

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ МОЗГА ДО И ПОСЛЕ СТРЕССА У КРЫС С ГЕНОТИПОМ A1/A1 ПО ЛОКУСУ TAQ1A D₂ РЕЦЕПТОРА

Леушкина Н.Ф., Федорова А.М., Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В.
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет Минобрнауки РФ»,
Уфа, e-mail: mpha@ufanet.ru

Проведен анализ поведенческих ориентировочно-исследовательских реакций и содержания катехоламинов в миндалевидном комплексе мозга до и после воздействия стрессора. Объектом исследования были крысы с генотипом A1/A1 по локусу Taq 1A гена D2-рецептора, прошедшие селекцию на предпочтение алкоголя. В качестве стрессора использовали пятикратную ежедневную аудиогенную стимуляцию. Исследование поведения крыс до стресса показало, что оно характеризуется большой двигательной активностью и выраженной исследовательской деятельностью. После стресса общая двигательная активность и исследовательская деятельность снижаются, но при этом возрастают в центральной и периферической зонах «открытого поля», что авторы трактуют как проявление активного поискового поведения. После действия стрессорных нагрузок содержание дофамина в миндалевидном комплексе снижается на 33%. В отличие от дофамина в ответ на стресс содержание норадреналина увеличивается на 17%.

Ключевые слова: предрасположенность к алкоголизму, стресс, миндалевидный комплекс, катехоламины

ANALYSIS OF THE BEHAVIOR AND CONTENT OF CATECHOLAMINES IN THE BRAIN BEFORE AND AFTER STRESS IN RATS WITH GENOTYPE A1/A1 ON THE LOCUS TAQ1A D2 RECEPTOR

Leushkina N.F., Fedorova A.M., Kalimullina L.B., Akhmadeev A.V.
Bashkir State University, Ufa, e-mail: mpha@ufanet.ru

Authors made the analysis of behavioral orientation-research reactions and content of catecholamines in the Amygdala before and after exposure to the stressor. The object of the study were rats with genotype A1/A1 on the locus Taq 1A gene D2 receptor, after breeding on the preference of alcohol. As a stressor used five times daily audiogenic stimulation. Investigation of the behavior of rats before stress showed that it is characterized by a large motor activity and expressed research activities. After the stress total physical activity and research activity decrease, but increases the activity of the central and peripheral areas of the «open field», which the authors interpret as a manifestation of active search behavior. After the action of stress loads the content of dopamine in the Amygdala is reduced. The decrease in the content of dopamine is 33%. Unlike dopamine, in response to stress the content of norepinephrine increases by 17%.

Keywords: predisposition to alcoholism, stress, Amygdala, catecholamines

Известно, что в проявлении предрасположенности к психоактивным веществам (ПАВ) и в рецидивах алкоголизма большую роль играет стресс [7], однако биологические механизмы влияния стресса на манифестацию алкоголизма изучены недостаточно, а результаты выполненных работ противоречивы.

Согласно имеющимся в литературе данным, наибольшее значение в механизмах развития зависимости от ПАВ имеет дофаминовый рецептор второго типа (DRD2, [6] и др.). Одним из интенсивно изучаемых локусов DRD2 является локус Taq 1A. Показано, что аллельная структура этого локуса играет роль в развитии многих психоневрологических заболеваний, включая и алкогольную зависимость [10, 11].

Первое экспериментальное подтверждение роли полиморфизма локуса Taq 1A DRD2 в развитии алкогольной зависимости получено на молекулярно-генетических моделях – крысах, имеющих различия в аллельной структуре указанного локуса,

которые были выявлены после генетического анализа и к моменту эксперимента прошли 20 поколений [2]. Крысы с генотипом A₁/A₁ по локусу Taq 1A DRD2, показавшие ускоренные темпы формирования толерантности и психической зависимости по сравнению с крысами с генотипом A₂/A₂ в эксперименте с принудительной алкоголизацией, являются валидной моделью для исследования факторов, определяющих предрасположенность к ПАВ.

