НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АЛКОГОЛИЗМА

Ахмадеев А.В.1, Леушкина Н.Ф.2

 1 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет», Уфа, e-mail: mpha(a)ufanet.ru;

Механизмы влияния женских половых гормонов на дофаминергическую систему мозга, нарушения деятельности которой являются ведущим звеном патогенеза алкоголизма и наркомании, изучены недостаточно. Целью работы явился анализ поведения предпочитающих алкоголь самок крыс с генетически детерминированным снижением короткой изоформы рецептора дофамина второго типа на разных стадиях эстрального цикла, являющегося моделью овариально-менструального цикла у женщин. Исследования проведены на 15 половозрелых предпочитающих алкоголь крысах. Поведенческие реакции крыс регистрировали по общепринятой методике с использованием установки «квадратное открытое поле». Перед регистрацией поведенческих реакций определяли стадии эстрального цикла на основании цитологических характеристик влагалищных мазков. Установлено, что в отличие от литературных данных по крысам линии Вистар двигательная активность предпочитающих алкоголь крыс выше на стадии эструс по сравнению со стадией диэструс (р<0,05). Кроме того, на разных стадиях эстрального цикла выявлены различия в предпочтении центральных или периферических зон открытого поля, указывающие на тревожность крыс. Полученные результаты выявляют особенности взаимодействия эстрадиола и рецептора дофамина второго типа, проясняющие механизмы формирования девиантного поведения у самок предпочитающих алкоголь крыс.

Ключевые слова: женский алкоголизм, половые стероиды, рецепторы дофамина, поведение.

NEUROENDOCRINE ASPECTS OF THE PATHOGENETIC MECHANISMS OF FEMALE ALCOHOLISM

Akhmadeev A.V.1, Leushkina N.F.2

females that prefer alcohol to rats.

¹Bashkir state university, Ufa, e-mail: mpha@ufanet.ru; ²Children's ecological and biological center "Rostok", Ufa, e-mail: Leona55@mail.ru

The mechanisms of the influence of female sex hormones on the dopaminergic system of the brain, which is a leading link in the pathogenesis of alcoholism and drug addiction, have not been adequately studied. The aim of the work was to analyze the behavior of female alcohol preferring female rats with a genetically determined decrease in the short isoform of the dopamine receptor of the second type at different stages of the estrous cycle, which is a model of the ovarian - menstrual cycle in women. Studies were conducted on 15 mature alcohol preferring female rats. Behavioral reactions of rats were recorded according to a conventional method using the "square open field" test. Before the registration of behavioral reactions, the stages of the estrous cycle were determined based on the cytological characteristics of the vaginal smears. It was found that, unlike the literature data on Wistar rats, motor activity of alcohol preferring rats was higher at the estrus stage compared to the diestrus stage (p<0.05). It was found that, in contrast to Wistar rats, the motor activity of alcohol preferring rats was higher in the estrus stage than in the diestrus stage (p<0.05). In addition, at different stages of the estrus cycle, differences in the preferences of the central or peripheral open-field zones, indicating the anxiety of rats, were revealed. The obtained results reveal the peculiarities of the interaction of estradiol and the dopamine receptor of the second type, which clarify the mechanisms of the formation of deviant behavior in

Keywords: female alcoholism, sex steroids, receptors of dopamine, behavior.

По данным российского интернет-ресурса для врачей и пациентов «Медицинский портал» [1], «статистика, склонная занижать реальные цифры, свидетельствует о неуклонном росте числа россиянок, пристрастившихся к спиртному. За последние несколько лет их количество выросло с 11,3% до 15,8%. Скандинавы и американцы

²Муниципальное бюджетное образовательное учреждение дополнительного образования «Детский экологобиологический центр «Росток» городского округа город Уфа, Уфа, e-mail: Leona55@mail.ru

считают, что число жертв женского алкоголизма в их странах составляет не менее 30%, а британцы называют шокирующую цифру в 50%».

Для женщин характерно быстрое формирование и более тяжелое течение болезни, ранние изменения личности, приводящие к социальной дезадаптации [2]. Наряду с этим, алкоголизм у женщин труднее поддается лечению. Все вышеизложенное определяет актуальность исследований патогенеза женского алкоголизма, результаты которых могут позволить разработать систему ранних диагностических и лечебных мероприятий.

Известно, что патогенетические механизмы женского и мужского алкоголизма различаются. Это предопределено особенностями нейроэндокринной системы, которые формируются в периоде половой дифференциации мозга при участии половых стероидов и катехоламинов [3].

