УДК 611.813.14.018: 599.323.4

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОВЕДЕНИЯ ГОМОЗИГОТНЫХ (A_2/A_2) КРЫС ПО ЛОКУСУ TAG 1A DRD_2 ДО И ПОСЛЕ АУДИОГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Леушкина Н.Ф., Калимуллина Л.Б.
Башкирский государственный университет, Уфа
Подробная информация об авторах размещена на сайте
«Учёные России» - http://www.famous-scientists.ru

В тесте «открытое поле» изучено поведение гомозиготных (A_2/A_2) по локусу TAG 1A DRD_2 крыс линии WAG/Rij до и после шести сеансов аудиогенной стимуляции, сопровождавшихся большими судорожными припадками. Найдено, что после стимуляции резко снижается двигательная и исследовательская активность крыс.

Основная задача генетики поведения – выяснение роли генетических факторов в определении поведения. Она решает ряд проблем, среди которых – исследование механизмов действия генов, определяющих формирование нервной системы, а также изучение механизмов реализации действия мутантных генов, затрагивающих функции ЦНС, которые могут служить моделями заболеваний нервной системы человека. Эти два направления обычно называют нейрогенетикой [3].

Целью данной работы явился анализ динамики показателей поведения гомозиготных (A_2/A_2) по локусу TAG 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD_2) крыс линии WAG/Rij до и после аудиогенной стимуляции.

Всех использованных в работе половозрелых крыс (всего 19 особей в возрасте шести месяцев) содержали в стандартных условиях вивария, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20°-22°)С и уровнем влажности. Еду и питье животные получали ad libitum. Крыс содержали в открытых проволочных клетках при естественном освещении. В каждой клетке находилось не более пяти крыс.

«Открытое поле» представляло собой квадратную освещенную арену, разделенную на 16 равных частей. В течение 5 минут регистрировали такие параметры как латентный период до первого движения, число пересеченных квадратов в центре и на периферии поля, количество стоек в центре и на периферии поля, эпизоды груминга и общее время их проведения, неподвижность, уринации, число болюсов с занесением их в протокольные листы. Регистрацию параметров поведения проводили в течение десяти дней. Тест «открытое поле» был разработан еще в тридцатые годы прошлого века К. Холлом для оценки поведения крыс [13]. В настоящее время это один из самых распространенных методов регистрации поведения грызунов, который широко используется в экспериментальной нейробиологии.

Аудиогенную стимуляцию крыс проводили в специальной камере (60x60x60см) по методике Г.Д. Кузнецовой, используя «звон ключей» («keys ringing», Krushinsky, 1974). Звуковой сигнал имел диапозон 13-85 kHz (максимум спектра 20-40 kHz) и среднюю интенсивность 50-60 dB с величиной пиков до 80-90 дБ. Стимульный раздражитель включал в себя ультразвуковую часть (20 кГц и выше) и был более эффективным для вызова большого судорожного припадка, чем звук звонка или гудка [14]. Он предъявлялся в течение 1,5 минут.

Ответ на стимул оценивали по четырех - бальной шкале, следуя определенным объективным показателям реакции животного: 0 - отсутствие реакции; 1 балл – сильное двигательное возбуждение; 2 балла – клонические судороги в позе «на животе»; 3 балла – продолжение клонических судорог с переворачиванием на бок; 4 балла – тонические судороги и состояние каталепсии [11]. На следующий день после шесто-

го большого припадка начинали повторную регистрацию поведения крыс A_2/A_2 в открытом поле.

После шести сеансов аудиогенной стимуляции (АС), приводивших каждый раз к формированию большого судорожного припадка, повторное тестирование крыс A_2/A_2 в «открытом поле», выявило изменения, которые отражены в таблице 1.

Таблица 1. .Показатели двигательной активности в открытом поле (ОП) крыс A_2/A_2 до и после аудиогенной стимуляции

Генотип по TAG 1A DRD_2	Неподвижность (сек)		Двигательная активность (число амбуляций – количество пересеченных квадратов)		
	До первого движения	В течение сеанса ОП	общая	Центр ОП	Периферия ОП
A2A2 исходные	10,25+2,24	31,45+9,25	48,26+5,99	2,68+0,67	45,58+5,32
A2A2 после шести сеансов АС	32,31+16,27	81,60+23,44	23,22+4,03	1,82+0,43	21,40+3,60
Уровень значимости p	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05	<0,01

Приведенные в таблице 1 результаты убедительно показывают, что у крыс после шести сеансов аудиогенной стимуляции резко возросла неподвижность. Это проявилось как в увеличении латентного периода до первой амбуляции, так и в увеличении времени общей неподвижности, зарегистрированной как сумма остановок крысы во время движений по открытому полю.

