

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 577.25

ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1А И 7 ПОДТИПА В МОЗГЕ КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ ЗАЩИТНО-ОБОРОНИТЕЛЬНЫМ АГРЕССИВНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ ИЛИ ЕГО ОТСУТСТВИЕМ

© 2020 г. Т. В. Ильчибаева¹, А. С. Цыбко¹ *, Е. М. Кондаурова¹,
А. И. Ковецкая¹, Р. В. Кожемякина¹, В. С. Науменко¹

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 03.06.2019 г.

После доработки 29.07.2019 г.

Принята к публикации 05.08.2019 г.

Известно, что серотониновые рецепторы 1А подтипа (5-НТ1А) вовлечены в регуляцию агрессивного поведения. Однако, в свете новых данных об их гетеродимеризации и антагонистическом взаимодействии с серотониновыми рецепторами 7 типа (5-НТ7), актуальным является исследование вовлечения 5-НТ7-рецепторов в агрессивное поведение. Для этого необходимо прежде всего исследовать паттерны совместной экспрессии 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в мозге животных, различающихся по выраженности генетически детерминированного агрессивного поведения. В данной работе нами была изучена экспрессия серотониновых 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в ряде структур головного мозга крыс с генетически обусловленным агрессивным поведением или его отсутствием. Были выявлены значительные изменения в экспрессии данных типов рецепторов как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Особый интерес представляют обнаруженные изменения в уровнях мембранного белка 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в среднем мозге и гиппокампе агрессивных крыс. Снижение уровня 5-НТ1А-рецептора в среднем мозге сопровождается увеличением уровня данного рецептора в гиппокампе, в то время как уровень 5-НТ7-рецептора повышается в среднем мозге и снижается в гиппокампе агрессивных животных по сравнению с ручными. Эти данные также свидетельствуют о наличии взаимодействия между 5-НТ7- и 5-НТ1А-рецепторами. Также обращает на себя внимание усиление экспрессии 5-НТ7-рецепторов во фронтальной коре и снижение уровня мРНК гена 5-НТ7-рецепторов в гипоталамусе агрессивных животных по сравнению с ручными. Таким образом, впервые выявлены значительные изменения в экспрессии 5-НТ7-рецепторов в мозге крыс, селекционированных на высокий уровень агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку. Обнаружены генотип-зависимые особенности совместной экспрессии 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в структурах мозга исследованных животных. Полученные данные позволяют предположить, что взаимодействие между 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторами может быть одним из важнейших факторов регуляции генетически-детерминированного агрессивного поведения.

Ключевые слова: высокоагрессивные и неагрессивные крысы, количественный ОТ-ПЦР, вестерн-блот, серотонин, 5-НТ1А-рецептор, 5-НТ7-рецептор

DOI: 10.31857/S1027813320020053

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что серотониновая (5-НТ) система мозга играет важнейшую роль в регуляции агрессивного поведения [1, 2]. Свой функции серотонин выполняет посредством большого числа

рецепторов, среди которых особое внимание привлекают рецепторы 1А подтипа (5-НТ1А), в первую очередь благодаря их способности к ауторегуляции функциональной активности 5-НТ нейронов [3]. Неоднократно был продемонстрирован ингибирующий эффект агонистов 5-НТ1А-рецептора на агонистическое поведение у мышей и крыс (см. обзор Takahashi и др. [2]). Также было показано, что мыши со сверхэкспрессией 5-НТ1А-рецептора (особенно в ядрах шва) проявляют повышенную агрессивность из-за хронического снижения активности 5-НТ нейронов и сопутствующего дефицита 5-НТ [4].

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-т Ак. Лаврентьева, 10; e-mail: antoncybko@mail.ru.

Принятые сокращения: 5-НТ — серотонин; 5-НТ1А-рецептор — рецептор серотонина 1А подтипа; 5-НТ7-рецептор — рецептор серотонина 7 типа; rPol_II (RNA polymerase II) — ДНК-зависимая РНК-полимераза 2; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; ОТ — обратная транскрипция; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

В последние годы особое внимание стало уделяться серотониновым рецепторам 7 типа (5-НТ7). Важной особенностью 5-НТ7-рецепторов является способность к гетеродимеризации с 5-НТ1А-рецепторами [5]. В 5-НТ1А-5-НТ7 комплексах у 5-НТ1А-рецепторов снижена способность к активации G_i белка и, как следствие, K^+ -каналов, и в то же время облегчена интернализация гетеродимеров при связывании с агонистом, что очень редко наблюдается вне гетеродимерных комплексов. Способность 5-НТ7-рецепторов образовывать гетеродимеры с 5-НТ1А-рецепторами, приводя тем самым к усилению интернализации последних, делает 5-НТ7-рецепторы перспективной мишенью для терапии тревожности и депрессии [5]. Однако спектр физиологических функций 5-НТ7-рецепторов гораздо шире и включает в себя также регуляцию циркадных ритмов, обучения и памяти, терморегуляции, боли и ответа на стресс [6]. Вместе с тем нет ни одной работы, в которой бы изучалось участие 5-НТ7-рецепторов в механизмах агрессивного поведения.

