

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕДЕНИЯ У ПРЕДПОЧИТАЮЩИХ АЛКОГОЛЬ КРЫС В УСТАНОВКЕ «ПРИПОДНЯТЫЙ КРЕСТООБРАЗНЫЙ ЛАБИРИНТ» И СОДЕРЖАНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ СТРЕССОРА

Леушкина Н. Ф., Федорова А. М., Ахмадеев А. В.

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет Минобрнауки РФ», Уфа, Россия (450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32) e-mail: mpha@ufanet.ru

Объектом исследования были крысы линии WAG/Rij с генотипом A1/A1 по локусу Taq 1A гена D2-рецептора, прошедшие селекцию на предпочтение алкоголя. В качестве стрессора использовали пятикратную ежедневную аудиогенную стимуляцию. Стресс значительно увеличил время пребывания крыс в закрытом рукаве лабиринта, а также длительность и количество эпизодов груминга, что свидетельствует о формировании у них тревожности. Сопоставление результатов тестирования поведения крыс в приподнятом крестообразном лабиринте с ранее выявленными сдвигами в поведенческих реакциях в установке «открытое поле» позволяет указать на присущую этим крысам особенность. Она заключается в том, что тревожность проявляется формированием активной стратегии поведения. После действия стрессорных нагрузок содержание дофамина в МК (повышенное до стресса) снижается на 33 %. В отличие от дофамина, в ответ на стресс содержание норадреналина увеличивается на 17 %. Выявленные нейробиологические особенности представляют интерес для исследования механизмов формирования девиантного поведения.

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

CHARACTERIZATION OF THE BEHAVIOR OF THE ALCOHOL-PREFERRING RATS IN THE INSTALLATION «ELEVATED PLUS MAZE» AND THE CONTENT OF CATECHOLAMINES AFTER EXPOSURE TO THE STRESSOR

Leushkina N. F., Fedorova A. M., Akhmadeev A. V.

Bashkir state University, Ufa, Russia (450076, Ufa, st. Zaki Validi, 32), e-mail: mpha@ufanet.ru

The object of the study were WAG/Rij 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. Stress significantly increased the time of stay of rats in the dark compartment of labyrinth, as well as the duration and the number of episodes of grooming, that testifies to the formation of their anxiety. Comparison of the results of testing the behavior of rats in the "elevated plus maze" with a previously identified shifts in behavior in "open field" allows you to point to the inherent feature of these rats. It lies in the fact that anxiety is manifested formation of the active strategy of behavior. After exposure to stress loads content of dopamine in the Amygdala (high to stress) is reduced by 33 %. Unlike dopamine, in response to stress the content of norepinephrine increases by 17 %. Identified neurobiological features are of interest to study the mechanisms of formation of deviant behavior.

Key words: predisposition to alcoholism, stress, Amygdala, catecholamines.

Введение

Стресс, вызывая нарушения в деятельности ведущих регуляторных систем организма – нервной, эндокринной и иммунной, приводит к тому, что имеющая место в организме предрасположенность к заболеванию проявляется, происходит формирование болезни. Это общая закономерность находит выражение и при болезнях зависимости, к которым относится и алкоголизм.

К настоящему времени уже установлены основные биологические механизмы развития болезней зависимости от психоактивных веществ (ПАВ). Они указывают на

ведущую роль катехоламиновой системы в ее патогенезе [2, 5]. Показано, что повышение уровня катехоламинов связано с актуализацией патологического влечения к психоактивным веществам и предопределено на 50 процентов генетическими факторами.

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 [3]. 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.

Биологические механизмы влияния стресса на манифестацию алкоголизма изучены недостаточно, а результаты выполненных работ противоречивы. Lynch et al. [14] показали, что иммобилизационный стресс увеличивает потребление алкоголя крысами линии Вистар, а Chester et al. [8], наоборот, наблюдали снижение потребления алкоголя предпочитающими алкоголь (ПА) крысами в процессе стрессогенных процедур. Повторные сеансы стрессорных воздействий (плавательный тест) приводили к увеличению потребления алкоголя только у крыс линии Вистар, но не у ПА крыс [7]. Существующие в литературе противоречия объясняются использованием различных линий животных, особенностями проведения экспериментальных процедур, но важную роль при этом играют, несомненно, и генетические факторы, которые у животных моделей, созданных на основании фенотипического признака – склонности к потреблению алкоголя – остаются неизвестными.