Время неподвижности крыс хорошо коррелирует с показателями двигательной активности – она снижается у крыс после сеансов с АС в два раза, и отражается как на показателях общей двигательной активности, так и числе посещений ими периферических квадратов. Последние объясняется тем, что центр поля мало посещают крысы A2A2 как до-, так и после аудиогенной стимуляции.

Данные таблицы 2 показывают, что после повторных сеансов аудиогенной стимуляции снижение двигательной активности крыс A_2/A_2 сопровождается и резким угнетением их исследовательской деятельности. Эти данные позволяют предполагать, что повторяющиеся большие припадки вызвали значительные нарушения в состоянии мозга вследствие формирующейся обширной эпилептической системы.

Таблица 2. Показатели исследовательской деятельности и груминга крыс A_2/A_2 в открытом поле (ОП) до и после аудиогенной стимуляции

Генотип по TAG 1A DRD_2	Количество вертикальных стоек			Груминг		Уринация
	Общая	Центр ОП	Периферия ОП	Кол-во эпизодов	Общее время, сек	Число
A2A2 исходные	14,34+2,08	0,29+0,16	14,05+1,92	4,28+0,53	12,21+1,28	0,09+0.04
A2A2 после шести сеансов АС	4,97 0,91	0,14 0,06	4,83 0,85	2,88 0,49	27,20 12,46	0,15 0,08
Уровень значимости p	<0,01	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05

Крысы линии WAG/Rij являются инбредной линией с генетически детерминированной абсансной эпилепсией. Согласно новой гипотезе абсансная эпилепсия является кортико-таламическим типом эпилепсии [6]. В ее формировании принимают участие такие структуры, как кора больших полушарий с эпилептогенной зоной (находящейся в периоральной области сенсомоторной коры), вентробазальное и ретикулярное ядро таламуса. Ранее было показано, что у 30% взрослых крыс линии WAG/Rij аудиогенная стимуляция вызывает конвульсивные судороги (Кузнецова). Так как крысы линии WAG/Rij выявляют устойчивую спонтанную пик-волновую активность, то аудиогенная субпопуляция этих крыс – хорошая модель для исследования смешанной формы эпилепсии, которая является тяжелой клинической проблемой для лекарственной терапии [7].

Впервые с помощью метода ПЦР изучен полиморфизм рестрикционного локуса TAG1A гена рецептора дофамина D_2 и варьирующих тандемных повторов гена переносчика дофамина [4]. Результаты анализа показали, что большинство животных являются гетерозиготами по изученным локусам. Так в локусе TAG1A выявлено два аллеля (A_1 и A_2), при этом генотип A_1/A_2 был у 75% животных, A_2/A_2 – 21% и A_1/A_1 у 4%. В ранее проведенных исследованиях была показана ассоциация гена DRD_2 с особенностями ЭЭГ и гематологическими показателями двух указанных субпопуляций крыс линии WAG/Rij [1]. Целенаправленное скрещивание гомозиготных крыс этой линии позволило получить на кафедре морфологии и физиологии человека Башкирского госуниверситета две субпопуляции крыс линии WAG/Rij (с генотипами A_2/A_2 и A_1/A_1 по локусу TAG 1A DRD2).

В экспериментах с аудиогенной стимуляцией, проведенной по методике Г.Д. Кузнецовой и соавторов [14], показана ассоциация генотипа A_2/A_2 по локусу TAG 1A DRD_2 у крыс линии WAG/Rij с повышенной чувствительностью к звуку, который приводил к формированию больших судорожных припадков [5]. Последние характерны для конвульсивной формы эпилепсии, клиническая картина которой характеризуется наличием наряду с малыми припадками (абсансами, «petit mal») и большими припадками («grand mal»). Такая форма эпилепсии именуется смешанной эпилепсией [14].

У крыс A_2/A_2 после сеансов повторной аудиогенной стимуляции, сопровождавшихся шестью большими припадками (модель смешанной эпилепсии), результаты исследования поведенческих реакций показывают значимое увеличение латентного периода до первой амбуляции, снижение двигательной активности и почти полное прекращение исследовательской деятельности;

Это позволяет предполагать, что шесть больших конвульсивных припадков, которыми крысы реагировали на аудиогенное воздействие, привели к выраженным деструктивным процессам в мозге крыс. При этом к нарушениям в структурах кортико-ретикулярного кольца, имеющим место при абсансной эпилепсии, присоединились патогистологические процессы в стволовых центрах мозга [8], что, очевидно, привело к формированию «эпилептического мозга».

Наши данные, характеризующие поведение крыс после аудиогенной стимуляции, согласуются с данными [2], которые исследовали поведение крыс линии WAG/Rij с различной чувствительностью к звуку сразу после каждой аудиогенной стимуляции на протяжении десяти сеансов. Авторы отметили изменение поведения чувствительных к звуку крыс, которые проявлялись снижением двигательной и исследовательской активности животных.

Выявленная этими авторами, так же как и нами, достоверно меньшая исследовательская активность и более выраженная тревожность у аудиогенных крыс согласуется с результатами, полученными [12]. На крысах линии Вистар они показали, что аудиогенно чувствительные крысы линии Вистар показывают меньше исследовательской активности в экспериментальной камере до - и в течение предъявления звукового сигнала, по сравнению с устойчивыми к звуку животными. Эти же иссле-

дователи сравнили поведение крыс линии Вистар в «открытом поле» и обнаружили, что аудиогенные крысы менее активны на площадке, что было связано с их большим уровнем тревожности по сравнению с нечувствительными к аудиогенной стимуляции животными.

Изучение характера наследования повышенной чувствительности к звуку у крыс методом диаллельного скрещивания, показало, что данный признак имеет полигенную природу, действие генов аддитивно и гены, детерминирующие нечувствительность к звуку, доминируют. Чувствительность к звуку, характерная для крыс КМ, является почти полностью рецессивным признаком [10]. В природных условиях практически не встречаются животные, столь чувствительные к звуку, как крысы линии КМ. Вопрос о биологической роли аномальной чувствительности к звуку, точнее о его эволюционном генезе, не только не исследован, но и практически никогда не поднимается [3].

Молекулярно-генетические исследования у грызунов с аудиогенными припадками немногочисленны. Недавно показано, что у крыс КМ отсутствуют определенные гипервариабельные фрагменты ДНК (маркеры, свойственные резистентным лабораторным животным), которые, вероятно, отражают структурные изменения в геноме и связаны с проявлением аудиогенного приступа [3].

Признак «чувствительность к звуку» используется для исследования механизма развития судорожных состояний. Линии мышей и крыс, обладающие аудиогенной чувствительностью, служат моделями эпилепсии человека. Аудиогенная эпилепсия относится к категории патологических состояний, которые провоцируются внешней стимуляцией, иначе говоря, рефлекторно [3].

Создание валидных моделей для изучения этиологических и патогенетических механизмов психоневрологических заболеваний и состояний человека представляет собой актуальную, но весьма трудную задачу, решение которой возможно в результате трудоемких и всесторонних исследований. В отношении эпилепсии эта задача облегчается тем фактом, что патогенетические механизмы эпилепсии сходны как у человека, так и животных [9].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ахмадеев А.В., Бикбаев А.Ф., Баязитова Л.И. и др. Медицинская генетика, 2005, №4, с.150.

2. Бикбаев А.Ф., Карпова А.В., Калимуллина Л.Б. и др. Мат-лы III Восточно-европейской конференции: эпилепсия и клиническая нейрофизиология», Украина, Крым, 2000, с. 24-25.

3. Зорина З.А.., Полетаева И.И., Резникова Ж.В. Основы этологии и генетики поведения. М.: Высшая школа, 2002. 383 с.

4. Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В., Бикбаев А.Ф. и др. Медицинская генетика, 2005, №5, с. 198.

5. Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. В сб. научных статей «Интегративная физиология», Уфа, БашГУ, с. 48.

6. Меерен Х.К.М., ван Луителаар Е.Л.Дж., да Сильва Ф.Х.Лопес и др.// Успехи физиол. наук ,2004, т.35. № 1. с. 3.

7. Мидзяновская И.С., Кузнецова Г.Д., Туомисто Л. и др. // Нейрохимия, 2004, т. 21, № 4, с. 264.

8. Нагаева Д.В. Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. Мат-лы Всеросс. Конф. «Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга – 2006», Москва, РАМН, 2006, с. 196.

9. Погодаев К.И. Эпилептология и патохимия мозга. - М.: Медицина, 1986. - 288 с.

10. Романова и др., 1975.

11. Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Шацкова А. Б. // Ж-л. ВНД, 2005, том 55, №2, с. 253.

12. Garcia-Cairasco N.// Hear. Res., 2002, V. 168, p.208.

13. Hall C.S. // J.Comp. Psychol., 1934. V. 18, p. 385.

14. Kuznetsova G.D., Coenen A.M.L., van Luijtelaar E.L.M. In: The WagRij rat model of absence epilepsy: The Nijmagan – Moscow research. 2000, Nijmegen, NICI, p. 141.

DYNAMICS OF BEHAVIOR INDICES OF HOMOZYGOUS RATS (A_2/A_2) IN LOCUS TAG 1A DRD_2 BEFORE AND AFTER AUDIOGENIC STIMULATION

Leushkina N.F., Kalimullina L.B.
Bashkir state university, Ufa

In this work was explored behavior of homozygous WAG/Rij rats (A_2/A_2) in locus TAG 1A DRD_2 in the “open field” test before and after six séances of audiogenic stimulation which was accompanied with grand males found, that after stimulation movement and research activity are highly decreased.