

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

НЕЙРОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫС, ИМЕЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ ГЕНОТИПА ПО ЛОКУСУ TAQ 1A DRD₂

Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В.

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

Целью работы явилось выявление особенностей поведения крыс линии WAG/Rij с генотипами A₁/A₁ и A₂/A₂ по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD₂) и предопределяющих их факторов путем анализа морфофункциональных характеристик миндалевидного комплекса мозга. Исследованы поведение в установке «открытое поле», цитоархитектоника, морфометрические показатели и содержание дофамина в миндалевидном комплексе мозга. Показано, что крысы с генотипом A₁/A₁ демонстрируют активную, а крысы с генотипом A₂/A₂ – пассивную стратегию поведения. У крыс с генотипом A₂/A₂ существуют высоко значимое увеличение удельной площади базолатеральной группировки структур МК и большая относительная масса головного мозга. В миндалевидном комплексе крыс с генотипом A₁/A₁ содержится больше дофамина по сравнению с крысами, имеющими генотип A₂/A₂.

Ключевые слова: миндалевидный комплекс мозга, поведение, изоформы дофаминового рецептора второго типа, дофамин

NEUROPHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF RATS WITH DIFFERENCES IN GENOTYPE ON THE LOCUS TAQ 1A DRD₂

Leushkina N.F., Akhmadeev A.V.

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

The aim of the study was identification of peculiarities in behavior of WAG/Rij rats with genotypes A1/A1 and A2/A2 on the locus TAQ 1A of dopamine receptor D2 gene (DRD₂) and predetermine its factors by performing the analysis of morpho-functional characteristics of Amygdala. During the research were investigated the behavior of rats in “open field” test, cytoarchitectonics and morphometrics parameters, content of dopamine in Amygdala. Shown that rats with genotype A1/A1 demonstrate active behavior strategy, while rats with genotype A2/A2 – passive. Rats with genotype A2/A2 have a highly significant increase of specific area of basolateral group of structures of Amygdala and major index of the relative weight of brain. In Amygdala of rats with genotype A1/A1 contains more dopamine in compare with rats with genotype A2/A2.

Keywords: Amygdala, behavior, dopamine, isoforms of dopamine receptor D2

Дофаминергическая система вовлечена в патогенез многих психоневрологических заболеваний (эпилепсия, шизофрения, депрессия, наркомания и др.). При этом показано, что в формируемых при этих заболеваниях дисфункциях дофаминергической системы ведущую роль играют нарушения функционирования дофаминовых рецепторов второго типа (D2) [7].

Известны две изоформы этого рецептора (длинная – D2L и короткая – D2S) [9]. Исследованиями по молекулярной генетике человека показано, что экспрессия D2S снижена у носителей генотипа A₁A₁ локуса Taq 1 A DRD₂ [15]. Так как DRD₂ у крысы на 95% гомологичен с этим геном человека (10), можно полагать, что выявленная закономерность имеет место и у крыс. Известно, что снижение экспрессии D2S и изменение в силу этого соотношения длинной и короткой изоформ приводит к повышению синтеза и выделения дофамина (ДА), что предопределяет повышение его содержания в тканях мозга [6, 12].

Целью работы явилось выявление особенностей поведения у крыс линии WAG/Rij с генотипами A₁/A₁ и A₂/A₂ по локусу Taq

1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD₂) и предопределяющих их факторов путем анализа морфофункциональных характеристик миндалевидного комплекса мозга (МК).

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на двух группах половозрелых гомозиготных крыс линии WAG/Rij с генотипами A₁/A₁ и A₂/A₂ по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа с массой тела 250–320 г. Две субпопуляции крыс линии WAG/Rij впервые получены на кафедре МФЧЖ БашГУ путем скрещивания гомозиготных особей, выявленных генетическим анализом указанного локуса в исходной популяции этих крыс [3]. Генетический анализ полиморфного локуса Taq 1 A DRD₂ у крыс линии WAG/Rij был выполнен под руководством заведующего отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН профессора Э.К. Хуснутдиновой.