Целью работы являлся анализ поведения предпочитающих алкоголь крыс в установке приподнятый крестообразный лабиринт и содержания катехоламинов в миндалевидном комплексе мозга (МК) после действия стрессора.

Материал и методы исследования. Использованные в работе предпочитающие алкоголь (ПА) крысы (всего 10, самцы и самки) 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 [4]. 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.

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), использованный в работе, представлял собой установку, имеющую два рукава, в месте пересечения которых находилась открытая площадка. Один из рукавов лабиринта имел закрытые отсеки. Лабиринт устанавливали на высоте одного метра от пола. Мы регистрировали время нахождения крысы в открытом (ОР) и закрытом (ЗР) рукавах лабиринта, количество стоек в ОР и ЗР рукавах, латентный период до первого движения, общую неподвижность в ОР и ЗР рукавах, количество свешиваний в ОР, количество заходов в ОР и ЗР.

Эксперимент, направленный на выяснение действия стрессорных нагрузок на ПА и НА крыс, проводился в три этапа: 1 этап – тестирование поведения животных в ПКЛ в течение 5 дней; 2 этап – пятикратное в течение пяти дней воздействие стрессора; 3 этап – повторное тестирование поведенческих реакций животных в ПКЛ в течение 5 дней. В качестве стрессора использовали пятикратную ежедневную аудиогенную стимуляцию, которая проводилась в специальной камере (60х60х60см) по методике Кузнецовой [6], используя «звон ключей» («keys ringing»).

Содержание биогенных аминов и их метаболитов в МК (по 10 крыс до и после стресса, самцы и самки) определяли на ВЭЖХ (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 М). Область МК выделяли из нативного мозга и гомогенизировали в 20 объемах холодной 0,1М перхлорной кислоты (Sigma, USA) и 1пг/50 мкл дигидроксibenзиламина гидробромида (Sigma, USA) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенизат центрифугировали (при -20°C) в течение десяти минут при 6000 оборотов в минуту. Супернатант подвергали микрофильтрации с помощью специальных наборов фирмы «Биохром» (Россия). После повторного центрифугирования пробы анализировали на содержание моноаминов (норадреналина, дофамина) и метаболита дофамина – 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК). Полученные результаты систематизировали и подвергали статистической обработке с помощью пакета программ «Statistica 6».

Результаты исследований и их обсуждение. В ранее проведенном исследовании поведения ПА крыс в «открытом поле» (ОП) было обнаружено, что для них характерна выраженная двигательная активность. При этом крысы больше двигались в периферической зоне ОП, что позволяло предполагать наличие большей тревожности. На это указывали и данные регистрации груминга. Изучение двигательной активности крыс в ОП, после стресса, показало, что она увеличивается [1]. Обращало на себя внимание и изменение перемещения крыс по разным секторам поля. Если до стресса крысы двигались преимущественно по периферии поля (что стало одним из оснований для предположения, что им свойственна тревожность), после стресса они стали, не только более активно перемещаться, но и больше

выходить в центральные (в 1,3 раза) и промежуточные сектора (1,2 раза) ОП. Является ли увеличение горизонтальной активности крыс в ОП, после стресса, отражением формирующейся у них тревожности мы решили выяснить с использованием установки ПКЛ, который является наиболее признанным тестом при оценке уровня тревожности у грызунов. Полученные результаты отражены в таблице.

Таблица. Показатели поведения предпочитающих алкоголь крыс до и после стресса (M+m) в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ)

Время пребывания в закрытом рукаве (с)		Время пребывания в открытом рукаве (с)		Длительность груминга в закрытом рукаве (с)		Количество эпизодов груминга в закрытом рукаве	
до	после	до	после	до	после	до	после
396,13±30,57	512,44*±29,88	503,80±19,45	383,51*±30,57	15,11±2,39	49,93*±9,15	3,04±0,74	4,95*±0,54

Примечание: * p<0,05.

