УДК 611.813.14.018: 599.323.4

ОСОБЕННОСТИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КРЫС, ИМЕЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ В ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ Д2-РЕЦЕПТОРА

Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В.

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

Целью исследования явился сравнительный анализ двигательной активности и исследовательской деятельности крыс, имеющих различия в экспрессии изоформ Д2-рецептора, ассоциированные с полиморфными вариантами локуса Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа.. Результаты показали, что крысы с генотипом A_1/A_1 по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (*DRD_2*), определяющим снижение экспрессии короткой изоформы Д2-рецептора, при тестировании поведения в установке «открытое поле» показывают высокую двигательную активность и более выраженную исследовательскую деятельность по сравнению с крысами – носителями генотипа A_2/A_2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что крысы с генотипом A_1/A_1 *DRD_2* демонстрируют активную, а крысы с генотипом A_2/A_2 *DRD_2* – пассивную стратегию ориентировочно-исследовательского поведения.

Ключевые слова: поведение, изоформы дофаминового рецептора второго типа, локус Taq 1 A DRD2, дофамин

PECULIARITIES OF LOCOMOTOR ACTIVITY AND RESEARCH ACTION IN RATS WITH DIFFERENCES IN THE EXPRESSION OF ISOFORMS OF RECEPTOR D2

Leushkina N.F., Akhmadeev A.V.

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

The aim of the study was comparative analysis of locomotor activity and research action in rats with differences in the expression of isoforms of receptor D2 which associated with polymorphic variants of locus Taq 1 *DRD2*. The results showed that rats with genotype A_1/A_1 on the locus Taq 1 A *DRD2*, which determine decrease in the expression of short isoform of receptor D2, show a high locomotor activity and more pronounced research action in «open field» test in comparison with rats with genotype A_2/A_2. The obtained results show that rats with genotype A_1/A_1 DRD2 demonstrate active and rats with genotype A_2/A_2 DRD2 – passive strategy of position-finding behavior.

Keywords: behavior, isoforms of dopamine receptor D2, locus Taq 1 DRD2, dopamine

В настоящее время установлено, что существует не менее пяти типов дофаминовых рецепторов. Их принято объединять в два семейства – семейство рецептора Д1 (Д1и Д5) и семейство рецептора Д2 (Д2, Д3, Д4) [3]. Количество и распространение Д1- и Д2-рецепторов в ткани мозга выше, чем Д3 и Д4. Это предопределяет, что именно Д1 и Д2-рецепторы играют ведущую роль в реализации различных функций и в развитии патологии нервной системы.

Д1 и Д2-рецепторы имеют разную аффинность по отношению к дофамину. Афинность Д2-рецепторов от 10 до 100 раз больше аффинности Д1-рецепторов [11]. Эти различия предполагают разную роль этих рецепторов в выделении дофамина. Выделившийся дофамин достигает постсинаптического компонента, приводя к формированию и реализации целенаправленного поведения [7].

Выделено две изоформы м-РНК Д2-рецептора, которые получили названия длинной (D2L) и короткой (D2S). Они образуются в результате альтернативного сплайсинга гетероядерной РНК, синтезируемой на шестом экзоне гена этого рецептора [6]. Короткая изоформа рецептора отличается от длинной тем, что у нее отсутствует 29 аминокислот, входящих в состав третьей цитоплазматической петли рецептора [3].

Показано, что изоформы имеют различную локализацию на компонентах синапсов. Длинная изоформа (D2L) локализуется на постсинаптическом компоненте синапсов, в то время как D2S располагается пресинаптически и выполняет функции ауторецептора [12]. Основная роль ауторецепторов сводится к торможению синтеза и выделения дофамина. Результаты исследований Zhang et al. [15] и Moyer et al. [10] показали, что наличие аллеля A_1 в локусе Taq 1 A *DRD_2* приводит к снижению экспрессии короткой изоформы рецептора, вследствие чего повышается синтез и выделение дофамина из пресинаптического компонента.

Целью исследования явился сравнительный анализ двигательной активности и исследовательской деятельности крыс, имеющих различия в экспрессии изоформ Д2-рецептора, ассоциированные с полиморфными вариантами локуса Taq 1 *DRD_2*.

Материал и методы исследования

Исследования проведены на двух группах (в каждой группе было по 66 крыс, равное количество самцов и самок) половозрелых гомозиготных крыс линии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD2) 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 (Калимуллина и др., 2005). Генетический анализ полиморфного локуса Taq 1 A DRD_2 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 °C) 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 (Eropean Communities Council Directives,1986).

Ориентировочно-исследовательское поведение крыс в условиях новизны обстановки изучали в установке «открытое поле». Оно представляло собой квадратную освещенную в центре (лампой 40 Вт) арену площадью 100 см^2, 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 уринаций и болюсов. В данной статье проведен анализ двигательной активности и исследовательской деятельности.

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

Результаты, полученные при регистрации поведения двух групп экспериментальных крыс, имеющих генотипы A_1/A_1 и A_2/A_2 по локусу Taq 1 A DRD_2, приведены в таблице.

Показатели поведения в тесте «открытое поле» крыс линии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 локуса Taq1A DRD_2 (M ± m)

Параметры поведения	Генотип		t-value	p
	A_1/A_1	A_2/A_2		
Количество пересеченных квадратов в центре поля	7,82 ± 0,53	3,05 ± 0,32	7,11	< 0,001
Количество пересеченных квадратов на периферии поля	74,70 ± 2,72	43,68 ± 2,49	8,01	< 0,001
Общая двигательная активность	82,70 ± 3,09	46,73 ± 2,75	8,26	< 0,001
Количество совершенных стоек в центре поля	1,42 ± 0,14	0,53 ± 0,09	4,80	< 0,001
Количество совершенных стоек на периферии поля	19,21 ± 0,95	8,35 ± 0,84	7,92	< 0,001
Общее количество совершенных стоек	20,63 ± 1,04	8,88 ± 0,88	7,95	< 0,001
Неподвижность (с)	1,12 ± 0,26	9,80 ± 3,17	3,08	< 0,01

Данные таблицы показывают, что по числу пересеченных квадратов в центре поля у крыс с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 существуют высоко значимые различия. Средние значения, приведенные по данному параметру, указывают на сниженную в два раза посещаемость центра открытого поля животными с генотипом A_2/A_2. Сравнение среднего количества пройденных квадратов на периферии поля крысами с генотипом A_2/A_2 также достоверно меньше, чем у крыс с генотипом A_1/A_1, что показывает, что локомоторная активность у крыс с генотипом A_2/A_2 снижена. По общей двигательной активности (числу амбуляций), которую мы определяли как совокупность числа пересеченных квадратов в центре и на периферии поля, нами установлено значимое различие между крысами двух изученных групп. Горизонтальная активность достоверно выше у крыс с генотипом A_1/A_1 по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2.

При выявлении различий в поведении двух групп крыс оказался статистически значим параметр неподвижности. Он в десять раз выше у крыс с генотипом A_2/A_2, что проявлялось в их заторможенном состоянии и низкой исследовательской активности.

Анализ исследовательской деятельности показал, что количество стоек, совершенных в среднем за все дни тестирования крысами с генотипом A_1/A_1 в центре «открытого поля» в три раза больше аналогичного показателя у крыс с генотипом A_2/A_2 ($p < 0,001$). На периферии «открытого поля» крысы с генотипом A_1/A_1 в сред-

нем за все дни тестирования совершили в два раза больше стоек по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2 ($p < 0,001$). Естественно, что при наличии различий исследовательской деятельности в центре и на периферии поля сравнение показателей общей исследовательской деятельности также выявило статистически достоверные различия ($p < 0,001$).

Итак, выполненный анализ поведения позволил выявить значимые различия в поведении двух изучаемых групп крыс. У крыс с генотипом A_2/A_2 при тестировании в «открытом поле» мы наблюдали частые замирания, при этом животные находились в состоянии пассивного бодрствования, но у них отсутствовали любые локомоторные акты. Крысы с генотипом A_1/A_1 подобного состояния практически не проявляли, они стремились исследовать как можно больше незнакомого пространства, демонстрируя высокую горизонтальную и вертикальную активность.

Методика изучения поведения грызунов в «открытом поле» является одним из самых популярных тестов в нейробиологии поведения и широко используется в нейрогенетике поведенческого фенотипирования разных линий, а также трансгенных и мутантных животных [2].

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения двух групп крыс линии WAG/Rij с генотипами A_1/A_1 и A_2/A_2 показало, что популяция крыс (самцы + самки) с генотипом A_1/A_1 DRD_2 характеризуется большей двигательной активностью и более интенсивной исследовательской деятельностью по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2.

Полученные результаты выявили ассоциацию генотипа A_1/A_1 по локусу Taq 1 A DRD_2 с гиперактивностью в «открытом поле», в то время как генотип A_2/A_2 по этому локусу проявлял себя противоположными нейрофенотипическими характеристиками – меньшей двигательной активностью и менее интенсивной исследовательской деятельностью.

Обнаруженные различия хорошо объяснимы на основании результатов исследований по молекулярной генетике. Показано, что аллель A_1 локуса Taq 1 A DRD_2 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 рецептора (D2S). Приведенные данные Zhang et al. [15] подтверждены и Jocham et al. [8], показавшими наличие неравновесия по сцеплению между локусами rs 1800497 and rs 2283265 ($D' = 0,78$). Так как DRD_2 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 D2 и изменение в силу этого соотношения длинной и короткой изоформ приводит к повышению синтеза и выделения дофамина, что предопределяет повышение его содержания в тканях мозга [5, 12 и др.].

Выяснено, что активация D2S нарушает синтез и выделение дофамина, ограничивая эти процессы, и приводит к снижению двигательной активности, в то время как активация D2L повышает локомоторную активность [4]. Показано, что сигнал-трансдукторные пути, реализующие влияние D2S и D2L на функциональное состояние нейронов путем воздействия на транскрипционные факторы, имеют специфические особенности, объясняющие различия вызываемых ими эффектов [13].

