

Ю.О. Федотова

## Комбинированное введение RJR-2403 с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола улучшает пространственное обучение у овариоэктомированных крыс

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, ул. Макарова, 6

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе эффектов комбинированного введения агониста или антагониста N $\alpha$ 7-холинорецепторов с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение в водном тесте Морриса и на поведении в тесте «открытое поле» у овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс. Агонист N $\alpha$ 7-холинорецепторов — RJR-2403 (1,0 мг/кг, внутривентрикулярно) и антагонист N $\alpha$ 7-холинорецепторов — мекамиламин (1,0 мг/кг, внутривентрикулярно) вводились (14 сут) изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола (0,5 мкг на животное, подкожно) ОЭ самкам. Установлено, что RJR-2403 в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола полностью восстанавливает воспроизведение динамики пространственного обучения у овариоэктомированных самок. При этом на фоне введения RJR-2403 в сочетании с 17 $\beta$ -эстрадиолом у ОЭ самок наблюдалось возрастание исследовательской активности и выраженности груминга в тесте «открытое поле». Мекамиламин, введенный изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола, существенно не влиял на характер пространственного обучения в тесте Морриса и поведения в тесте «открытое поле». Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте применения агониста N $\alpha$ 7-холинорецепторов в сочетании с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение у ОЭ самок крыс.

**Ключевые слова:** RJR-2403, мекамиламин, 17 $\beta$ -эстрадиол, пространственное обучение, тест Морриса, овариоэктомия

Yu.O. Fedotova

## Co-administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol on spatial learning in ovariectomized rats

I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6, Makarova str., St. Petersburg, 199034, Russia

The aim of this work was to study the influence of stimulation or blockade N $\alpha$ 7-cholinergic receptors on dynamics of spatial learning in water Morris maze and on behavior in the «open field» test in adult ovariectomized (OVX) females given with a low dose of 17 $\beta$ -estradiol. Agonist of N $\alpha$ 7-cholinergic receptors — RJR-2403 (1,0 mg/kg, i.p.) or antagonist of N $\alpha$ 7-cholinergic receptors — mecamylamine (1,0 mg/kg, i.p.) treated chronically (14 days) alone and in a combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol (0,5  $\mu$ /rat, s.c.) to OVX rats. Co-administration of RJR-2403 with low dose of 17 $\beta$ -estradiol completely restored impaired spatial learning in water Morris maze in OVX females. Moreover, OVX rats treated with RJR-2403 and low dose of 17 $\beta$ -estradiol demonstrated increased exploratory and grooming behavior in the «open field» test. Both mecamylamine alone and in combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol failed to influence on spatial learning and failed to modify behavior in the «open field» test in OVX rats. The results of the present study suggest a positive effect of RJR-2403 in combination with low dose of 17 $\beta$ -estradiol on spatial learning at estrogen deficiency.

**Key words:** N $\alpha$ 7-cholinergic receptors, RJR-2403, mecamylamine, 17 $\beta$ -estradiol, passive avoidance performance, ovariectomy

В последние годы была выявлена значительная роль центральных нейрональных N $\alpha$ 7-никотиновых холинорецепторов в модуляции процессов обучения и

памяти, а также нейропротекции [4, 8, 10, 13]. Установлено, что введение никотина или различных агонистов N $\alpha$ 7-холинорецепторов улучшает рабочую память и внимание в различных тестах у ряда лабораторных животных [11, 14, 15].

Клинические и экспериментальные исследования указывают на существование функциональной взаи-

Для корреспонденции: Федотова Юлия Олеговна, д-р биол. наук, лаб. нейроэндокринологии ФГБУН ИФ им. И.П.Павлова РАН. E-mail: julia.fedotova@mail.ru

мосвязи между холинергической и гипофизарно-оваривальной системами в реализации когнитивных функций мозга [1, 6]. Полагают, что нарушения, происходящие в холинергической системе при недостатке эстрогенов, в первую очередь, обуславливают развитие целого ряда нейродегенеративных и мнестических расстройств [6, 7, 11]. Показано, что у самок крыс количество и плотность нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в несколько раз выше по сравнению с самцами крыс [8, 9, 10]. Выявлено, что после овариэктомии заметно снижается уровень экспрессии нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в головном мозге [11, 12, 13]. Введение эстрогенов овариэктомированным (ОЭ) самкам крыс уже в течение первых нескольких дней заметно повышало количество и активность ацетилхолинтрансферазы, а также количество  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в гипоталамусе. Параллельно происходила выраженная регенерация холинергических нейронов [9, 10, 13].