Целью работы являлся сравнительный анализ поведения предпочитающих (ПА) алкоголь крыс и содержания норадреналина (НА), дофамина (ДФ) и его метаболита 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДО-ФУК) в центре афферентного синтеза – миндалевидном комплексе мозга (МК) до и после действия стресса.

Материал и методы исследования

Использованные в работе предпочитающие алкоголь (ПА) крысы получены из популяции крыс линии WAG/Rij после генотипирования локуса Taq 1A

DRD2, скрещивания гомозиготных животных и выявления в последующем предпочтения алкоголя в тесте двух поилок. Среди крыс, имевших генотип A1/A1, для получения потомства (которое использовано для проведения данной работы) были отобраны особи (самки и самцы), имевшие высокие темпы нарастания количеств потребляемого спирта при принудительной алкоголизации в течение двух недель и с установкой двух поилок на третьей неделе эксперимента предпочитавшие пить спирт. В настоящем исследовании использовано четвертое поколение ПА крыс.

Поведение ПА крыс (всего 10 крыс в возрасте шести месяцев обоего пола) изучено с использованием теста «открытое поле». Круглое ОП представляло собой арену 1,5 м в диаметре с высотой стенок 0,8 м, дно которой имело деления на сектора. В открытом поле было очерчено 3 зоны: центральная, промежуточная (6 сегментов) и периферическая (12 сегментов). Освещение производилось 2 лампами, мощностью по 60 Вт, которые располагались на высоте 1,5 м от дна камеры над центральными сегментами поля.

Эксперимент, направленный на выяснение действия стрессорных нагрузок, проводился в три этапа:

1 этап – тестирование поведения животных в течение 5 дней;

2 этап – пятикратное в течение пяти дней воздействие стрессора;

3 этап – повторное тестирование поведенческих реакций животных в течение 5 дней.

В качестве стрессора использовали пятикратную ежедневную аудиогенную стимуляцию, которая проводилась в специальной камере (60×60×60 см) по методике Кузнецовой [3], используя «звон ключей» («keys ringing»). Звуковой сигнал имел диапазон 13–85 kHz (максимум спектра 20–40 kHz) и среднюю интенсивность 50–60 dB с величиной пиков до 80–90 dB. Он предъявлялся в течение 1,5 минут. Наш выбор в каче-

стве стрессорного воздействия аудиогенной стимуляции объясняется двумя обстоятельствами. Во-первых, известно, что крысы, как и другие грызуны, обладают генетически детерминированной повышенной чувствительностью к звуку, следовательно, чрезмерное его действие на организм способно сформировать выраженную стрессорную реакцию. Во-вторых, использование других стрессоров (иммобилизация, плавательный тест и др.), указание на которые содержится в работах различных авторов, упомянутых выше, приводило к противоречивым результатам исследований.

Содержание биогенных аминов и их метаболитов в МК (по 20 крыс до и после стресса, самцы и самки) определяли на ВЭЖХ (Аквион, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 M). Область МК выделяли из нативного мозга и гомогенизировали в 20 объемах холодной 0,1M перхлорной кислоты (Sigma, USA) и 1 мкг/50 мкл дигидроксибензиламина гидробромида (Sigma, USA) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенизат центрифугировали (при -20°C) в течение десяти минут при 6000 оборотов в минуту. Супернатант подвергали микрофилтрации с помощью специальных наборов фирмы «Биохром» (Россия). После повторного центрифугирования пробы анализировали на содержание моноаминов (норадреналина, дофамина) и метаболита дофамина – 3,4-диоксифенилукусусной кислоты (ДОФУК). Полученные результаты систематизировали и подвергали статистической обработке с помощью пакета программ «Statistica 6».

Результаты исследований и их обсуждение

Данные, характеризующие поведение крыс до и после стресса, представлены в таблице.