Интересной моделью агрессивного поведения являются крысы, селекционированные на высокий уровень защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку. Однако селекционированные агрессивные животные демонстрируют высокий уровень агрессии не только по отношению к человеку, но и по отношению к другим крысам в зоосоциальных взаимодействиях [7, 8]. Также показано, что агрессивные крысы отличаются от неагрессивных (“ручных”) крыс и по многим другим поведенческим и физиологическим характеристикам, таким как высокие тревожность и двигательная активность [9, 10], сниженное исследовательское поведение [11], а также уровнями моноаминов, аминокислот и гормонов [12, 13]. Как на ранних, так и на более поздних этапах селекции у высокоагрессивных крыс отмечались повышенный уровень кортикостерона в сыворотке крови [12, 14, 15], сниженный метаболизм 5-НТ [14], повышенный уровень глутамина и, наоборот, сниженный уровень ГАМК [15], а также изменение иммунного статуса [16], уровня цитокинов [17] и окситоцинергической системы [18]. В недавних работах также показаны изменения в экспрессии нейротрофических факторов BDNF и GDNF в мозге высокоагрессивных крыс [19–21]. Был показан вклад 5-НТ1А-рецепторов и в регуляцию генетически-детерминированного агрессивного поведения. Так, было выявлено снижение плотности 5-НТ1А-рецепторов в гипоталамусе, фронтальной коре и миндалевидном комплексе агрессивных крыс [22], что сопровождалось снижением функциональной активности рецепторов [23]. Десенситизация 5-НТ1А-рецепторов, правда, не сопровождающаяся снижением их плотности, была обнаружена и у детенышей агрессивных крыс [24]. И у взрослых, и у молодых

агрессивных крыс однократная инъекция агониста 5-НТ1А-рецепторов 8-ОН-ДРАТ вызывала снижение агрессивности [24]. Однако, паттерны совместной экспрессии 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в структурах мозга этих крыс все еще не были изучены.

Таким образом, целью данного исследования стало изучение экспрессии серотониновых 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторов в структурах мозга у крыс с генетической предрасположенностью к агрессивному поведению или ее отсутствием.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Эксперименты проводили на взрослых (3 мес., 300–350 г) самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*), селекционированных в Институте цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирск. Селекция проводилась в течение более чем 85 поколений в двух направлениях: на высокий уровень агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку, и на его отсутствие. Животных содержали по 4 особи в металлических клетках размером 50 × 33 × 20 см в стандартных лабораторных условиях (температура 18–22°C, относительная влажность 50–60%, естественное освещение (12 ч света и 12 ч темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде. В эксперименте использовали по 8 животных каждой линии. После декапитации из мозга выделяли следующие структуры: гиппокамп, фронтальная кора, область среднего мозга, гипоталамус и миндалевидный комплекс. Структуры мозга заморозили в жидком азоте и хранили при –80°C до процедуры выделения общей РНК и мембранного белка. Содержание экспериментальных животных и все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80023), 1996.

Работу с животными выполняли в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (гранты Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010).

Количественный ОТ-ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (“Life technologies”, США), обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RQ1RNase-Free DNase, #M6101 Promega Corporation, США) в соответствии с протоколами производителей. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [25–27]. РНК разводили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при –80°C.

Реакция обратной транскрипции. 1 мг общей РНК смешивали с случайными гексануклеотидными праймерами (конечная концентрация

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген/область	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °C	Длина ПЦР продукта, п.н.
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtcactctctgccctactcttg-3' R 5'-ccagagcacataacccagagtagt-3'	62	175
<i>Htr7</i>	F 5'-tgatctcggtgtgcttcgtc-3' R 5'-gtgacactaacgaaaggcatgac-3'	63	115
<i>Rpol_II</i>	F 5'-ttgtcgggcagcagaacgtg-3' R 5'-caatgagacctctctcctccc-3'	64	186

праймера составила 5 мкМ) и 2.25 мкмольями стерильного KCl, денатурировали при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе БИС № 111-05.60 (Россия), после чего проводили отжиг при 41°C в течение 15 мин, затем добавляли смесь, содержащую обратную транскриптазу М-MLV (200 ед.), Tris-HCl (pH 8.3, 0.225 мкмоль), смесь dNTP (0.015 мкмоль каждого), DTT (0.225 мкмоль) и MnCl₂ (0.03 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 41°C в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре –20°C.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании “Биосан” (Новосибирск, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (R-402, Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche Applied Science, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95°C, 1 цикл; 10 с при 95°C, 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°C, 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 нг/мкл амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – lg Р (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480. Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия генов *Htr1A* (5-HT1A-рецептор) и *Htr7* (5-HT7-рецептор) представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-по-

лимеразы 2 (*rPol_II*), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Вестерн-блот анализ. Мембранный белок выделяли, гомогенизируя образцы в буфере, содержащем 300 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.2, 1 мМ EDTA, 5 мМ β-меркаптоэтанол и ингибиторы протеаз (GE Healthcare, США). Центрифугировали на 500 g 15 мин при 4°C, отбирали супернатант и центрифугировали на 20000 g при 4°C в течение часа. Отбирали супернатант, оставшийся в пробирке осадок ресуспензировали в гомогенизирующем буфере.

Концентрацию общего белка оценивали с помощью BCA метода, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) и спектрофотометр Eppendorf (BioPhotometer plus, Eppendorf, США). В дальнейшем образцы приводили к равной концентрации (1 мг/мл) с помощью 4-кратного Леммли буфера, содержащего 62 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 10% сахарозы, 2% SDS, 5% β-меркаптоэтанол и денатурировали с помощью нагрева в течение 10 мин при 95°C. Образцы (10–15 мкг на дорожку) разделяли с помощью 10%-ного SDS-PAGE гель-электрофореза и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), используя полусухой электроблоттинг, в течение ночи при силе тока 50 мА. Для переноса использовали буфер, содержащий 190 мМ глицина, 25 мМ Tris-HCl pH 8.3 и 20% метанола. В качестве маркера использовали смесь Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали с 5%-ным сухим обезжиренным молоком Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), разведенном в TBS-Т буфере (Tris Bufferd Saline, Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с добавлением 0.1% Tween 20, в течение часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. Были использованы первичные поликлональные антитела кролика к 5-HT1A-рецептору (1 : 1000, ab85615, Abcam, UK) или моноклональные антитела кролика к 5-HT7-рецептору (1 : 500, ab128892, Abcam, UK). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к GAPDH,

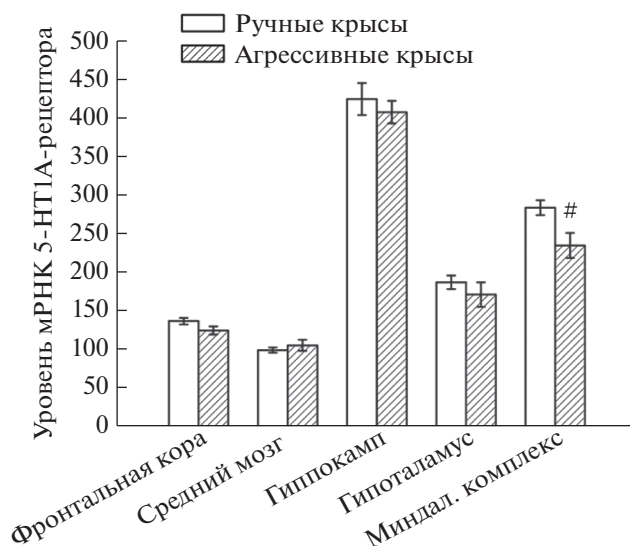


Рис. 1. Уровень мРНК гена *Htr1a* в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. Число копий кДНК рецептора отнесено на 100 копий кДНК *Rpol_II*. # $p = 0.06$ – по сравнению с ручными крысами.

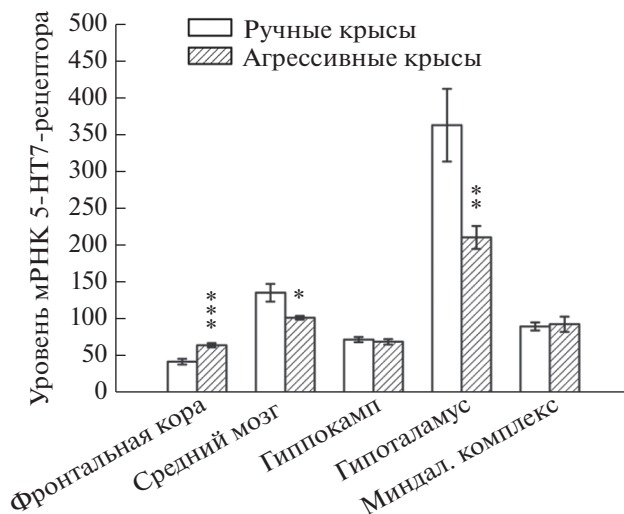


Рис. 2. Уровень мРНК гена *Htr7* в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. Число копий кДНК рецептора отнесено на 100 копий кДНК *Rpol_II*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с ручными крысами.

конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 500; G-21234, Invitrogen, США). Отмывали мембрану 5×5 мин буфером TBS-T, добавляли вторичные поликлональные антитела козы, направленные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000, sc-2004, Thermo Fisher Scientific Inc., США), и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Повторяли отмывку мембраны. Все связанные антитела визуализировали с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя и сканера C-DiGit для документации хемилюминесцентных блотов (LI-COR, США). Полученное изображение денситометрировали, и количественно оценивали содержание белка при помощи программы Scion Image (Scion Corporation, www.scioncorp.com). Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию GAPDH, которая конститутивна для клеток мозга, и представляли, как процент от экспрессии белка у ручных животных.

Статистическая обработка результатов. Результаты представляли как $m \pm SEM$ и сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим апостериорным сравнением с помощью LSD теста Фишера. Критерий значимости результатов – $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительная селекция на высокий уровень агрессии не привела к значительным различиям в уровне мРНК гена *Htr1a* (рис. 1). В исследуемых

структурах мозга достоверных различий не было установлено, однако в миндалевидном комплексе высокоагрессивных крыс наблюдается тенденция к снижению уровня мРНК гена *Htr1a* по сравнению с ручными ($F_{(1,9)} = 4.53$, $p = 0.06$).

В то же время у животных с высоким уровнем защитно-оборонительной агрессии обнаружили значительные изменения в экспрессии гена *Htr7* (рис. 2). Было выявлено статистически значимое снижение уровня мРНК гена *Htr7* в среднем мозге ($F_{(1,12)} = 5.73$, $p < 0.05$) и гипоталамусе ($F_{(1,12)} = 8.64$, $p < 0.01$) агрессивных животных. Одновременно с этим во фронтальной коре уровень мРНК данного гена выше у агрессивных крыс по сравнению с ручными ($F_{(1,13)} = 23.42$, $p < 0.001$). В остальных исследуемых структурах различий между агрессивными и не агрессивными крысами в экспрессии гена *Htr7* не найдено.

Интересные результаты были обнаружены при исследовании уровней мембранного белка 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецептора. Было установлено, что высокоагрессивные животные имеют более низкий уровень белка 5-НТ1А-рецептора в среднем мозге ($F_{(1,11)} = 36.77$, $p < 0.001$), а в гиппокампе более высокий ($F_{(1,12)} = 9.37$, $p < 0.01$) по сравнению с неагрессивными (рис. 3). В то же время в данных структурах мозга наблюдается обратная картина с уровнем 5-НТ7-рецептора: в среднем мозге больше белка 5-НТ7-рецептора ($F_{(1,11)} = 6.24$, $p < 0.05$), в гиппокампе меньше белка ($F_{(1,10)} = 9.66$, $p < 0.01$) у агрессивных крыс по сравнению с ручными (рис. 4). Также был выявлен более высокий уровень белка 5-НТ7-рецептора во фронтальной коре

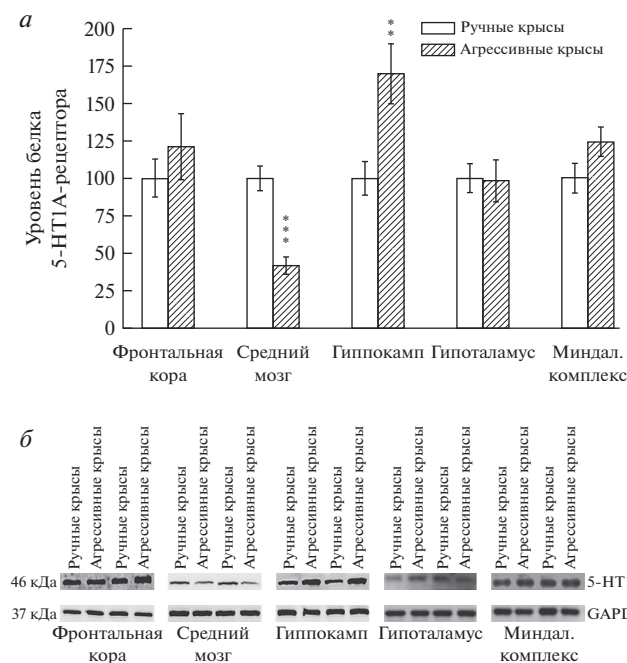


Рис. 3. Уровень белка 5-HT1A-рецептора в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. *а* – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала; *б* – результат иммуноблота на мембране. Уровень белка 5-HT1A-рецептора выражен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH, и представлен, как процент от экспрессии белка у ручных животных. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с ручными крысами.

агрессивных животных ($F_{(1,11)} = 12.67$, $p < 0.001$). В остальных исследуемых структурах различий в уровнях изучаемых белков не было обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленные нами разнонаправленные различия в уровнях мембранного белка 5-HT1A- и 5-HT7-рецепторов в среднем мозге и гиппокампе агрессивных крыс свидетельствуют о гетеродимеризации между этими рецепторами, хорошо известной из литературы. Ранее нами было сделано предположение, что транскрипционная регуляция, вероятно, незначительно влияет на паттерн экспрессии 5-HT1A-рецепторов у агрессивных крыс [28]. Учитывая, что в данной работе не обнаружено существенных различий в уровне мРНК 5-HT1A-рецептора между агрессивными и ручными крысами, и одновременно выявлены значительные изменения уровня мембранного белка 5-HT1A-рецептора у агрессивных животных, высказанное нами предположение имеет под собой все основания. Более того, эти изменения, наблюдаемые исключительно на посттрансляционном уровне, могут быть обусловлены именно влиянием

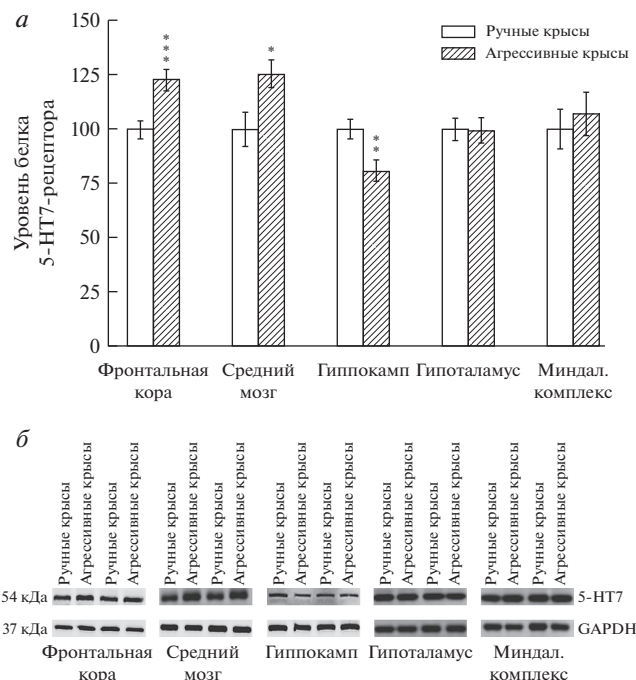


Рис. 4. Уровень белка 5-HT7-рецептора в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. *а* – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала; *б* – результат иммуноблота на мембране. Уровень белка 5-HT7-рецептора выражен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH, и представлен, как процент от экспрессии белка у ручных животных. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с ручными крысами.

нием 5-HT7-рецепторов. Интересно, что еще в первой работе, посвящённой оценке плотности 5-HT1A-рецепторов в мозге высокоагрессивных крыс с помощью лиганда [3H]8-ОН-DPAT [22], была высказана догадка, что выявленные различия в равной степени отражают вовлечение и 5-HT7-рецепторов в регуляцию защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку. Надо отметить, что полученные нами результаты не воспроизводят данные о снижении плотности 5-HT1A-рецепторов во фронтальной коре, гипоталамусе и миндалевидном комплексе агрессивных крыс более ранних поколений селекции [22, 23]. В миндалевидном комплексе нами обнаружено только снижение уровня мРНК 5-HT1A-рецептора, и лишь на уровне тенденции. Возможно, расхождение в результатах связано, с одной стороны, с низкой селективностью использовавшегося [3H]8-ОН-DPAT. Также следует иметь в виду, что определение плотности рецепторов с помощью меченного тритием лиганда показывает количество активных рецепторов на мембране клетки, тогда как определение белка с помощью Вестерн-блот анализа показывает количество общего мембранного белка ре-

цепторов. С другой стороны стоит учитывать и тот факт, что между настоящим и предыдущим исследованиями находится, по меньшей мере, 40 поколений селекции крыс.

Более высокий уровень 5-НТ7-рецепторов в среднем мозге агрессивных крыс сопровождается низким уровнем 5-НТ1А-рецепторов, что косвенно свидетельствует о гетеродимеризации между ними, ведущей к усиленной интернализации и снижению числа 5-НТ1А-рецепторов на мембране. Гипотетически, гетеродимеризация 5-НТ7-рецепторов с 5-НТ1А-рецепторами [5] и предполагаемое ингибирование ГАМК-интернейронов в среднем мозге [29] должны усиливать секрецию и обмен серотонина, однако сниженный уровень серотонина у высокоагрессивных крыс это хорошо известный факт [12, 14]. Таким образом, вклад 5-НТ7-рецепторов в регуляцию обмена серотонина у крыс с генетически детерминированным агрессивным поведением требует дальнейшего исследования.

Особое внимание привлекает сниженный уровень белка 5-НТ7-рецептора в гиппокампе и мРНК в гипоталамусе агрессивных крыс. В настоящее время не вызывает сомнения значительная роль данных рецепторов в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) и стрессорного ответа [30]. И если активность 5-НТ7-рецепторов в коре надпочечников напрямую связана с усилением секреции кортикостерона при остром и хроническом стрессе [31], 5-НТ7-рецепторы в ЦНС, в особенности в гиппокампе, вовлечены в поддержание отрицательной обратной связи в ГГНС, так как отвечают за регуляцию экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР) [32]. Показано, что снижение экспрессии 5-НТ7-рецепторов в гиппокампе влечет за собой снижение экспрессии ГР, что нарушает отрицательную обратную связь и провоцирует избыточную секрецию кортикостерона [33]. Принимая во внимание, что исследуемые нами крысы имеют более низкий уровень мРНК ГР в гиппокампе [34], и отличались повышенным базальным уровнем кортикостерона на всех этапах селекции [14, 35, 36], можно предположить, что все это является следствием сниженной экспрессии гиппокампальных 5-НТ7-рецепторов. Впрочем, сам кортикостерон может подавлять экспрессию 5-НТ7-рецепторов [30], и его высокий уровень в раннем постнатальном развитии способствует нарушению их функции и, как следствие, разбалансировке ГГНС [32]. Вероятно, у высокоагрессивных крыс изменения в ГГНС должны происходить еще в пренатальный период, поскольку высокий уровень кортикостерона у них наблюдается уже на эмбриональной стадии развития [37]. Возможно, основания для дисрегуляции ГГНС у агрессивных крыс были заложены еще на ранних этапах селекции и имеют эпигенетическую природу, связанную с ги-

перметиллированием промоторов ГР [34]. Полученные нами результаты существенно дополняют эту картину и позволяют представить нарушение стрессорного ответа у высокоагрессивных крыс как комплексный процесс разрушения отрицательной обратной связи в ГГНС, где изначально высокий уровень метилирования промоторов ГР создает условия для повышения уровня кортикостерона, что, в свою очередь, подавляет экспрессию 5-НТ7 рецепторов, влекущее за собой еще более сильное подавление экспрессии ГР.

Имеется ряд свидетельств важной роли 5-НТ7-рецептора в регуляции гиппокамп-зависимого обучения [6]. Вероятно, здесь немаловажную роль играет способность 5-НТ7-рецепторов изменять морфологию нейронов, удлиняя нейриты, индуцируя синаптогенез и формирование новых шипиков на дендритах [6]. В то же время нами выявлено снижение уровня белка 5-НТ7-рецептора в гиппокампе агрессивных крыс. Ранее нами был продемонстрирован сниженный уровень полной и усеченной форм TrkB рецептора и преобладание proBDNF в гиппокампе агрессивных крыс [21]. Эти данные, вкуче с новыми результатами об экспрессии 5-НТ7-рецептора, свидетельствуют о серьезных нарушениях в синаптической пластичности и могут объяснить нарушение пространственного обучения у высокоагрессивных крыс [11].

Поскольку реакция страха по определению является важнейшим компонентом защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом, важным вопросом является вклад, который вносят 5-НТ1А- и 5-НТ7-рецепторы в реализацию данного поведения. Известно, что антагонизм между обоими подтипами рецепторов вовлечен в процесс консолидации/реконсолидации памяти о страхе [38]. Считается, что повышенная активность постсинаптических 5-НТ1А-рецепторов в гиппокампе снижает формирование памяти о страхе за счет общего снижения активности нейронов [38], в то время как активация 5-НТ7-рецепторов производит противоположный эффект [6]. Напротив, активация пресинаптических 5-НТ1А-рецепторов снижает секрецию 5-НТ, что оказывает положительное влияние на формирование памяти [38]. Вместе с тем, известно, что активация 5-НТ1А-рецепторов в гиппокампе, но не ядрах шва среднего мозга, снижает амплитуду рефлекса вздрагивания [39]. До сих пор неизвестно, как происходит формирование памяти о ситуации, вызвавшей страх у крыс с генетически детерминированным высоким уровнем агрессивного поведения, показано только, что они характеризуются более выраженной рефлекторной реакцией на неожиданные средовые стимулы [9, 21, 40]. В то же время мы выявили снижение уровня 5-НТ7-рецепторов в гиппокампе агрессивных крыс и одновременное повышение там уровня 5-НТ1А-рецепторов. С одной стороны это противоречит представлениям о вкла-

де данных рецепторов в формирование рефлекторной реакции вздрагивания. С другой стороны указывает на то, что рефлекс вздрагивания у высокоагрессивных крыс слабо зависит от контекста и таким образом повышение уровня 5-HT1A-рецепторов в гиппокампе не оказывает решающего влияния на амплитуду вздрагивания. Кроме того, даже большую роль здесь может играть миндалевидный комплекс [39], однако оценка соотношения 5-HT1A- и 5-HT7-рецепторов в данной структуре у высокоагрессивных крыс является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, нами впервые выявлены особенности экспрессии 5-HT7-рецепторов в мозге крыс, селекционированных на высокий уровень агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку по сравнению с ручными животными. Полученные результаты позволяют предполагать, что 5-HT7-рецепторы могут быть вовлечены в регуляцию стресса и формирование реакции страха у высокоагрессивных крыс. В ходе данной работы выявлены генотип-зависимые особенности паттернов экспрессии 5-HT1A- и 5-HT7-рецепторов в мозге высокоагрессивных и неагрессивных крыс, что позволяет предположить роль взаимодействия между этими рецепторами в регуляции агрессивного поведения. Однако, гетеродимеризация между 5-HT1A- и 5-HT7-рецепторами требует более пристального исследования, поскольку может быть одним из важнейших факторов регуляции генетически-детерминированного агрессивного поведения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Содержание животных осуществлялось за счет средств бюджетного проекта 0324-2019-0041-С-01; работа поддержана грантом Российского научного фонда (грант № 19-15-00025).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Popova N.K.* // Bioessays. 2006. V. 28. P. 495–503.
2. *Takahashi A., Quadros I.M., de Almeida R.M., Miczek K.A.* // Curr. Top. Behav. Neurosci. 2012. V. 12. P. 73–138.
3. *Popova N.K., Naumenko V.S.* // Rev. Neurosci. 2013. V. 24. P. 191–204.
4. *Audero E., Mlinar B., Baccini G., Skachokova Z.K., Corradetti R., Gross C.* // J. Neurosci. 2013. V. 33. P. 8678–8888.
5. *Naumenko V.S., Popova N.K., Lacivita E., Leopoldo M., Ponimaskin E.G.* // CNS Neurosci. Ther. 2014. V. 20. P. 582–590.
6. *Blattner K.M., Canney D.J., Pippin D.A., Blass B.E.* // ACS Chem. Neurosci. 2019. V. 10. P. 89–119.
7. *Plyusnina I.Z., Solov'eva M.Y., Oskina I.N.* // Behav. Genet. 2011. V. 41. P. 583–592.
8. *Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Konoshenko M.Y., Popova N.K., Naumenko V.S.* // J. Ethology. 2017. V. 35. P. 75–81.
9. *Науменко В.С., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З., Попова Н.К.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 1. С. 86–90.
10. *Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K.* // Behav. Genet. 2009. V. 39. P. 202–212.
11. *Plyusnina I.Z., Shchepina O.A., Os'kina I.N., Trut L.N.* // Neurosci. Behav. Physiol. 2008. V. 38. P. 511–516.
12. *Albert F.W., Shchepina O., Winter C., Römpfer H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., Kratzsch J., Sohr R., Trut L.N., Thiery J., Morgenstern R., Plyusnina I.Z., Schöneberg T., Pääbo S.* // Horm. Behav. 2008. V. 53. P. 413–421.
13. *Гулевич Р.Г., Акулов А.Е., Шихевич С.Г., Кожемякина Р.В., Плюснина И.З.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 432–438.
14. *Naumenko E.V., Popova N.K., Nikulina E.M., Dygalo N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Markel A.L.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 1989. V. 33. P. 85–91.
15. *Plyusnina I., Oskina I.* // Physiol. Behav. 1997. V. 61. P. 381–385.
16. *Idova G., Alperina E., Plyusnina I., Gevorgyan M., Zhukova E., Konoshenko M., Kozhemyakina R., Shui-Wu W.* // Neurosci. Lett. 2015. V. 609. P. 103–108.
17. *Alperina E., Idova G., Zhukova E., Zhanaeva S., Kozhemyakina R.* // Neurosci. Lett. 2019. V. 692. P. 193–198.
18. *Gulevich R., Kozhemyakina R., Shikhevich S., Konoshenko M., Herbeck Y.* // Physiol. Behav. 2019. V. 199. P. 210–218.
19. *Ilchibaeva T.V., Kondaurova E.M., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Popova N.K., Naumenko V.S.* // Behav. Brain Res. 2015. V. 290. P. 45–50.
20. *Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Popova N.K., Naumenko V.S.* // Eur. J. Neurosci. 2016. V. 44. P. 2467–2473.
21. *Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Kondaurova E.M., Popova N.K., Naumenko V.S.* // Behav. Brain Res. 2018. V. 343. P. 102–110.
22. *Popova N.K., Avgustinovich D.F., Kolpakov V.G., Plyusnina I.Z.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 1998. V. 59. P. 793–797.
23. *Popova N.K., Naumenko V.S., Plyusnina I.Z., Kulikov A.V.* // J. Neurosci. Res. 2005. V. 80. P. 286–292.
24. *Naumenko V.S., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.F., Kulikov A.V., Popova N.K.* // Behav. Brain Res. 2013. V. 243. P. 97–101.
25. *Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K.* // J. Neurosci. Methods. 2005. V. 141. P. 97–101.
26. *Науменко В.С., Куликов А.В.* // Мол. биол. Т. 40. № 1. С. 37–44.
27. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V.* // J. Neurosci. Methods. 2008. V. 170. P. 197–203.
28. *Kondaurova E.M., Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Popova N.K., Naumenko V.S.* // Behav. Brain Res. 2016. V. 310. P. 20–25.
29. *Hauser S.R., Hedlund P.B., Roberts A.J., Sari Y., Bell R.L., Engleman E.A.* // Front. Neurosci. 2015. V. 8. P. 448.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00448>
30. *Terrón J.A.* // Rev. Neurosci. 2014. V. 25. P. 439–449.