В связи с этим, представляет интерес оценка вовлечения  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в реализацию процессов обучения и памяти при дисбалансе эстрогенов в организме. Следует отметить, что такие исследования носят единичный характер и весьма неоднозначны вследствие отсутствия детальной оценки действия как агонистов, так и антагонистов разных типов холинорецепторов на поведенческий статус самок с разным уровнем эстрогенов в организме.

*Цель исследования* — сравнительный анализ эффектов хронического введения агониста и антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола на процесс пространственного обучения самок крыс при дефиците эстрогенов.

### Методика

Работа выполнена на 140 белых крысах-самках Вистар в возрасте 3—4 мес., массой 200—220 г, полученных из питомника «Рапполово». Животные содержались в виварии при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режимов со свободным доступом к еде и воде. Исследования проводились в первой половине дня (9.00 — 12.00).

Для выполнения поведенческих тестов крыс случайным образом разделяли на несколько групп по 10 особей в каждой:

- 1-я группа — контрольные интактные самки, получавшие физиологический раствор (контроль);
- 2-я группа — контрольные ОЭ самки, получавшие физиологический раствор;
- 3-я группа — ОЭ самки, получавшие  $17\beta$ -эстрадиол (0,5 мкг на крысу, подкожно);

- 4-я группа — ОЭ самки, получавшие RJR-2403;

- 5-я группа — ОЭ самки, получавшие мекамиламин;

- 6-я группа — ОЭ самки, получавшие RJR-2403 в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом;

- 7-я группа — ОЭ самки, получавшие мекамиламин в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом.

Все фармакологические препараты были получены из компании Сигма (США). Агонист  $N7$ -холинорецепторов — RJR-2403 и антагонист  $N7$ -холинорецепторов — мекамиламин вводили в дозе 1,0 мг/кг, внутривенно,  $17\beta$ -эстрадиол вводился в дозе 0,5 мкг на животное, подкожно. Применяемые вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г.  $17\beta$ -Эстрадиол растворяли в стерильном подсолнечном масле и также вводили в объеме 0,1 мл на крысу массой 200 г. Выбор именно такой дозы  $17\beta$ -эстрадиола обусловлен тем, что экспериментальными исследованиями была установлена эффективность данной дозы  $17\beta$ -эстрадиола в мягкой коррекции эмоционального и гормонального статуса ОЭ самок [6]. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество растворителя. Введение веществ осуществляли в течение 14 сут. до начала поведенческого теста через 2 нед. после операции.

Удаление яичников проводили согласно общепринятой методике [2]. Эффективность действия экзогенно вводимого эстрадиола у ОЭ самок оценивали по влагалищным мазкам.

Для выявления способности животных к пространственной ориентации использовали водный тест Морриса [5]. В течение 7 сут. животных обучали поиску скрытой платформы. Местоположение платформы на площади бассейна ежедневно меняли. На 8-е сут. платформу помещали в центр бассейна. В день эксперимента животному предоставлялись две попытки — тренировочная и экспериментальная, интервал между которыми составлял 60 с. Положение платформы для обеих попыток было одинаковым. Контрольное время нахождения животного в бассейне — 3 мин для каждой попытки. Если животное не находило платформу за отведенный отрезок времени, оно помещалось на платформу экспериментатором, а величину латентного периода считали равной 180 с. В течение 3 мин регистрировали время обнаружения платформы в течение тренировочной и экспериментальной попыток.

Поведение животных оценивали в тесте «открытое поле» [4]. Регистрировали следующие параметры: двигательную горизонтальную активность («перемещение») и двигательную вертикальную активность («вставание»); исследовательскую активность

(исследование крысой круглых сквозных отверстий, расположенных на полу); груминговые реакции (вычесывание, вылизывание, умывание и др.); эмоциональные реакции (дефекация и уринация).