Всех использованных в работе половозрелых крыс содержали в стандартных условиях вивария, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20–22 °С) и уровнем влажности. Пищу и питьё животные получали *ad libitum*, продолжительность светового дня составляла 12–14 часов. Все процедуры с животными выполняли с соблюдением международных правил и норм (European Communities Council Directives, 1986).

Ориентировочно-исследовательское поведение крыс в условиях новизны обстановки изучали в установке «открытое поле». Оно представляло собой квадратную освещенную в центре арену (лампой 40 Вт) площадью 100 см², разделенную на 16 равных частей. Регистрировали показатели горизонтальной и вертикальной активности, определяли количество эпизодов и время, затрачиваемое крысой на груминг (чесательный рефлекс), пребывание в состоянии неподвижности и латентный период до пересечения первого квадрата (амбуляции). Вегетативные реакции крыс регистрировали на основании учета числа уриаций и болюсов.

Цитоархитектонические и морфометрические характеристики структур МК изучены на фронтальных срезах мозга толщиной 20 мкм, которые окрашивали по методу Ниссля. Для определения относительной массы мозга использованы данные, полученные при измерениях массы тела и мозга 224 крыс [112 крыс (равное количество самцов и самок) в каждой группе]. **Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии** определяли содержание дофамина в МК и его группировках у двух изучаемых групп крыс линии WAG/Rij, имеющих разные генотипы. Материал для исследования брали от 3–4 крыс, умерщвленных передозировкой эфирного наркоза. После декапитации извлекали из черепа головной мозг и с помощью специальных устройств из нативного мозга на льду выделяли МК [1] и отдельно кортикотомедиальную и базолатеральную группировки [2]. Образцы, взятые из правого и левого полушария головного мозга крыс, использовали для приготовления супернатантов, которые анализировали на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 М).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Сравнение вариационных рядов осуществляли с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия U-критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Они показали, что популяция крыс (самцы + самки) с генотипом A_1/A_1 *DRD2* характеризуется большей двигательной активностью ($p < 0,001$), более интенсивной исследовательской деятельностью ($p < 0,001$), большим количеством эпизодов и длительностью груминга ($p < 0,001$, $p < 0,01$ соответственно), меньшей выраженностью иммобилизации ($p < 0,01$) и незначительным числом уриаций ($p < 0,01$) по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2 .

Эти данные свидетельствуют, что между двумя группами крыс существуют значимые различия по всем изученным параметрам, регистрируемым в установке «открытое поле». Крысы с генотипом A_1/A_1 *DRD2*, активно перемещающиеся и интенсивно исследующие новую среду, демонстрируют активную, а крысы с генотипом A_2/A_2 *DRD2* – пассивную стратегию поведения.

Поскольку дофамин рассматривается как первичное звено поведенческой активности [13], т.к. служит важнейшим медиатором в структурах мозга, участвующих в организации ориентировочно-исследовательского поведения, среди которых ведущее место занимает миндалевидный комплекс (МК) – было решено определить, каково содержание ДА в МК у двух популяций изучаемых нами крыс. Его результаты показали, что в МК крыс с генотипом A_1/A_1 содержится практически вдвое больше (на 75%, $p < 0,05$) ДА по сравнению с крысами, имеющими генотип A_2/A_2 . Это подтвердило мнение нейрофизиологов о том, что ДА причастен к активному типу поведения [4].

Выяснено, что D2S локализуется пресинаптически и представляет собой ауторецептор, в то время как длинная изоформа (D2L) преимущественно располагается на постсинаптическом компоненте [8, 12]. Активация D2S нарушает синтез и выделение ДА, ограничивая эти процессы, и приводит к снижению двигательной активности, в то время как активация D2L повышает локомоторную активность [5].