31. *García-Iglesias B.B., Mendoza-Garrido M.E., Gutiérrez-Ospina G., Rangel-Barajas C., Noyola-Díaz M., Terón, J.A.* // *Neuropharmacology*. 2013. V. 71. P. 216–227.
32. *Hellstrom I.C., Dhir S., Diorio J.C., Zhang T.Y., Meaney M.J.* // *Philosoph. Transact. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2012. V. 367. P. 2495–2510.
33. *Laplante P., Diorio J., Meaney M.J.* // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2002. V. 139. P. 199–203.
34. *Гербек Ю.Э., Оськина И.Н., Гулевич Р.Г., Плюснина И.З.* // *Цитология и генетика*. 2010. Т. 44. № 2. С. 45–52.
35. *Оськина И.Н., Плюснина И.З., Сысолетина А.Ю.* // *Журн. эвол. биохим. и физиологии*. 2000. Т. 36. № 2. С. 120–126.
36. *Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Y., Kozhemyakina R.V., Herbeck Y.E., Prasolova L.A., Os-kina I.N., Plyusnina I.Z.* // *Physiol. Behav.* 2015. V. 144. P. 116–23.
37. *Трут Л.Н., Оськина И.Н., Прасолова Н.А., Плюснина И.З.* // *Доклады Академии наук*. 1998. Т. 360. № 3. С. 428–432.
38. *Stiedl O., Pappa E., Konradsson-Geuken Å., Ögren S.O.* // *Frontiers in Pharmacology*. 2015. V. 6. P. 162. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00162>
39. *Almada R.C., Borelli K.G., Albrechet-Souza L., Brandão M.L.* // *Behav. Brain Res.* 2009. V. 203. P. 279–287.
40. *Науменко В.С., Кожмякина Р.В., Плюснина И.З., Попова Н.К.* // *Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2013. Т. 63. № 4. С. 479–485.

The Patterns of Expression of the Serotonin Receptors 1A and 7 in the Brain of Rats with Genetically-Defined Fear-Induced Aggressive Behavior or Its Absence

T. V. Ilchibaeva^a, A. S. Tsybko^a, E. M. Kondaurova^a,
A. I. Kovetskaya^a, R. V. Kozhemyakina^a, and V. S. Naumenko^a

^a*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics
of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

It is known that the serotonin receptors of 1A subtype (5-HT1A) are involved in the regulation of aggressive behavior. However, new data on their heterodimerization and antagonistic interaction with serotonin receptors of subtype 7 suggest that the involvement of 5-HT7-receptors in aggressive behavior has to be studied as well. To do this, first of all, it is necessary to investigate patterns of co-expression of 5-HT1A- and 5-HT7-receptors in the brain of animals, which differ in the severity of genetically-defined aggressive behavior. In present work, we studied the expression of serotonin 5-HT1A- and 5-HT7-receptors in brain structures of rats with genetically-defined aggressive behavior or its absence. Significant changes in the expression of these receptors at both the mRNA level and the protein level were found. The particular interest is drawn to the detected changes in the 5-HT1A- and 5-HT7-receptors in the midbrain and hippocampus of aggressive rats. A decrease in the level of 5-HT1A-receptor in the midbrain is accompanied by an increase in the level of this receptor in the hippocampus, while the level of 5-HT7-receptors protein levels increased in the midbrain and decreased in the hippocampus of aggressive animals as compared to non-aggressive animals. These data indicate the presence of interaction between the 5-HT7- and 5-HT1A-receptors. The increased expression of 5-HT7-receptors in the frontal cortex and a decrease in the level of mRNA of the 5-HT7-receptor gene in the hypothalamus of aggressive animals compared to non-aggressive is also noteworthy. Thus, the significant changes in expression of 5-HT7-receptors in the brain of rats selectively bred for the high level of fear-induced aggression were found for the first time. Genotype-dependent features of co-expression of 5-HT1A- and 5-HT7-receptors were found in the brain structures of the studied animals. Obtained data suggest that the interaction between 5-HT1A and 5-HT7 receptors may be one of the most important factors in the regulation of genetically-defined aggressive behavior.

Keywords: highly aggressive and low aggressive rats, quantitative RT-PCR, western-blot, serotonin, 5-HT1A-receptors, 5-HT7-receptor