Приведенные в таблице данные показывают, что если до действия стрессора крысы равномерно посещали как светлый, так и закрытый рукава лабиринта, то после стресса они значительно больше пребывали в закрытом рукаве (p<0,05). Кроме того, значимо возросла в закрытом рукаве, как длительность, так и количество эпизодов груминга (p<0,05). Все отмеченные сдвиги свидетельствуют о том, что стресс проявился формированием тревожности.

Сопоставление полученных в работе результатов тестирования поведения ПА крыс в ПКЛ, с ранее полученными в установке ОП, позволяет указать на интересный факт. Он заключается в том, что тревожность (как первая стадия стресс-реакции) в зависимости от состояния катехоламинергической системы мозга может проявляться не только формированием пассивной, но и активной стратегии поведения. Возможно, это объясняет «антисоциальный» характер поступков, и, в целом, формирование девиантного поведения людей, предрасположенных к алкоголизму.

После действия стрессорных нагрузок содержание дофамина в МК (повышенное до стресса у ПА крыс) снижается. При этом снижение содержания дофамина происходит на 33 %. В отличие от дофамина, в ответ на стресс содержание норадреналина увеличивается на 17 %.

Главным фактором, определяющим повышение содержания дофамина у ПА крыс, является то, что они имеют генотип A1/A1 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 [13] подтверждены и Jocham с соавторами [10], 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 [12], 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 приводят к повышению содержания внеклеточного дофамина [9, 11].

Список литературы

1. Анализ поведения и содержания катехоламинов мозга до и после стресса у крыс с генотипом A1/A1 по локусу TAQ1a D₂ рецептора / Н. Ф. Леушкина, А. М. Федорова, Л. Б. Калимуллина, А. В. Ахмадеев // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 8. – Ч. 4. – С. 667– 676.
2. Анохина И. П., Москаленко В. Д. Генетика алкоголизма и наркоманий: Руководство по наркологии: в 2 т. / под ред. Н. Н. Иванца. – М.: Медпрактика, 2002. – С. 140– 160.
3. 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.
4. Борисова Е. В., Русаков Д. Ю., Судаков С. К. Различия характеристик опиатных и катехоламиноергических рецепторов стриатума и коры головного мозга крыс линий Fischer-344 и Wag/Gsto могут обуславливать различия в положительно-подкрепляющем действии морфина // *Бюллетень эксп. биол. и мед.* – 1992. – № 9. – С. 296– 298.
5. Иванец Н. Н. Наркология – предмет и задачи: Руководство по наркологии: в 2 т. / под ред. Н. Н. Иванца. – М.: Медпрактика, 2002. – С. 5– 7.
6. Кузнецова Г. Д. Аудиогенные припадки у крыс различных лини. // *Журнал ВНД*. – 1998. – Т. 48. – № 1. – С. 143– 152.
7. A comparative study on alcohol-preferring rat lines: effects of deprivation and stress phases on voluntary alcohol intake / V. Vengeliene, S. Siegmund, M. V. Singer et al. // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2003. – V. 27. – P. 1048–1054.
8. Chester J. A., Blose A. M., Froehlich J. C. Acoustic startle reactivity during acute alcohol withdrawal in rats that differ in genetic predisposition toward alcohol drinking: effect of stimulus characteristics // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2004. – V. 28. – №.5. – P. 677–687.

9. 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.
10. Dopamine DRD2 polymorphism alters reversal learning and associated neural activity // Jochem G., Klein T.A., Neumann J. et al. // *J Neurosci*. – 2009. – V. 29. – № 12. – P. 3695–3704.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. The effects of restraint stress on voluntary ethanol consumption in rats. / Lynch WJ, Kushner MG, Rawleigh JM, et al. // *Exp Clin Psychopharmacol*. – 1999. – V. 7. – P. 318–323.

Рецензенты:

Башкатов Сергей Александрович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», г. Уфа.

Хуснутдинова Эльза Камилевна, доктор биологических наук, профессор, зав. отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа.