

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

**АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПО СОЧЕТАНИЯМ ГЕНОТИПОВ  
ПОЛИМОРФНЫХ ДНК – ЛОКУСОВ (TAG 1A И NCOI) DRD2, 256A/G  
ГЕНА SLC6A3 И ОБЪЕМНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МИНДАЛЕВИДНОГО  
КОМПЛЕКСА МОЗГА С ПОВЫШЕННОЙ ТРЕВОЖНОСТЬЮ**

**Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В., Ханнанова А.Я.**

*Башкирский государственный университет, Уфа, e-mail mpha@ufanet.ru*

Впервые показано, что у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  по локусу TAG 1A DRD2 с повышенной тревожностью имеет место сочетание генотипов  $N_2N_2$  локуса NcoI DRD2 и AA локуса 256A/G гена SLC6A3, а также увеличение объемных характеристик базолатеральной группировки миндалевидного комплекса мозга.

**Ключевые слова:** полиморфные ДНК, локусы (TAG 1A и NcoI) DRD2, locus 256A/G SLC6A3, миндалевидный комплекс мозга, тревожность

**ANALYSIS OF ASSOCIATIONS BY THE COMBINATION OF GENOTYPES  
OF POLYMORPHIC DNA – LOCI (TAG 1A AND NCOI) DRD2, 256A / G  
GENE SLC6A3 AND VOLUME CHARACTERISTICS OF THE AMYGDALA  
WITH INCREASED ANXIETY**

**Kalimullina L.B., Akhmadeev A.V., Khannanova A.J.**

*The Bashkir state university, Ufa, e-mail mpha@ufanet.ru*

For the first time It was shown that in rats with  $A_2/A_2$  genotype at locus TAG 1A DRD2 with increased anxiety have a combination of genotypes  $N_2N_2$  NcoI DRD2 locus and the AA locus 256A / G gene SLC6A3, as well as increasing the volume characteristics of basolateral complex of amygdala.

**Keywords:** polymorphic DNA, loci (TAG 1A and NcoI) DRD2, locus 256A/G SLC6A3, amygdala, anxiety

В настоящее время «дофаминовая» гипотеза происхождения и развития тревожно-депрессивных расстройств является одной из ведущих. В связи с этим работы по изучению молекулярно-генетических механизмов, определяющих тревожно-депрессивное поведение, направлены, в основном, на изучение генов, вовлеченных в метаболизм дофамина [5].

Развитие молекулярной биологии в настоящее время позволяет выявить точечные мутации определенных генов, что находит все более широкое применение в нейробиологии тревожно-депрессивных расстройств. Один из наиболее перспективных методов – это анализ сцепленности определенных генов или полиморфных маркеров. Существует гипотеза о влиянии полиморфизмов в генах DRD2 и SLC6A3 на уровень внеклеточного дофамина либо посредством обратного захвата дофамина из синаптической щели (для переносчика дофамина), либо путем изменения тонического выброса дофамина (для ауторецепторов DRD2, [9]).

Немаловажное значение для выяснения патогенеза тревожно-депрессивных расстройств имеют исследования их структурного базиса, позволяющие выявить конкретные структуры мозга, вовлеченные в их формирование. Прогресс знаний в этом направлении в последние годы связан с использованием в диагностике методов нейровизуализации, в экспериментальных работах реализуется структурно-функциональный подход.

В ранее проведенных исследованиях поведения (открытое поле, приподнятый кре-

стообразный лабиринт) двух групп крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу TAG 1A DRD2 (далее группы  $A1A1$  и  $A2A2$ ) было показано, что крысы  $A2A2$  проявляют повышенный уровень базовой тревожности [6, 7]. Анализ содержания и метаболизма дофамина в миндалевидном комплексе мозга (МК) – ключевой структуре нейронных сетей тревожности выявил, что у крыс  $A2A2$  снижено содержание дофамина и замедлен его метаболизм. Молекулярно-генетический анализ локуса NcoI гена рецептора дофамина (DRD2), а затем и локуса 256A/G гена переносчика дофамина (SLC6A3) у крыс  $A2A2$  выявил ассоциацию каждого из этих локусов (NcoI DRD2 и 256A/G SLC6A3) с повышенной тревожностью.

**Целью** данного сообщения является изложение результатов анализа ассоциаций по сочетаниям генотипов указанных выше полиморфных локусов генов дофаминергической системы мозга в двух группах крыс линии WAG/Rij, различающихся по уровню тревожности, а также сравнительный анализ у крыс указанных групп морфометрических характеристик МК.