В настоящее время установлено, что существует не менее пяти типов дофаминовых рецепторов: D_1 , D_2 , D_3 , D_4 и D_5 . Все эти рецепторы являются метаботропными, сопряженными с аденилатциклазой. Их принято объединять в два семейства — семейство рецептора D_1 (D_1 и D_5) и семейство рецептора D_2 (D_2 , D_3 , D_4).

Выделено две изоформы м-РНК D₂-рецептора, которые получили названия длинной (D2L) и короткой (D2S). Они образуются в результате альтернативного сплайсинга гетероядерной РНК, синтезируемой на шестом экзоне гена этого рецептора. Короткая изоформа рецептора отличается от длинной тем, что у нее отсутствует 29 аминокислот, входящих в состав третьей цитоплазматической петли рецептора.

Показано, что изоформы имеют разные функции и различную локализацию на компонентах синапсов. Длинная изоформа (D2L) локализуется на постсинаптическом компоненте синапсов, в то время как D2S располагается пресинаптически и выполняет функции ауторецептора. Ауторецепторы могут располагаться на телах и дендритах нейронов, а также на терминалях аксонов. Первые из них ослабляют возбудимость нейронов, в то время как терминальные ауторецепторы снижают синтез и выделение дофамина, а также ингибируют импульс-зависимое выделение дофамина. Основная роль ауторецепторов сводится к торможению и модуляции дофаминовой трансмиссии во взрослом организме, но в эмбриональном периоде они играют важную роль в нейрогенезе дофаминергических нейронов.

В ранних работах, посвященных изучению изоформ рецептора в мозге, сообщалось, что D2L широко представлена во всех отделах мозга, но при этом соотношение D2L и D2S может быть различным. Позднее эти данные были уточнены. Показано, что представительство короткой изоформы больше в структурах ствола мозга. Выяснено, что в мозге приматов короткая изоформа локализуется в клеточных телах и проекционных аксонах

дофамин-продуцирующих нейронов среднего мозга и гипоталамуса, в то время как длинная изоформа рецептора больше экспрессируется на нейронах стриатума и прилежащего ядра перегородки, т.е. в проекционных полях, которые иннервируются дофаминергическими волокнами, исходящими из ствола мозга. В стриатуме, ядре ложа перегородки и в неокортексе выявляется густая сеть аксонов с D2S, пронизывающая всю толщу коры. Аксоны имеют множественные варикозности. D2L также определяется в III–V слоях коры на ГАМК-ергических нейронах, показывающих иммунореактивность к парвальбумину.

Нейроны, в которых выявляется иммунореактивность к D2S, имеют вид, сходный с импрегнированным азотнокислым серебром по методу Гольджи. Иммунореактивный осадок определяется в клеточных телах и проксимальных дендритах, терминалях аксонов. Иммунореактивный осадок, выявляемый с помощью сыворотки с антителами к D2L, дает менее интенсивную картину, и этот осадок выявляется преимущественно в телах нейронов. Многие авторы считают, что местом субклеточной локализации D2S являются мембранные органоиды – плазматическая мембрана и эндоплазматическая сеть, а D2L – перинуклеарная зона и область комплекса Гольджи.

При этом показано, что D2S ингибирует функции, опосредуемые D_1 -рецептором, показывая, что между этими рецепторами возможна взаимосвязь. Это позволяет авторам обоснованно предполагать, что эти две изоформы имеют различные функции *in vivo*. Важным при этом являются результаты исследований [4], которые показали роль ряда полиморфизмов в DRD_2 в определении хода альтернативного сплайсинга, определяющего снижение экспрессии короткой изоформы рецептора, которая в свою очередь приводит к предрасположенности к психоактивным веществам.

Выявлены различия во взаимодействии ГАМК- и глутаматергической систем с дофаминергической системой в стриатуме при различной экспрессии в дофаминергических нейронах D2L и D2S. Выяснено, что обе изоформы рецептора участвуют в пресинаптическом торможении ГАМК-ергической трансмиссии, в то время как в модуляции глутаматергической трансмиссии участвует преимущественно короткая изоформа рецептора при условии, что она экспрессируется выше нормы. Представительство D2L и D2S и соотношение этих изоформ в различных областях мозга может варьировать у разных линий мышей. Для D2L характерна локализация не только в области синаптического контакта, но и в значительном удалении от нее, что позволяет говорить о существовании объемной дофаминергической передачи.