Показатели поведения предпочитающих алкоголь (ПА) крыс в открытом поле (M ± m) до и после стресса

Двигательная активность (количество пересеченных секторов)							
Центральная зона		Промежуточная зона		Периферическая зона		Суммарно по всем зонам	
До	После	До	После	До	После	До	После
9,75 ± 1,06	12,57 ± 1,80	45,57 ± 7,68	56,94 ± 8,24	163,77 ± 19,91	170,34 ± 9,48	219,09 ± 27,66	236,88 ± 16,24
<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05	
Исследовательская деятельность (количество стоек)							
2,77 ± 0,47	3,77 ± 1,08	5,57 ± 1,21	9,31 ± 2,98	38,62 ± 7,27	32,00 ± 6,62	45,17 ± 7,28	41,88 ± 8,85
<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05	
Длительность груминга (с)							
0,28 ± 0,12	0,31 ± 0,14	0,42 ± 0,23	0,480,32	70,91 ± 17,11	66,3513,24	71,48 ± 17,28	67,1413,34
<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05		<i>p</i> > 0,05	

Они демонстрируют, что общая двигательная активность крыс после воздействия стрессора увеличивается, однако выявленные различия не являются значимыми. Анализ посещений крысами различных секторов «открытого поля» показывает, что крысы до стресса преимущественно перемещаются по периферии поля, где количество амбуляций почти в три раза больше, чем их суммарное количество в централь-

ном и периферическом секторах. После стресса общий рисунок передвижений крыс в открытом поле сохраняется, они продолжают проявлять большую двигательную активность по его периферии. Однако проявляются и определенные особенности: если до стресса процент посещений центральной и промежуточной зон поля составлял 21% от общей двигательной активности, то после стресса он возрастает до 29%. Это

ставит вопрос – с чем связано это явление? Является ли оно проявлением «бесстрашия» или это так проявляется повышенная тревожность? Этот вопрос может быть решен при дополнительном исследовании поведения крыс в установке «приподнятый крестообразный лабиринт».

Анализ сдвигов со стороны исследовательской деятельности позволил получить данные, которые отражены в таблице. Они показывают, что количество стоек, совершаемых крысами в центральной и промежуточной зонах, возрастает, хотя выявленные различия и не являются статистически значимыми. В периферической зоне количество стоек уменьшается, а также снижается общая исследовательская деятельность. Хотя отмеченные изменения не являются статистически значимыми, они представляют определенный интерес, показывая, что посещаемость центральной и промежуточной зоны поля у этих крыс повышается. До стресса процент совершаемых стоек в центральной и промежуточной зоне поля составляет всего 12%, а после стресса он возрастает до 31%, т.е. увеличивается более чем вдвое.

Таким образом, после воздействия стрессора двигательная активность и исследовательская деятельность в центральной и промежуточной зонах «открытого поля» изменяются однонаправлено, т.е. возрастают. При этом при регистрации исследовательской активности этот сдвиг является более выраженным. Стремление исследовать новые пространства у мышей и крыс расценивается как признак расторможенности (дезингибиции), и это в целом может быть интерпретировано, как усиление поискового поведения [12].

Анализ длительности груминга (чесательный рефлекс) и количества его эпизодов показал, что более информативными являются величины, отражающие его длительность, которые приведены в таблице. Они выявляют общую тенденцию формируемых сдвигов, а именно она (длительность) снижается более выражено в периферической зоне. При этом в центральной и промежуточной зонах имеет место увеличение времени, которое животные затрачивают на его проведение.

После действия стрессорных нагрузок содержание дофамина в МК снижается на 33%. В отличие от дофамина в ответ на стресс содержание норадреналина увеличивается на 17%.

Полученные результаты можно суммировать следующим образом:

1. Исследование ориентировочно-исследовательского поведения крыс до

стресса (на стадии предрасположенности) показало, что оно характеризуется большой двигательной активностью и выраженной исследовательской деятельностью.