Приведенные сведения объясняют особенности поведения крыс с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 . У крыс с генотипом A_1/A_1 снижение экспрессии D2S ведет к повышению синтеза и выделения ДА из пресинаптической терминали дофаминергического синапса, проявлением чего является гиперактивность. У крыс с генотипом A_2/A_2 , исходя из выявленных нами особенностей поведения, можно предполагать изменение экспрессии D2L в пользу D2S, что и является основой их гиподинамии и сниженного содержания дофамина. Высказанное предположение подтверждается результатами работы Wang et al. [14], которые исследовали поведение D2L-/- мышей. Авторы показали, что D2L-/- мыши (у которых сохранялась экспрессия только D2S, и она была повышена) по сравнению с контролем демонстрировали в установке «открытое поле» снижение двигательной активности и исследовательской деятельности.

Полученные результаты выявили ассоциацию генотипа A_1/A_1 по локусу Taq 1 A *DRD2* с гиперактивностью в «открытом поле» и с повышенным содержанием ДА в мозге экспериментальных животных, в то время как генотип A_2/A_2 по этому локусу проявлял себя противоположными характеристиками – меньшей двигательной активностью и менее интенсивной исследовательской деятельностью.

Выявившиеся различия в поведении двух групп крыс линии WAG/Rij указали на необходимость анализа структурно-количе-

ственных характеристик МК как ведущего центра мозга в организации поведенческих реакций животных.

Исследование общей структурной организации заднего отдела МК позволило установить, что его конструкция у них тождественна. Проведенный цитоархитектонический анализ заднего отдела у крыс линии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 и сравнение полученных данных с крысами линии Вистар показал, что по общей структурной организации отклонений у крыс с разными генотипами по локусу Таq 1 A *DRD2* между собой и с крысами линии Вистар не существует. В составе заднего отдела есть все ядерные центры, формации палеокортекса, а также присутствует межзубчатая формация – заднее кортикальное ядро.

Для получения более точных сведений мы провели структурно-количественный анализ. Он показал, что удельная площадь МК не различается у крыс линии

WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 по локусу Таq 1 A *DRD2*. Сравнение удельных площадей двух основных группировок структур МК – кортикомедиальной и базолатеральной – у крыс с разными генотипами обнаружило, что существуют высоко значимые различия по величине удельной площади базолатеральной группировки. Удельная площадь базолатеральной группировки значимо больше у крыс с генотипом A_2/A_2 ($p < 0,001$) по сравнению с крысами с генотипом A_1/A_1 .

Не связана ли большая площадь базолатеральной группировки у крыс с генотипом A_2/A_2 с большей массой мозга? Для ответа на этот вопрос мы провели сравнительный анализ величин массы тела и головного мозга, а также рассчитали относительную массу мозга (ОММ – масса мозга в мг разделена на массу тела, г) у двух изучаемых нами групп крыс с разными генотипами (таблица).

Удельная площадь МК, группировок ее структур и показатели массы тела, головного мозга и относительной массы мозга (ОММ) у крыс с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 (M + m, проценты)

Генотип	A_1/A_1			A_2/A_2		
МК	20,47 ± 0,85			19,86 ± 0,51		
Отделы МК	кортико-медиальный	базолатеральный		кортико-медиальный	базолатеральный	
	15,85 ± 1,83	18,81 ± 0,81	16,32 ± 1,87	21,98 ± 0,48***		
Показатели	Масса тела (г)		Масса мозга (мг)		ОММ	
Генотип	A_1/A_1	A_2/A_2	A_1/A_1	A_2/A_2	A_1/A_1	A_2/A_2
Общая популяция	286,20 ± 3,05	262,56 ± 4,93	1787,39 ± 17,14	1905,70 ± 14,46	6,28 ± 0,05	7,50 ± 0,13
T, p	5,04, p < 0,001		6,03, p < 0,001		9,07, p > 0,001	

Примечание: ***p < 0,001 при сравнении базолатеральной группировки у крыс с разными генотипами.

Анализ величин массы тела, головного мозга и относительной массы мозга (ОММ – масса мозга в мг разделена на массу тела, г) у двух изучаемых нами групп крыс показал, что масса тела крыс с генотипом A_1/A_1 значимо больше ($p < 0,001$), в то время как масса головного мозга и ОММ больше у крыс с генотипом A_2/A_2 ($p < 0,001$). Таким образом, крысы с генотипом A_2/A_2 имеют большую массу мозга и ОММ, что коррелирует с наличием большей площади базолатеральной группировки МК.

Выводы

1) анализ ориентировочно-исследовательского поведения двух групп крыс ли-

нии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 по локусу Таq 1 A *DRD2* выявил ассоциацию генотипа A_1/A_1 с активной, генотипа A_2/A_2 – пассивной стратегией поведения;

2) результаты морфометрического анализа МК показали, что его площадь не различается у крыс линии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 , но у крыс с генотипом A_2/A_2 существуют высоко значимое увеличение удельной площади базолатеральной группировки структур МК и большая относительная масса головного мозга;

3) хроматографический анализ ткани МК и его группировок показал, что в МК крыс с генотипом A_1/A_1 содержится больше дофамина по сравнению с крысами, имеющими генотип A_2/A_2 .

Работа выполнена при финансовой поддержке базовой части Госзадания Минобрнауки РФ, тема № 301-14.

Список литературы

1. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. «Способ приготовления переживающих срезов пириформной доли мозга» // Патент РФ № 2438193. 2011. Бул.45.
2. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Способ дифференцированного извлечения ростральных и каудальных частей миндалевидного комплекса мозга и устройство для его осуществления // Патент РФ № 2487673. 2013. Бул.56.
3. Калимуллина Л., Ахмадеев А., Бикбаев А.Ф., Хуснутдинова Э., Чепурнов С., Чепурнова Н. // Медицинская генетика. – 2005. – № 5. – С. 198–199.
4. Шаляпина В.Г. Основы нейроэндокринологии. – СПб.: Элби, 2005. – 156 с.
5. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // Pharmacol. – 2011. – Vol. 63. – P. 182–217.
6. Bertolino A., Fazio L., Caforio G., Blasi G., Rampino A., Romano R., Giorgio A., Taurisano P., Papp A., Pinsonneault J., Wang D., Nardini M., Popolizio T., Sadee W. // Brain. – 2009. – Vol. 132. № 2. – P. 417–425.
7. Birioukova L.M., Midzyanovskaya I.S., Lensu S., Tuomisto L., van Luijtelaar E.L. // Epilepsy Research. – 2005. – Vol. 63. – P. 89–96.
8. Eubanks J.H., Djabali M., Selleri L., Grandy D.K., Civelli O., McElligott D.L., Evans G.A. // Genomics. – 1992. – Vol. 14. – P. 1010–1018.
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. De Mei C., Ramos M., Iitaka C., Borrelli E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors // Curr Opin Pharmacol. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 53–61.
11. Midzyanovskaya I.S. Absence and mixed forms of epilepsy in WAG Rij rats: characteristics and brain aminergic modulations. Nijmegen: Nijmegen University Press. 2006. 230 p.
12. Usiello A., Baik J.H., Rougé-Pont F., Picetti R., Dierich A., LeMeur M., Piazza P.V., Borrelli E. // Nature. – 2000. – Vol. 408, № 6809. – P. 199–203.
13. Ventura R., Cabib S., Puglisi-Allegra S. Genetic susceptibility of mesocortical dopamine to stress determines liability to inhibition of mesoaccumbens dopamine and to behavioral 'despair' in a mouse model of depression // Neuroscience. – 2002. – Vol. 115, № 4. – P. 999–1007.
14. Wang Y., Xu R., Sasaoka T., Tonegawa S., Kung M.P., Sankoorikal E.B. // J Neurosci. – 2000. – Vol. 20, № 22. – P. 8305–8320.
15. Zhang Y., Bertolino A., Fazio L., Blasi G., Rampino A., Romano R., Mei-Ling Lee T., Tao Xiao, Papp A., Wang D., Sadee W. // Journal The Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2007. – Vol. 104, № 51. – P. 20552–20557.

References

1. Ahmadeev A.V., Kalimullina L.B. «Sposob prigotovleniya perezhivajushhijh srezov piriformnoj doli mozga». (Method of preparation of experiencing slices of piriforme lobe of the brain). Patent RF no. 2438193. 2011. Bull.45.

2. Ahmadeev A.V., Kalimullina L.B. «Sposob differencirovannogo izvlechenija rostral'nyh i kaudal'nyh chastej mindalevidnogo kompleksa mozga i ustrojstvo dlja ego osushhestvlenija». (Method of differential extraction of rostral and caudal parts of Amygdaloid complex of the brain and the device for its implementation). Patent RF no. 2487673. 2013. Bull. 56.
3. Kalimullina L., Ahmadeev A., Bikbaev A.F., Husnutdinova Je., Chepurinov S., Chepurnova N. *Medicinskaja genetika*. 2005. no. 5. pp. 198–199.
4. Shal'japina V.G. *Osnovy neyroendokrinologii*. (Fundamentals of neuroendocrinology) SPb.: Jelbi, 2005. 156 p.
5. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors // Pharmacol. 2011. Vol. 63. pp. 182–217.
6. Bertolino A., Fazio L., Caforio G., Blasi G., Rampino A., Romano R., Giorgio A., Taurisano P., Papp A., Pinsonneault J., Wang D., Nardini M., Popolizio T., Sadee W. // Brain. 2009. V. 132. no. 2. pp. 417–425.
7. Birioukova L.M., Midzyanovskaya I.S., Lensu S., Tuomisto L., van Luijtelaar E.L. // Epilepsy Research. 2005. Vol. 63. pp. 89–96.
8. Eubanks J.H., Djabali M., Selleri L., Grandy D.K., Civelli O., McElligott D.L., Evans G.A. // Genomics. 1992. Vol. 14. pp. 1010–1018.
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. De Mei C., Ramos M., Iitaka C., Borrelli E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors // Curr Opin Pharmacol. 2009. Vol. 9, no. 1. pp. 53–61.
11. Midzyanovskaya I.S. Absence and mixed forms of epilepsy in WAG Rij rats: characteristics and brain aminergic modulations. Nijmegen: Nijmegen University Press. 2006. 230 p.
12. Usiello A., Baik J.H., Rougé-Pont F., Picetti R., Dierich A., LeMeur M., Piazza P.V., Borrelli E. // Nature. 2000. Vol. 408, no. 6809. pp. 199–203.
13. Ventura R., Cabib S., Puglisi-Allegra S. Genetic susceptibility of mesocortical dopamine to stress determines liability to inhibition of mesoaccumbens dopamine and to behavioral 'despair' in a mouse model of depression. // Neuroscience. 2002. Vol. 115, no. 4. pp. 999–1007.
14. Wang Y., Xu R., Sasaoka T., Tonegawa S., Kung M.P., Sankoorikal E.B. // J Neurosci. 2000. Vol. 20, no. 22. pp. 8305–8320.
15. Zhang Y., Bertolino A., Fazio L., Blasi G., Rampino A., Romano R., Mei-Ling Lee T., Tao Xiao, Papp A., Wang D., Sadee W. // Journal The Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2007. Vol. 104, no. 51. pp. 20552–20557.

Рецензенты:

Хисматуллина З.Р., д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии человека и зоологии Башкирского государственного университета, г. Уфа;

Башкатов С.А., д.б.н., профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины Башкирского государственного университета, г. Уфа.

Работа поступила в редакцию 10.07.2014.