы крыс линии WAG/Rij, имеющих генотипы A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1 ADRD2, прошли более 30 поколений. Всех использованных в работе половозрелых крыс содержали в стандартных условиях вивария, характеризующихся

постоянством комнатной температуры ( $20^0$ - $22^0$ ) С и уровнем влажности. Пищу и питьё животные получали *ad libitum*, продолжительность светового дня составляла 12–14 часов. Клетки с самками и самцами на стеллажах вивария были рассредоточены таким образом, чтобы рядом с клеткой, в которой находились самки, находилась клетка с самцами. Кроме того, в клетки с самками периодически вносили опилки из клеток самцов, чтобы усилить влияние половых феромонов. Все процедуры с животными выполнялись с соблюдением международных правил и норм (European Communities Council Directives, 1986).

Ориентировочно-исследовательское поведение крыс (всего 20, 10 с генотипом А1/А1 и 10 – с А2/А2) изучали в установке «открытое поле». «Открытое поле» представляло собой квадратную освещенную в центре арену (лампой 40 Вт) площадью 100 см<sup>2</sup>, разделенную на 16 равных частей. Крысу в начале тестирования помещали в один из центральных квадратов поля, и наблюдали за ее поведением в течение пяти минут. Регистрировали показатели двигательной активности и исследовательской деятельности, определяли количество эпизодов и время, затрачиваемое крысой на груминг, пребывание в состоянии неподвижности, и латентный период до пересечения первого квадрата (амбуляции). Двигательную активность определяли по количествуambuляций, совершаемых крысой в центре и на периферии поля, сумма этих двух показателей определяла общую двигательную активность. Вегетативные реакции крыс регистрировали на основании учета числа уринаций и болюсов.

Стадии эстрального цикла определяли на основе характеристик клеточного состава влагалищного содержимого крыс, которое забирали с помощью глазных пипеток непосредственно перед регистрацией поведения крыс. Для этого физиологическим раствором, набранным в пипетку, два-три раза промывали влагалище крысы, а собранный смыв помещали на предметное стекло и высушивали при комнатной температуре. Далее мазок окрашивали метиленовым синим и микроскопировали. Наличие небольших количеств слизи и лейкоцитов указывало на стадию диэструса, группы интенсивно окрашенных эпителиальных клеток с ровной поверхностью и четко определяемыми клеточными ядрами – на стадию проэструса, обильные крупные безъядерные клеточные массы в виде чешуек – на эструс, содержание в мазке больших количеств лейкоцитов и слизи указывало на стадию метэструса [2]. Эксперимент длился 60 дней. Полученные результаты систематизировали по стадиям ЭЦ и подвергали статистической обработке с помощью пакета программ “Statistica6”.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Количествоambuляций на разных стадиях ЭЦ: диэструс (Д), проэструс (П), эструс (Э) и метэструс (М), отражающее выраженность двигательной активности крыс с генотипом

A1/A1, приведено в таблице 1.

Таблица 1

Показатели двигательной активности крыс с генотипом A1/A1 в открытом поле на разных стадиях эстрального цикла ( $M \pm m$ )

Кол-во амб	Стадии ЭЦ и результаты сравнения численных характеристик амбуляций (амб)								
	Д	р	П	р	Э	р	М	р	Д
общ	64,20 $\pm 11,63$	>0,05	77,90 $\pm 9,94$	<0,05	105,70 $\pm 4,97$	>0,05	93,30 $\pm 4,59$	>0,05	64,20 $\pm 11,63$
центр	5,10 $\pm 2,30$	>0,05	6,64 $\pm 2,43$	>0,05	13,60 $\pm 2,80$	>0,05	6,90 $\pm 1,80$	>0,05	5,10 $\pm 2,30$
периф	59,10 $\pm 10,01$	>0,05	71,50 $\pm 8,26$	<0,05	93,10 $\pm 6,07$	>0,05	86,40 $\pm 3,51$	<0,05	59,10 $\pm 10,01$