Приведенные сведения литературы 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 дофамина из пресинаптической терминали дофаминергического синапса, проявлением чего является гиперактивность этих животных. У крыс с генотипом A_2/A_2, исходя из выявленных особенностей ориентировочно-исследовательского 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, у которых с помощью генетических технологий (gene-targeting technology) было выполнено удаление участка гена, ответственного за экспрессию длинной изоформы рецептора. 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.

Выводы

1. Крысы с генотипом A_1/A_1 по локусу Taq 1 A DRD_2, определяющим снижение экспрессии короткой изоформы Д2-рецептора, при тестировании поведения в установке «открытое поле» показывают высокую двигательную активность по сравнению с крысами – носителями генотипа A_2/A_2.

2. Крысы с генотипом A_1/A_1 по локусу Taq 1 A *DRD*$_2$, определяющим снижение экспрессии короткой изоформы Д2-рецептора, при тестировании поведения в установке «открытое поле» показывают более выраженную исследовательскую деятельность по сравнению с крысами – носителями генотипа A_2/A_2.

3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что крысы с генотипом A_1/A_1 DRD_2 демонстрируют активную, а крысы с генотипом A_2/A_2 DRD_2 – пассивную стратегию ориентировочно-исследовательского поведения.

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

Список литературы

1. Калимуллина Л., Ахмадеев А., Бикбаев А., Галеева А., Хуснутдинова Э., Чепурнов С., Чепурнова Н. // Медицинская генетика. – 2005. – № 5. – С. 198–199.

2. Минасян А. Временная стабильность исследовательского поведения мышей в условиях новизны в различных тестах открытого поля. Нейроэтология. – 2007. – Т. 9. № 1. – С. 32–36.

3. Шабанов П.Д. Структура и функции рецепторов дофамина. Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2002. – № 1. – С. 2–18.

4. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol. – 2011. – Rev. 63. – P. 182–217. doi: 10.1124/pr.110.002642.

5. 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.

6. Eubanks J.H., Djabali M., Selleri L., Grandy DK, Civelli O, McElligott DL, Evans GA. Genomics. 1992. – Vol. 14. – P. 1010–1018.

7. Grace A.A., Floresco S.B., Goto Y., Lodge D.J. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. Trends Neurosci. 2007. – Vol. 30. – P. 220–227. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.003.

8. Jocham G., Klein T.A., Neumann J., von Cramon D.Y., Reuter M., Ullsperger M.J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29. – № 12. – P. 3695–3704.

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. Moyer R.A., Wang D., Papp A.C., Smith R.M., Duque L., Mash D.C., Sadee W. Neuropsychopharmacology. – 2011. – Vol. 36. – P. 753–762; doi:10.1038/npp.2010.208.

11. Tritsch N.X., Sabatini B.L. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. Neuron. – 2012. – Vol. 76. – P. 33–50. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.023.

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. Van-Ham I.I., Banihashemi B., Wilson A.M., Jacobsen K.X., Czesak M., Albert P.R. J. Neurochem. – 2007. – Vol. 102. – № 6. – P. 1796–1804.

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. Kalimullina L., Ahmadeev A., Bikbaev A.F., Husnutdinova Je., Chepurnov S., Chepurnova N. *Medicinskaja genetika*. 2005. no. 5. pp. 198–199.

2. Minasjan A. *Vremennaja stabilnost issledovatelskogo povedenija myshej v uslovijah novizny v razlichnyh testah otkrytogo polja* (Temporal stability of exploratory behavior in mice in the conditions of novelty in various tests of an “open field”). *Nejrojetologija*. 2007. vol. 9. no. 1. pp. 32–36.

3. Shabanov P.D. *Struktura i funkcii receptorov dofamina* (The structure and function of dopamine receptors). *Obzory po klin. farmakol. i lek. terapii*. 2002. Vol. no. 1. pp. 2–18.

4. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol. 2011. Rev. 63. P. 182–217. doi: 10.1124/pr.110.002642.

5. 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. no. 2. pp. 417–425.

6. 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.

7. Grace A.A., Floresco S.B., Goto Y., Lodge, D.J. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. Trends Neurosci. 2007. Vol. 30. pp. 220–227. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.003.

8. Jocham G., Klein T.A., Neumann J., von Cramon D.Y., Reuter M., Ullsperger M.J. Neurosci. 2009. Vol. 29. no. 12. pp. 3695–3704.

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. Moyer R.A., Wang D., Papp A.C., Smith R.M., Duque L., Mash D.C., Sadee W. Neuropsychopharmacology. 2011. Vol. 36. pp. 753–762; doi:10.1038/npp.2010.208.

11. Tritsch N.X., Sabatini B.L. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. Neuron. 2012. Vol. 76. pp. 33–50. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.023.

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. Van-Ham I.I., Banihashemi B., Wilson A.M., Jacobsen K.X., Czesak M., Albert P.R. J. Neurochem. 2007. Vol. 102. no. 6. pp. 1796–1804.

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:

Муфазалова Н.А., д.м.н., профессор кафедры фармакологии № 1 с курсом клинической фармакологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа;

Мурзабаев Х.Х., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа.

Работа поступила в редакцию 15.09.2014.