2. После акустического стресса у крыс двигательная активность и исследовательская деятельность снижаются. При сохранении предпочтения периферической зоны «открытого поля» двигательная активность и особенно исследовательская деятельность возрастают в центральной и периферической зонах «открытого поля», что следует трактовать как проявление активного поискового поведения.

3. После акустического стресса содержание дофамина в МК снижается, а норадреналина возрастает.

Миндалевидный комплекс мозга (МК) вовлечён в центральные механизмы регуляции широкого круга физиологических процессов, начиная от деятельности отдельных органов и систем до целостных поведенческих актов, определяющих адаптацию организмов [1], а, следовательно, активно включающийся в реализацию стресс-реакций.

Обнаруженное нами повышенное содержание норадреналина, дофамина и ускоренный метаболизм последнего в МК у крыс с генотипом A1A1 [4] объясняет особенности их поведения, выявленные у «наивных» крыс, т.е. до стресса. Это находит подтверждение в высказываниях ведущих физиологов о том, что «дофамин и норадреналин причастны к активному типу поведения» [5].

Главным фактором, определяющим повышение содержания дофамина у ПА крыс, является то, что они имеют генотип A1A1 по локусу Taq 1A DRD2. Исследованиями по молекулярной генетике показано, что аллель A1 этого локуса находится в неравновесии по сцеплению ($D' = 0,855$) с минорными аллелями (T) двух фланкирующих 6 экзон интронных локусов (rs 2283265 и rs 1076560) этого гена, снижающими экспрессию короткой изоформы (DRD2S). Приведенные данные [15] подтверждены и другими авторами, показавшими наличие неравновесия по сцеплению между локусами rs1800497 and rs2283265 ($D' = 0,78$). Так как DRD2 у крысы на 95% гомологичен с этим геном человека [9], можно полагать, что выявленная закономерность имеет место и у крыс. Известно, что снижение экспрессии короткой изоформы DRD2 и изменение в силу этого соотношения длинной и короткой изоформ приводит к повышению содержания внеклеточного дофамина [8,14].

Список литературы

1. Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. – М.: Наука, 1993. – 272 с.

2. Ахмадеев А.В. Экспериментальные подходы к исследованию роли генотипа по локусу Taq 1A дофаминового D2 рецептора в наркотической зависимости // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 5. – С. 513–520.

3. Кузнецова Г.Д. Аудиогенные припадки у крыс различных линий // Журнал ВНД. – 1998. – Т.48, № 1. – С. 143–152.

4. Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Полиморфизм гена D2-рецептора и катехоламины в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения крыс // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 9. – С. 8–10.

5. Шаляпина В.Г. Кортиколиберин в регуляции приспособительного поведения и патогенезе постстрессорной психопатологии. Основы нейроэндокринологии. – СПб.: Элби-СПб, 2005. – С. 84–146.

6. Addiction-related alterations in D1 and D2 dopamine receptor behavioral responses following chronic cocaine self-administration / S. Edwards, K.N. Whisler, D.C. Fuller [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2007. – Vol. 32, № 2. – P. 354–66.

7. Breese G.R, Overstreet D.H, Knapp D.J. Conceptual framework for the etiology of alcoholism: a «kindling»/stress hypothesis // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2005. – Vol. 178. – P. 367–380.

8. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia / A. Bertolino, L. Fazio, G. Caforio [et al.] // *Brain*. 2009/ – Vol.132, № 2. – P. 417–425.

9. Jonathan M., Sagvolden T. Sequence analysis of DRD2, DRD4, and DAT in SHR and WKY rat strains // *Behav and Brain Function*. – 2005. – Vol.1, № 24. – P. 112–117.

10. Munafo M.R., Matheson I.J., Flint J. Association of the DRD2 gene Tag1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias // *Mol Psychiatry*. – 2007. – Vol.12, N 5. – P. 454–461.

11. Noble E.P. The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. // *Alcohol*. – 1998. – Vol.16, № 1. – P. 33–45.

12. Natalie M. Zahr, Edith V., Sullivan D. Translational Studies of Alcoholism // *Alcohol Res Health*. – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 215–230.

13. Noble E.P. The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes // *Alcohol*. – 1998. – Vol. 16, № 1. – P. 33–45.

14. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors / A. Usiello, J.H. Baik, F. Roug-Pont // *Nature*. – 2000. – Vol. 408, № 6809. – P. 199–203.

15. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory / Y. Zhang, A. Bertolino, [et al.] // *Journal List Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – Vol. 104, № 51. – P. 349–378.

References

1. Akmaev I.G., Kalimullina L.B. Mindalevidnyj kompleks mozga: funkcional'naja morfologija i nejroendokrinologija. M.: Nauka, 1993. 272 p.

2. Ahmadeev A.V. Jeksperimentalnye podhody k issledovaniju roli genotipa po lokusu Taq 1A dofaminovogo D2 receptora v narkoticheskoj zavisimosti // *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2010. T. 96, no, 5. pp. 513–520.

3. Kuznecova G.D. Audiogennye pripadki u krys razlichnyh linij // *Zhurnal VND*. 1998. T.48, no. 1. pp. 143–152.

4. Leushkina N.F., Ahmadeev A.V., Kalimullina L.B. Polimorfizm gena D2-receptora i kateholaminy v reguljacii orientirovochno-issledovatel'skogo povedenija krys // *Uspehi sovremennogo estestvoznanija*. 2011. no. 9. pp. 8–10.

5. Shaljapina V.G. Kortikoliberin v reguljacii prisposobitel'nogo povedenija i patogeneze poststressornoj psihopatologii. Osnovy nejroendokrinologii. SPb.: Jelbi-SPb, 2005. pp. 84–146.

6. Addiction-related alterations in D1 and D2 dopamine receptor behavioral responses following chronic cocaine self-administration / S. Edwards, K.N. Whisler, D.C. Fuller [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. 2007. Vol. 32, no. 2. pp. 354–66.

7. Breese G.R, Overstreet D.H, Knapp D.J. Conceptual framework for the etiology of alcoholism: a «kindling»/stress hypothesis // *Psychopharmacology (Berl)*. 2005. Vol. 178. pp. 367–380.

8. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia / A. Bertolino, L. Fazio, G. Caforio [et al.] // *Brain*. 2009/ Vol. 132, no. 2. pp. 417–425.

9. Jonathan M., Sagvolden T. Sequence analysis of DRD2, DRD4, and DAT in SHR and WKY rat strains // *Behav and Brain Function*. 2005. Vol.1, no. 24. pp. 112–117.

10. Munafo M.R., Matheson I.J., Flint J. Association of the DRD2 gene Tag1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias // *Mol Psychiatry*. 2007. Vol.12, no. 5. pp. 454–461.

11. Noble E.P. The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes // *Alcohol*. 1998. Vol.16, no. 1. pp. 33–45.

12. Natalie M. Zahr, Edith V., Sullivan D. Translational Studies of Alcoholism // *Alcohol Res Health*. 2008. Vol. 31, no. 3. pp. 215–230.

13. Noble E.P. The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes // *Alcohol*. 1998. Vol. 16, no. 1. pp. 33–45.

14. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors / A. Usiello, J.H. Baik, F. Roug-Pont // *Nature*. 2000. Vol. 408, no. 6809. pp. 199–203.

15. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory / Y. Zhang, A. Bertolino, [et al.] // *Journal List Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, no. 51. pp. 349–378.

Рецензенты:

Каюмов Ф.А., д.м.н., профессор кафедры гистологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа;

Ямалеева А.А., д.б.н., профессор кафедры биохимии, Башкирский государственный университет, г. Уфа.

Работа поступила в редакцию 11.07.2013.