Приведенные в таблице 1 данные показывают, что общая двигательная активность крыс с генотипом A1/A1 повышается последовательно от стадии диэструс до стадии эструс, когда количество амбуляций достигает своего пика, и различия по сравнению со стадией проэструс становятся значимыми ( $p < 0,05$ ). Выходы крыс в центр поля несколько повышаются на стадии проэструс, далее – на стадии эструс количество амбуляций достигает наибольшего значения, снижаясь на стадии метэструс. Сравнение численных характеристик посещения центра поля выявляет, что различия не достоверны. Крысы преимущественно передвигаются по периферии поля, предпочитая затемненные участки установки. Сравнение количества амбуляций на стадиях проэструс и эструс показывает, что двигательная активность значимо возрастает на стадии эструс ( $p < 0,05$ ), а затем уменьшается, и на стадии диэструс по сравнению со стадией метэструс возвращается к исходному уровню ( $p < 0,05$ ).

Результаты регистрации двигательной активности крыс с генотипом A2/A2 приведены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели двигательной активности крыс с генотипом A2/A2 в открытом поле на разных стадиях эстрального цикла ( $M \pm m$ )

Кол-во амб	Стадии ЭЦ и результаты сравнения численных характеристик амбуляций (амб)								
	Д	р	П	р	Э	р	М	р	Д
общ	51,20 $\pm 4,64$	>0,05	44,40 $\pm 10,06$	<0,05	61,80 $\pm 8,04$	>0,05	72,00 $\pm 10,15$	>0,05	51,20 $\pm 4,64$
центр	3,40 $\pm 1,12$	>0,05	4,10 $\pm 1,55$	>0,05	5,20 $\pm 1,19$	>0,05	6,80 $\pm 1,49$	>0,05	3,40 $\pm 1,12$
периф	47,80 $\pm 4,27$	>0,05	40,30 $\pm 8,94$	<0,05	56,60 $\pm 7,37$	>0,05	65,20 $\pm 8,84$	>0,05	47,80 $\pm 4,27$

Данные таблицы 2 показывают, что общая двигательная активность несколько снижается на стадии проэструс по сравнению со стадией диэструс, затем повышается на

стадии эструс и достигает наибольшей выраженности на стадии метэструс. Но все выявленные изменения не являются статистически значимыми. Количество амбуляций в центре и периферии поля также изменяется на разных стадиях цикла, но различия между стадиями не достоверны.

Таким образом, результаты работы показывают, что у крыс с генотипом A1/A1 изменение уровней половых стероидов в динамике эстрального цикла сопровождается сдвигами в локомоторной активности, в то время как у крыс с генотипом A2/A2 они отсутствуют.

Из сведений литературы известно, что изменение уровней половых стероидов влияет на экспрессию изоформ D2 рецептора, не изменяя при этом общего количества мРНК этого рецептора. Кастрация повышает соотношение D2L/D2S в большинстве исследованных областей мозга, а введение тестостерона и 17 $\beta$ -эстрадиола устраняет указанный сдвиг. Однако в стриатуме, играющем ведущую роль в двигательной активности, ни кастрация, ни заместительная терапия половыми стероидами не приводили к изменениям в экспрессии изоформ D2 рецептора [9].

Оказалось, что дофаминергические терминалы, приходящие в стриатум из компактной части черной субстанции и вентральной тегментальной области, не имеют эстрогенных рецепторов, но они выявлены на холинергических интернейронах и клетках глии. Также предполагается, что эти рецепторы к эстрадиолу могут быть на ГАМК-ергических нейронах, однако, этот вопрос остается пока неисследованным. Эти данные показывают, что регуляция выделения дофамина в стриатуме является опосредованной и происходит с участием холинергической системы [6].

Можно также предположить, что повышение дофамина в стриатуме на стадии эструса, а как следствие этого повышение локомоторной активности, у крыс с генотипом A1/A1 является результатом влияния половых стероидов на синтезирующие дофамин нейроны среднего мозга, которые обладают эстрогенными рецепторами [1]. Известно, что в нейронах дофаминпродуцирующих областей среднего мозга преобладающей изоформой D2 – рецептора является S – изоформа. Можно полагать, что снижение ее экспрессии под влиянием эстрадиола в терминалях аксонов дофаминергических нейронов, достигающих стриатума, определяет повышение содержания дофамина у крыс с генотипом A1/A1.