Все исследования проводили согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием дисперсионного анализа one-way ANOVA test с последующим Newman—Keuls post-hoc тестом с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Различия между значениями при  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

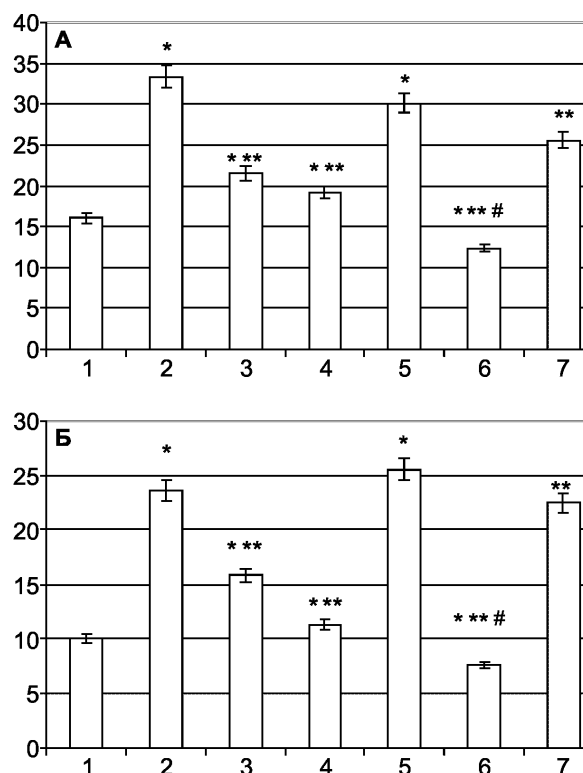
### Результаты и обсуждение

В водном тесте Морриса установлено (рисунок А, Б), что у ОЭ самок наблюдалось ухудшение процесса пространственного обучения по сравнению с группой контрольных интактных самок ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). Хроническое введение низкой дозы  $17\beta$ -эстрадиола ОЭ самкам в некоторой степени улучшало динамику пространственного обучения по сравнению с контрольными ОЭ самками ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). На фоне хронического введения RJR-2403 у ОЭ самок наблюдалось значительное улучшение показателей способности животных к выработке пространственного условного рефлекса. Так в данной группе крыс, при тестировании на 8-е сут. во время тренировочной и экспериментальной сессии, время поиска скрытой платформы было существенно ниже соответствующего показателя в контрольной группе ОЭ самок ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). В условиях комбинированного введения RJR-2403 и низкой дозы  $17\beta$ -эстрадиола проявлялось стимулирующее действие обоих веществ на процесс пространственного обучения. У ОЭ самок, получавших RJR-2403 в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом, латентный период поиска платформы был достоверно ниже данного показателя у ОЭ самок и ОЭ самок, получавших низкую дозу  $17\beta$ -эстрадиола ( $p < 0,05$ , рисунок А, Б). В то же время, введение мекамиламина изолированно или в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом самкам не меняло динамику пространственного обучения в водном тесте Морриса по сравнению с контрольными ОЭ самками.

В тесте «открытое поле» (таблица) было выявлено, что введение мекамиламина изолированно или в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом не меняло общий характер поведения ОЭ самок в тесте «открытое поле». На фоне введения RJR-2403 в сочетании с  $17\beta$ -эстрадиолом происходило увеличение выраженности груминга и исследовательской активности по сравнению с контрольными группами интактных и ОЭ

крыс, а также с группой ОЭ крыс, получавших  $17\beta$ -эстрадиол.

Анализ результатов показывает, что продолжительное введение агониста или антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола оказывает разнонаправленное действие на динамику пространственного обучения у ОЭ самок крыс. Так, сочетанное введение агониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов — RJR-2403 и  $17\beta$ -эстрадиола в низкой дозе оказывает антиамнестический эффект, т.е. нормализует процесс воспроизведения следа памяти в водном тесте Морриса у ОЭ крыс. При этом, наблюдается потенцирование позитивных



Влияние RJR-2403 и мекамиламина, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой  $17\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение в водном тесте Морриса (8-й день тестирования) у овариоэктомированных самок крыс.

А — тренировочная сессия; Б — экспериментальная сессия.

Ось X — группы животных; ось Y — латентный период поиска скрытой платформы, с

\* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от контрольных интактных самок; \*\* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от ОЭ самок; # —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от ОЭ самок, получавших низкую дозу  $17\beta$ -эстрадиола. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , количество животных в группах —  $N=10$ .