Все эксперименты проведены с соблюдением норм биомедицинской этики. Исследование полиморфных локусов DRD2 и SLC6A3 проведено на 90 крысах (по 45 крыс в группах), методика выделения ДНК и выявления аллельного полиморфизма описана ранее [8]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ

«Statistic for Windows 5.5», программного обеспечения MS Excel 98 (Microsoft). Для проверки соответствия эмпирического распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга использовался модифицированный критерий  $\chi^2$  (P), определяемый с помощью программы Biostat. При попарном сравнении частот генотипов в группах крыс A1A1 и A2A2 (с тревожным поведением) использовался критерий  $\chi^2$  (P) для таблиц сопряженности  $2 \times 2$  с поправкой Йетса на непрерывность. Силу ассоциаций с тревожным поведением оценивали в значениях показателя соотношения шансов (odds ratio, OR) по формуле:  $OR = (a \cdot d) / (b \cdot c)$ . При  $OR = 1$  нет ассоциации,  $OR > 1$  рассматривали как положительную ассоциацию данной формы поведения с генотипом («фактор повышенного риска») и  $OR < 1$  – как отрицательную ассоциацию («фактор пониженного риска»).

Для проведения морфометрического исследования использовано 20 крыс (по 10 особей в группе). Для измерения площади МК на фронтальных срезах мозга использовали цитоархитектонические препараты, окрашенные по Нисслю. Микрофото получали с использованием цифрового фотоаппарата Nikon CoolPix 4500. Полученные изображения экспортировали в компьютер и анализировали с помощью программы ImageJ 1.38 (USA). Вычисляли удельные площади МК и его структур в полушариях мозга. Использовали критерий  $\phi$  (фи) для обеспечения нормального распределения в получаемых вариационных рядах. Сравнение вариационных рядов проводили с помощью пакета программ «Statistica 5.5».

Результаты проведенного анализа ассоциаций по сочетаниям генотипов генов *DRD2* и *SLC6A3*, как в группе крыс A2A2, имеющих повышенный уровень тревожности, так и в группе крыс A1A1, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Частоты сочетаний генотипов полиморфного локуса *NcoI* гена *DRD2* и *256A/G* гена *SLC6A3* в группах крыс A1A1 и A2A2

Генотипы	Частоты сочетаний генотипов								
	$N_1/N_1$			$N_1/N_2$			$N_2/N_2$		
DRD2	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G
SLC6A3	0,10	0,31	0	0,26	0,03	0,15	0,05	0,05	0
A1A1	0,10	0,31	0	0,26	0,03	0,15	0,05	0,05	0
A2A2	0,12	0,12	0,03	0,32	0,09	0	0,22*	0,09	0

Примечание. \* –  $OR = 5,56$  – маркер риска по сочетаниям генотипов полиморфных локусов *DRD2* и *SLC6A3*.

Из 9 возможных сочетаний генотипов, в группе крыс A2A2 и A1A1 выявлено 8. В группе крыс A1A1 наибольшую частоту имеет сочетание генотипа  $N_1/N_1$  *DRD2* – A/G *SLC6A3* – 0,31, следующим по частоте встречаемости является сочетание  $N_1/N_2$  *DRD2* – A/A *SLC6A3* – 0,26. Сочетание генотипа  $N_1/N_2$  *DRD2* – A/G *SLC6A3* встречается с частотой – 0,03. В группе крыс A2A2 наибольшую частоту имеет генотип  $N_2/N_2$  *DRD2* – A/A *SLC6A3* – 0,22. В обеих группах отсутствует сочетание генотипов  $N_2/N_2$  – G/G.

Согласно полученным данным, сочетание генотипов  $N_2/N_2$  *DRD2* – A/A *SLC6A3* является маркером риска тревожного поведения ( $\chi^2 = 3,91$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,048$ ,  $OR = 5,56$ , 95% CI 1,17–117,07). Обращает на себя внимание, что коэффициент отношения шансов (OR) при сочетании генотипов  $N_2/N_2$  *DRD2* – A/A *SLC6A3* выше, чем для отдельно взятого генотипа риска  $N_2/N_2$  *DRD2* ( $OR = 4,29$ , 95% CI 1,17 – 17,76), так и для генотипа A/A *SLC6A3* ( $OR = 2,77$ , 95% CI 1,02 – 7,64). Таким образом, два гена при сочетании, как

бы усиливают свое влияние на риск развития тревожного поведения.

Известно, что центральное место в функциональной системе, определяющей формирование тревожности и страха, занимает МК, при этом ведущее значение среди структур МК приписывают его базолатеральной группировке [11, 12]. Этот факт указывал на необходимость проведения сравнительного морфометрического исследования МК у двух групп крыс, использованных в работе.

Проведенные исследования показали, что между двумя группами крыс (A1A1 и A2A2) не существует различий по общей удельной площади МК. Удельная площадь у крыс A1A1 равна  $20,17 \pm 0,53$ , у крыс A2A2 она составляет  $19,39 \pm 0,36$  ( $t = 1,58$ ,  $p = 0,11$ ). Однако мы обнаружили значимые различия в величине удельной площади комплекса базолатеральных ядер, удельная площадь, как в правом и левом полушариях больше у крыс A2A2. Результаты сравнения величины удельных площадей по этой структуре МК приведены в табл. 2.

**Таблица 2**

Результаты сравнения удельных площадей базолатерального комплекса МК у крыс A1A1 и A2A2

Полушарие, генотип	Левое A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	T, p	Левое A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	Правое A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	T, p	Правое A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>
Уд. площадь φ)	0,839 ± 0,021	t = 3,44, p = 0,004	0,934 ± 0,011	0,851 ± 0,025	t = 2,98, p = 0,014	0,943 ± 0,009

Данные табл. 2 показывают, что удельная площадь базолатеральной группировки у крыс A2A2 значимо больше как в правом (p = 0,014), так и в левом (p = 0,004) полушариях по сравнению с крысами A1A1.

Анализ связей латерального ядра МК [1] свидетельствует, что информация от латерального ядра широко иррадирует в интегративные центры мозга, включающие в себя как высшие висцеральные ядра (гипоталамус), так и подкорковые и корковые формации всех рангов. Эфференты базолатерального ядра следуют к различным отделам промежуточного мозга и подкорковых ядер, а также к формациям новой коры (фронтальной, агранулярной инсुлярной, височной) [10]. Каудальные две трети ядра проецируются к передней поясной коре: передняя одна треть – к моторной и префронтальной коре [13]. Эти сведения отражают широкие связи ядер базолатерального комплекса с формациями новой и старой коры, что позволяет предполагать, что увеличение удельной площади базолатерального комплекса ядер МК может отражать особенности нейронных сетей, участвующих в формировании тревожности и передаче этой информации в высшие отделы мозга.

Итак, результаты работы впервые выявили:

1) повышенная базовая тревожность, которая регистрируется у крыс линии WAG/Rij с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу TAG 1A DRD2 при исследовании поведения в условиях новизны обстановки (в тесте «открытое поле») и в приподнятом крестообразном лабиринте (наиболее признанном тесте при оценке уровня тревожности у грызунов, [3]) ассоциирована с сочетанием генотипов N<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> DRD2 – A/A SLC6A3;

2) повышенная базовая тревожность ассоциирована с увеличением площади базолатеральной группировки МК.

На роль локуса TAG 1A DRD2 в формировании тревожности у человека есть указание в работе Куликовой [5], которая исследовала ряд генетических полиморфизмов дофаминергической системы – DAT 40 bp VNTR, DRD2 Taq1A и COMT Val158Met. Также известно, что полиморфный locus NcoI находится в неравновесии по сцеплению с локусом Taq1A гена DRD2, в частности, аллель A<sub>2</sub> DRD2 локуса Taq1A сцеплен с аллелем N<sub>2</sub> DRD2 локуса NcoI, а также о наличии ассоциации гаплотипа A<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> DRD2 с повышенным нейротизмом (четрой тревожного ряда, [4]). Наши данные согласу-

ются с приведенными сведениями литературы и дополняют их, указывая на роль локуса 256A/G гена SLC6A3.

Использованные к нашей работе крысы с повышенной базовой тревожностью, имеющие гаплотип DRD2 A2N2 в сочетании с генотипом A/A локуса 256A/G гена SLC6A3, являются валидной моделью не только для дальнейшего выяснения роли молекулярно-генетических факторов в формировании тревожно-депрессивных расстройств, но и для изучения их патогенеза, а также испытания действия анксиолитических препаратов.

Выявленное в работе изменение объемных характеристик базолатеральной группировки МК при повышенной тревожности является теоретическим базисом для исследования структурных характеристик этого образования мозга на современных нейровизуализационных аппаратах с целью разработки ранних диагностических критериев риска развития психических заболеваний, т.к. хорошо известно, что тревожность является первой реакцией организма на стресс [2].

Авторы приносят благодарность заведующему отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН заслуженному деятелю науки РФ, профессору, доктору биологических наук Хуснутдиновой Э.К., с.н.с. отдела Казанцевой А.В. за консультативную помощь, а также старшему лаборанту кафедры МФЧЖ Леушкиной Н.Ф. за помощь в проведении экспериментов.

**Список литературы**

1. Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
2. Башкатова В.Г. // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8. – С. 17.
3. Дыгало Н.Н. // Успехи физиол. наук. – 2007. – Т. 38, № 1. – С. 3.
4. Казанцева А.В., Гайсина Д.А., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. // Медицинская генетика. – 2008. – №3. – С. 3.
5. Куликова М.А., Трушкин Е.В., Малюченко Н.В. // Булл. экпер. Биол. и мед. – 2008. – Т. 145, №11. – С. 674.
6. Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. // Фундам. Исследования. – 2010. – № 5. – С. 34.
7. Леушкина Н.Ф., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 10. – С. 14.
8. Леушкина Н.Ф., Ханнанова А. Я., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 5. – С. 16.
9. Brown S.L., Steinberg R.L., Van Praag H.M. // Handbook of depression and anxiety. – 1994. – P. 313.
10. Ishikawa A., Nakamura S. // J. Neurosci. – 2003. – Vol. 23, №31. – P. 9987.
11. Kang-Park M-H, Wilson W., Moore S. // Neuropharmacology. – 2004. – Vol. 46, №1. – P. 1.
12. Lanuza E., Nader K., Ledoux J. // Neuroscience. – 2004. – Vol. 125. – P. 305.
13. McDonald A. J. // J. Comp. Neurol. – 1987. – Vol. 262, №1. – P. 46.