Отсутствие изменений двигательной активности крыс с генотипом A2/A2 в динамике эстрального цикла объяснить на сегодняшний день не представляется возможным, т.к. роль аллеля A2 гетерозиготного локуса Taq 1 ADRD2 на экспрессию изоформ D2 рецептора остается неизвестной.

## **Заключение**

Исследования проведены с целью получения новой информации о функциях изоформ D<sub>2</sub> рецептора, знание которой важно для разработки нового поколения агонистов и антагонистов этого рецептора, используемых в терапии широкого круга психоневрологических заболеваний. Результаты работы показали, что высокий плазменный уровень эстрадиола на стадиях проэструс и эструс у крыс с генетически детерминированным снижением экспрессии короткой изоформы (генотип A1/A1 по локусу Taq 1 ADRD2) повышает локомоторную активность. У крыс генотипом A2/A2 по локусу Taq 1 ADRD2 колебание уровней половых стероидов в плазме крови в динамике эстрального цикла подобных изменений не вызывает.

*Работа выполнена при финансовой поддержке базовой части госзадания Министерства образования и науки РФ, тема № 1442.*

### Список литературы

1. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Половые стероиды и дофамин в системе нейроэндокринной регуляции функций миндалевидного тела мозга // Морфология. – 2010. – № 6. – С. 64-68.
2. Кабак Я. М. Практикум по эндокринологии. – 2-е изд. – М.: Изд-во МГУ, 1968. – 275 с.
3. Полиморфизм Taq1a рестрикционного локуса гена DRD<sub>2</sub> и гена DAT1 у крыс линии WAG/Rij. / Калимуллина Л., Ахмадеев А., Бикбаев А., Галеева А., Хуснутдинова Э., Чепурнов С., Чепурнова Н. // Медицинская генетика. – 2005. – № 5. – С.198-199.
4. Beaulieu J. M., Gainetdinov R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors // Pharmacological Reviews. – 2011. – V.63 (1). – P. 182–217.
5. Differential effects of nerve growth factor on expression of dopamine 2 receptor subtypes in GH3 rat pituitary tumor cells / Su Z., Jiang X., Wang C., Liu J., Chen Y., Li Q., Wu J., Zheng W., Zhuge Q., Jin K., Wu Z. // Endocrine. 2012. – V. 42 (3). – P.670-675. doi: 10.1007/s12020-012-9715-y.
6. Estrogen receptors are found in glia and at extranuclear neuronal sites in the dorsal striatum of female rats: evidence for cholinergic but not dopaminergic colocalization / Almey A., Filardo E.J., Milner T.A., Brake W.G. // Endocrinology. – 2012. – V.153 (11). – P.5373-5383. doi: 10.1210/en.2012-1458.
7. Eubanks J.H., Djabali M., Selleri L. Structure and linkage of the D2 dopamine receptor and neural cell adhesion molecule genes on human chromosome 11q23 // Genomics. – 1992. – V.14. – P.1010-1018.

8. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors / C. De Mei, M. Ramos, C. Iitaka, E. Borrelli // *Curr Opin Pharmacol.* – 2009. – V.9 (1). – P.53-61. – doi: 10.1016/j.coph.2008.12.002.
9. Guivarc'h D., Vernier P., Vincent J. D. Sex steroid hormones change the differential distribution of the isoforms of the D2 dopamine receptor messenger RNA in the rat brain // *Neuroscience.* – 1995. – V. 69 (1). – P. 159-166.
10. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory / Zhang Y., Bertolino A., Fazio L., Blasi G., Rampino A., Romano R., Mei-Ling Lee T., Tao Xiao, Papp A., Wang D., Sadee W. // *Journal The Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* – 2007. – V. 104 (51). – P.20552-20557.