Группы животных: 1 — интактные самки, получавшие физиологический раствор; 2 — ОЭ самки; 3 — ОЭ самки, получавшие  $17\beta$ -эстрадиол; 4 — ОЭ самки, получавшие RJR-2403; 5 — ОЭ самки, получавшие мекамиламин; 6 — ОЭ самки, получавшие RJR-2403 в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом; 7 — ОЭ самки, получавшие мекамиламин в комбинации с  $17\beta$ -эстрадиолом

Влияние RJR-2403 и мекамиламина, введенных изолированно или в комбинации с низкой дозой 17 $\beta$ -эстрадиола, на поведение овариоэктомированных самок крыс в тесте «открытое поле»

Группы животных	Двигательная активность		Исследовательская активность	Эмоциональность	
	Перемещение	Вставание		Грумминг	Дефекация
Интактные самки	56,1 $\pm$ 2,8	13,1 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
Овариоэктомия (ОЭ)	62,4 $\pm$ 2,2	12,6 $\pm$ 2,0	3,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + 17 $\beta$ -Е2	63,2 $\pm$ 2,2	11,9 $\pm$ 2,2	3,3 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + RJR-2403	57,8 $\pm$ 2,4	12,4 $\pm$ 1,2	6,2 $\pm$ 0,4* ** #	4,9 $\pm$ 0,2* ** #	0,9 $\pm$ 0,2
ОЭ + мекамиламин	60,5 $\pm$ 2,2	10,6 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + RJR-2403 + 17 $\beta$ -эстрадиол	66,5 $\pm$ 3,0	12,0 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,8* ** #	6,8 $\pm$ 0,2* ** #	1,2 $\pm$ 0,2
ОЭ + мекамиламин + 17 $\beta$ -эстрадиол	62,9 $\pm$ 2,6	10,2 $\pm$ 1,4	2,4 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2

Примечание. \* —  $p < 0,05$ , достоверное отличие от контрольных интактных самок; \*\* —  $p < 0,05$ ; достоверное отличие от ОЭ самок; # —  $p < 0,05$ ; достоверное отличие от ОЭ самок, получавших низкую дозу 17 $\beta$ -эстрадиола. Данные представлены в виде  $M \pm m$ ; количество животных в группах —  $N=10$

эффектов RJR-2403 и 17 $\beta$ -эстрадиола на сохранение следа памяти у ОЭ самок. Выявленные изменения в поведенческих реакциях в тесте «открытое поле» у ОЭ самок, получавших RJR-2403 в комбинации с 17 $\beta$ -эстрадиолом, соответствуют наблюдаемому улучшению процесса пространственного обучения. Следует также отметить, что используемая доза RJR-2403 являлась так же, как и доза 17 $\beta$ -эстрадиола весьма низкой. Исходя из этого, можно предполагать, что корректирующее действие RJR-2403 реализуется именно через нейрональные  $N\alpha 7$ -холинорецепторы. Данные, полученные в тесте Морриса у ОЭ самок при комбинированном введении RJR-2403 и 17 $\beta$ -эстрадиола, позволяют говорить о триггерной роли низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола в коррекции процесса пространственного обучения. Кроме того, сочетанное введение нейротропного и гормонального препаратов в низких дозах приводит к полной нормализации нарушенных процессов обучения, в отличие от их изолированного введения. В то же время, введение антагониста  $N\alpha 7$ -холинорецепторов — мекамиламина отдельно или в комбинации с 17 $\beta$ -эстрадиолом не улучшало показатели пространственного обучения у ОЭ самок.

Согласно данным литературы, активация центральных нейрональных  $N\alpha 7$ -холинорецепторов улучшает рабочую память и внимание в различных тестах у ряда лабораторных животных [11, 13, 14, 15]. Однако количество этих холинорецепторов существенно снижается при дефиците эстрогенов, тогда как на фоне применения эстрадиола у ОЭ самок существенно повышается плотность и количество  $N\alpha 7$ -холинорецепторов в головном мозге [7, 8, 12]. Доказано, что существует оптимальный уровень активности центральных холинорецепторов для адекватного восприятия и оценки поступающей информации из внешнего

мира. При этом отклонение уровня активности центральных холинорецепторов от оптимального уровня значительно нарушает приобретение и последующее воспроизведение полученной информации [3].

Можно говорить о том, что стимуляция  $N\alpha 7$ -холинорецепторов, вызываемая введением RJR-2403 на фоне параллельного применения низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола, может приводить как к созданию необходимого уровня активности холинергической системы для осуществления нормального протекания условнорефлекторной деятельности. Учитывая эти сведения можно полагать, что целенаправленное совместное фармакологическое воздействие как на  $N\alpha 7$ -холинорецепторы, так и на эстрогеновые рецепторы приводит к восстановлению когнитивных процессов у ОЭ самок. Причем, по-видимому, это создает состояние сбалансированности протекания физиологических процессов как со стороны нейромедиаторной системы, так и со стороны гормональной системы.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте стимуляции  $N\alpha 7$ -холинорецепторов на фоне введения низкой дозы 17 $\beta$ -эстрадиола на пространственное обучение при дефиците эстрогенов.

### Список литературы

1. **Бабичев В.Н.** Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи физiol. наук. — 2005. — Т. 36. — С. 54-67.
2. **Кириенблат Я.Д.** Практикум по эндокринологии. — М.: Высшая школа, 1969. — 255 с.
3. **Кругликов Р.И.** Нейрохимические механизмы обучения и памяти. Физиология поведения: Нейрофизиологические закономерности. — М.: Наука, 1986. — С. 633-698.

4. **Петров Е.С., Лазаренко Н.С., Куцевич С.В.** Влияние ограничения индивидуального опыта в раннем онтогенезе на вероятностные характеристики поведения крыс в «открытом поле» // Журн. высш. нервн. деят. — 1982. — Т. 32. — С. 347-356.
5. **Пономарев Д.Б., Виноградова Е.П.** Сравнительный анализ способности к обучению в водном тесте Морриса у крыс, различающихся по скорости выработки условного рефлекса активного избегания // Журн. высш. нервн. деят. — 2000. — Т. 50. — С. 974-981.
6. **Сапронов Н.С., Федотова Ю.О.** Гормоны гипоталамо-гипофизарно-овариальной системы и мозг. — СПб.: Формиздат, 2009. — 592 с.
7. **Centeno M.L., Henderson J.A., Francis Pau K.Y.** et al. Estradiol increases  $\alpha 7$  nicotinic receptor in serotonergic dorsal raphe and noradrenergic locus coeruleus neurons of macaques // J. Comp. Neurol. — 2006. — Vol. 497. — P. 489-501.
8. **Cordero-Erausquin M., Marubio L.M., Klink R.** et al. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice // Trends Pharmacol. Sci. — 2000. — Vol. 21. — P. 211-217.
9. **Gibbs R.B., Aggarwal P.** Estrogen and basal forebrain cholinergic neurons: implications for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline // Horm. Behav. — 1998. — Vol. 34. — P. 98-111.
10. **Koylu E., Demirgoren S., London E.D.** et al. Sex difference in up-regulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain // Life Sci. — 1997. — Vol. 61 — P. 185-190.
11. **Levin E.D.** Nicotinic receptor subtypes and cognitive function // J. Neurobiol. — 2002. — Vol. 53. — P. 633-640.
12. **Miller M.M., Silver J., Billiar R.B.** Effects of gonadal steroids on the in vivo binding of [ $^{125}$ I]alphabungarotoxin to the suprachiasmatic nucleus. — 1984. — Vol. 290. — P. 67-75.
13. **Ping S.E., Trieu J., Wlodek M.E.** et al. Effects of estrogen on basal forebrain cholinergic neurons and spatial learning // J. Neurosci. Res. — 2008. — Vol. 86. — P. 1588-1598.
14. **Potter A.S., Newhouse P.A.** Effects of acute nicotine administration on behavioral inhibition in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder // Psychopharmacol. (Berl.). — 2004. — Vol. 176. — P. 182-194.
15. **Potter A.S., Newhouse P.A.** Acute nicotine improves cognitive deficits in young adults with attention deficit/hyperactivity disorder // Pharmacol. Biochem. Behav. — 2008. — Vol. 88. — P. 407-417.

Поступила 12.12.12