Поведенческие эффекты дофамина неоднократно освещались в литературе. Они достаточно многогранны и зависят от вовлеченности разных подтипов рецепторов дофамина. Главным образом, это четыре основных эффекта: 1) регуляция двигательной активности; 2)

участие в механизмах подкрепления; 3) участие в формировании и хранении памятного следа; 4) регуляция секреторной активности гипофиза.

Многообразие функций дофаминергической системы мозга обеспечивается вовлечением различных типов дофаминовых рецепторов. Однако известно, что при таких широко распространенных формах невропатологии, как болезнь Паркинсона и шизофрения, ведущим фактором является изменение чувствительности и плотности дофаминовых D2-рецепторов.

Нарушения деятельности дофаминергической системы, являющиеся важным звеном патогенеза наркомании и алкоголизма, формируются при участии женских половых гормонов и нейростероидов [5]. Половые стероиды и нейростероиды оказывают свое влияние на все звенья системы регуляции трансмиссии дофамина (экспрессию генов его рецепторов, ход альтернативного сплайсинга первичных транскриптов, активность ферментов синтеза, транспорта и элиминации дофамина [5; 6]). Кроме влияния на нейромедиаторы, дофамин туберо-инфундибулярной системы регулирует выработку и выделение гонадотропинов, определяющих цикличность нейроэндокринных процессов в женском организме, при этом не только в репродуктивной сфере.

Цель настоящего сообщения - анализ особенностей поведения предпочитающих алкоголь крыс на фоне колебаний уровней половых стероидов в динамике эстрального цикла, являющегося моделью овариально-менструального цикла у женщин.

Материалы и методы

Использованные в работе предпочитающие алкоголь (ПА) крысы (с генотипом A_1/A_1 , детерминирующим снижение экспрессии короткой изоформы Д2 рецептора) получены из популяции крыс линии WAG/Rij после генотипирования локуса Taq 1A DRD2, (выполненного под руководством проф. Э.К. Хуснутдиновой), скрещивания гомозиготных животных и выявления в последующем предпочтения алкоголя в тесте двух поилок. Более подробно сведения о ПА крысах приведены в работе [1].

Животных содержали в проволочных клетках, где они могли свободно передвигаться, имея неограниченный доступ к воде и пище. В клетке располагалось не более 5 крыс. Температура в помещении составляла 20-22 °C, продолжительность светового дня 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, оказывающих синхронизирующее действие на регуляторные центры эстрального цикла (ЭЦ).

Поведение ПА крыс (всего 15 самок в возрасте шести месяцев) изучено по

общепринятой методике с использованием установки «квадратное открытое поле» (ОП). Эксперимент длился 50 дней. Перед регистрацией поведенческих реакций брали влагалищный мазок (строго в одно и то же время суток) с целью определения фазы ЭЦ. Полученные результаты систематизировали по стадиям ЭЦ и подвергали статистической обработке с помощью пакета программ Statistica 6.

Вычисление описательных статистических характеристик производили в программе Statistica 6 в модуле «Основные статистики» (*Basic Statistics*). В разделе «Описательные статистики» (*Descriptive Statistics*) вычисляли среднее (среднее арифметическое, *Mean*), стандартную ошибку среднего (*Standard Error of Mean*). Результаты представлены в форме: среднее \pm стандартная ошибка. Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью критерия Стьюдента (значимыми считали различия при уровнях значимости p<0,05).

Результаты и их обсуждение

Количество амбуляций на разных стадиях ЭЦ: диэструс (Д), проэструс (П), эструс (Э) и метэструс (М), отражающее выраженность двигательной активности крыс, приведено в таблице.

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

Кол-	Стадии ЭЦ и результаты сравнения численных характеристик амбуляций								
ВО	(амб.)								
амб.	Д	p	П	p	Э	p	M	p	Д
Общ.	71,20	>0,05	80,80	>0,05	101,27	>0,05	89,60	>0,05	71,20
	<u>+</u> 8,25		<u>+</u> 9,86		<u>+</u> 6,03		<u>+</u> 4,95		<u>+</u> 8,25
Центр.	5,78	>0,05	8,26	>0,05	9,93	>0,05	7,66	>0,05	5,78
	<u>+</u> 1,66		<u>+</u> 2,55		<u>+</u> 2,22		<u>+</u> 1,55		<u>+</u> 1,66
Периф	63,80	>0,05	72,13	<0,05	91,33	>0,05	81,93	<0,05	63,80
ep.	<u>+</u> 6,75		<u>+</u> 7,92		<u>+</u> 5,14		<u>+</u> 4,32		<u>+</u> 6,75

Приведенные в таблице данные показывают, что общая двигательная активность, количество амбуляций в центре и периферии поля повышаются на стадии проэструс. Повышение двигательной активности продолжается и на стадии эструс, достигая своего пика. Сравнение показателей двигательной активности на стадии проэструс и эструс выявляет, что ее повышение происходит за счет увеличения количества амбуляций на периферии поля (p<0,05).

На стадии метэструс по сравнению со стадией эструс общая двигательная активность

снижается. Смена стадии метэструс на диэструс характеризуется снижением двигательной активности как центре, так и на периферии ОП, при этом это снижение значимо на периферии поля (p<0,05).

Анализ исследовательской деятельности на разных стадиях ЭЦ не выявил статистически значимых различий, но показал, что она повышается на стадии проэструс по сравнению со стадией диэструс как на периферии, так и в центре поля. На стадии эструс количество стоек, совершаемых крысами как в центре, так и на периферии поля практически не меняется.

Сопоставление количества стоек, совершаемых крысами на стадиях эструс и метэструс, показывает их тождество в отношении периферии поля, но выявляет близкие к значимым различия в центре поля (p=0.08), где количество стоек резко снижается. Это показывает, что проявляется определенная тенденция, свидетельствующая о повышении уровня тревожности.

Анализ характеристик груминга, обнаружив определенную динамику по стадиям ЭЦ, не выявил статистически значимых изменений в численных характеристиках количества эпизодов и его общей продолжительности. Было отмечено, что спокойная (более комфортная) чистка покровов происходит на стадии диэструс, для которой характерен низкий уровень половых гормонов.

Итак, анализ поведения в ОП показал, что наибольшая выраженность двигательной активности имеет место на стадии эструс ($101,27\pm6,03$ амбуляции) и наименьшая ($71,20\pm8,25$) — на стадии диэструс. Кроме того, на разных стадиях ЭЦ выявлены различия в предпочтении центральных или периферических зон ОП, указывающие на тревожность крыс.

Сопоставление полученных данных с имеющимися в литературе сведениями по крысам линии Вистар [7] показывает, что поведенческие реакции ПА крыс явно отличаются. Если у крыс линии Вистар на стадии проэструс имеет место снижение двигательной активности (что согласуется с низкими концентрациями дофамина и плотностью дофаминовых рецепторов в стриатуме в эту стадию по сравнению со стадией диэструс [8]), то у ПА крыс регистрируется, наоборот, ее повышение.

Исследовательская деятельность у крыс линии Вистар значимо повышается на стадиях проэструс и эструс [7], при отсутствии таких изменений у ПА крыс. Приведенные выше данные об отличиях в поведении крыс линии Вистар и ПА крыс указывают на то, что при алкоголизме и наркомании механизмы влияния эстрадиола на дофаминергическую систему отличаются от контрольных животных. Выявлено, что причиной различий являются особенности активации транскрипционных факторов и сигнал-трансдукторных путей в

нейронах лимбических структур мозга у контрольных животных и на фоне экспозиции наркотических веществ [9].

Известно, что полиморфные локусы генов, продукты экспрессии которых участвуют в дофаминергической трансмиссии, влияют на взаимодействие эстрадиола и D2. В частности, это установлено в отношении генотипа COMT Val 158 Met [10]. Исходя из этого, можно полагать, что генотип A_1/A_1 DRD_2 также может иметь значение в указанном процессе. Однако вопрос об ассоциациях этого генотипа с особенностями дофаминергической трансмиссии и влиянии на нее половых стероидов на сегодняшний практически не исследован.

На сегодняшний день известно, что минорные аллели (Т) двух фланкирующих 6 экзон интронных локусов (гз 2283265 и гз 1076560) *DRD*₂, снижающие экспрессию короткой изоформы Д2 рецептора, находятся в неравновесии по сцеплению с минорным аллелем (Т=A1, D'=0,855) локуса Таq 1A [4]. В силу этого у ПА крыс, имеющих генотип A₁/A₁, повышено содержание дофамина по сравнению с непредпочитающими алкоголь крысами [11], и это предопределяет наличие у них высокой двигательной активности в ОП.

Можно полагать, что у ПА крыс повышенное содержания эстрадиола на стадиях проэструс и эструс, оказывая влияние на экспрессию изоформ Д2 рецептора, усиливает генетически предопределенное снижение короткой изоформы Д2 рецептора. Основанием для подобного предположения являются результаты ряда работ, в которых доказано изменение эстрадиолом хода альтернативного сплайсинга гетерогенной ядерной РНК Д2, в результате которого снижается образование короткой в пользу длинной изоформы Д2 рецептора [12]. По мнению ряда авторов, преимущественно длинная изоформа принимает участие в регуляции моторных функций [13].

Нельзя исключить и возможность различий в изоформах ЕRα (выявлено 12 изоформ, [14]) в дофаминреактивных нейронах у крыс линии Вистар и ПА крыс, которые также могут вносить свой вклад в формирование особенностей влияния эстрадиола на ДЕС. Известно, что экспериментально созданный дефицит половых гормонов (гонадэктомия) приводит к снижению двигательной активности крыс и повышению уровня тревожности [15]. Введение 17β-эстрадиола на фоне гонадэктомии (заместительная терапия) не изменяет показателей двигательной и исследовательской активности. Однако хроническое введение 17β-эстрадиола (в течение 14 дней) интактным самкам (модель гиперэстрогении) сопровождается достоверным увеличением двигательной и исследовательской активности и явлениями тревожности.

Приведенные данные позволяют объяснить сдвиги в поведении ПА крыс гиперэстрогенией. При этом уровень эстрадиола в ткани мозга может быть выше, чем в

плазме крови, что предопределено возможностью его образования в нервной ткани различных структур лимбической системы мозга из тестостерона за счет активности ферментов ароматазного комплекса. Анализ содержания тестостерона на модели гиперэстрогении показал, что во всех структурах лимбической системы отмечается повышение его содержания, что является важным в обеспечении необходимого субстрата для биосинтеза эстрогенов в мозге [15].

Список литературы

- 1. Женский алкоголизм в цифрах. Наркология // Медицинский портал [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://medportal.ru/enc/narcology/reading/74 (дата обращения: 19.03.2018).
- 2. Becker J.B., Hu M. Sex differences in drug abuse // Frontiers Neuroendocrin. 2008. V. 29. P. 36–47.
- 3. Ахмадеев А.В. Феномен половой дифференциации мозга и его экспрессия в миндалевидном комплексе мозга / А.В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина. Уфа: РИЦ БашГУ, 2015. 116 с.
- 4. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory / Y. Zhang et al. // Journal The Proceedings of the National Academy of Sciences USA. -2007. $-N_{\odot}$ 51. -P. 20552-20557.
- 5. Testosterone induces molecular changes in dopamine signaling pathway molecules in the adolescent male rat nigrostriatal pathway / T.D. Purves-Tyson et al. // PLoS One. -2014. $-N_{\odot}$ 3. P.e91151.
- 6. Эстрогены и головной мозг / Е.Н. Карева и др. // Вестник РАМН. 2012. № 2. С. 48-59.
- 7. Казакова С.Б., Федотова Ю.О., Сапронов Н.С. Влияние тамоксифена на тревожность у интактных и овариэктомированных самок крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, № 5. С. 3-8.
- 8. Lévesque D., Gagnon S., Paolo T. Striatal D1 dopamine receptor density fluctuates during the rat estrous cycle // Neurosci Lett. − 1989. − № 3. − P. 345-350.
- 9. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia / C.S. Weiner et al. // Hum. Mol. Genet. 2008. № 15. P. 2293–2309.
- 10. Jacobs E., D'Esposito M. Estrogen shapes dopamine-dependent cognitive processes: implications for women's health // J. Neurosci. 2011. V. 31. P. 5286–5293.
- 11. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Нейробиологические характеристики

- предпочитающих и отвергающих алкоголь крыс, имеющих различия генотипа по локусу Taq1A DRD2 // Вопросы наркологии. 2013. № 3. С. 22-28.
- 12. 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. N = 1. P. 159-166.
- 13. Beaulieu J.M., Gainetdinov R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors // Pharmacological Reviews. −2011. −№ 1. −P. 182-217.
- 14. Variants in the estrogen receptor alpha gene and its mRNA contribute to risk for schizophrenia / C.S. Weickert et al. // Hum. Mol. Genet. 2008. V. 17. P. 2293–2309.
- 15. Сашков В.А. Взаимосвязь уровня половых стероидов в мозге с поведением и тревожностью у самок крыс с разным гормональным статусом // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. XVI. N 3. С. 22-25.