

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНОГО ДНК – ЛОКУСА *NCOI* ГЕНА *DRD2* И УРОВНЕЙ ДОФАМИНА С ПОВЫШЕННОЙ ТРЕВОЖНОСТЬЮ

Леушкина Н.Ф., Ханнанова А. Я., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б.

Башкирский государственный университет, Уфа, e-mail: leona55@mail.ru

В работе впервые приведены сведения об ассоциации полиморфного ДНК – локуса *NcoI* гена *DRD2* и уровней дофамина с повышенной тревожностью у крыс с генотипом A_2/A_2 по локусу TAG 1A *DRD2*.

Ключевые слова: локус *NcoI* гена рецептора дофамина второго типа, катехоламины, миндалевидный комплекс мозга

ASSOCIATION OF POLYMORPHIC DNA LOCUS *NCOI* *DRD2* GENE AND DOPAMINE LEVELS INCREASED LEVEL OF ANXIETY

Leushkina N.F., Khannanova A. Ja, Akhmadeev A.V., Kalimullina L.B.

The Bashkir state university, Ufa, e-mail: leona55@mail.ru

For the first time provides information about the association of polymorphic DNA locus *NcoI* *DRD2* gene and dopamine levels increased level of anxiety in rats with genotype A_2/A_2 at locus TAG 1A *DRD2*.

Keywords: Locus *NcoI* dopamine gene receptor of the second type, catecholamines, amygdaloid complex of the brain

Несмотря на большое количество исследований, посвященных изучению тревожных расстройств в эксперименте и клинике, патогенетические механизмы возникновения и развития этих состояний остаются до сих пор во многом неясными [1]. Наличие повышенной тревожности повышает вероятность инфаркта миокарда в 2,3 раза, а внезапной смерти – в 4,5 раза [13]. Близнецовые исследования выявили, что наследуемость такой черты, как тревожность, составляет около 45% [7]. Это обосновывает правомерность поиска молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к повышенной тревожности.

На современном этапе одним из наиболее перспективных направлений при исследовании патогенетических механизмов тревожных расстройств является изучение животных, которые имеют генетические различия в характере ответа на эмоционально – стрессовые воздействия [1].

В ранее проведенных исследованиях [3,4] на основании сравнительного анализа характеристик поведения двух групп крыс линии WAG/Rij, гомозиготных (A_1/A_1 и A_2/A_2) по локусу TAG 1A гена рецептора второго типа (*DRD2*) в условиях новизны обстановки, было установлено наличие значимых межгрупповых различий. Крысы с генотипом A_1/A_1 (далее A1A1) по сравнению с крысами с генотипом A_2/A_2 (далее A2A2) проявляли большую двигательную активность и более выраженную исследовательскую деятельность. На основании этих результатов было высказано предположение, что крысы A2A2 имеют больший уровень тревожности и проявляют пассивную стратегию приспособительного поведения в от-

личие от другой группы, паттерн поведения которой может быть охарактеризован как активная стратегия поведения.

Анализ ежедневной (на протяжении всех десяти дней) динамики поведенческих реакций позволил углубить эти представления, показав, что крысы A1A1 в первые пять дней тестирования проявляли неадекватную в условиях новизны обстановки реакцию в форме гиперактивности [5]. У крыс A2A2, ни со стороны двигательной активности, ни со стороны исследовательской деятельности не отмечалось значимых изменений. Крысы во время всех посещений «открытого поля» мало передвигались, часто застывая на месте, совершая единичные стойки, количество которых в первый день эксперимента было вдвое меньше, чем у крыс A1A1. Эти данные показали, что крысы A2A2 имеют высокую базовую тревожность.

Целью данного сообщения является изложение результатов сравнительной оценки частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *NcoI* гена *DRD2* в двух группах крыс линии WAG/Rij, различающихся по уровню базовой тревожности, и сопоставление полученных результатов с содержанием дофамина (ДФ) и его метаболита 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в центре афферентного синтеза – миндалевидном комплексе мозга (МК).

Все эксперименты проведены с соблюдением норм биомедицинской этики. Исследование полиморфного локуса *NcoI* гена *DRD2* выполнено на 90 крысах (по 45 крыс в группах), содержание ДФ и ДОФУК в МК определяли, используя 70 крыс (по 35 в группе), методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для генетического анализа ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови с использованием метода Мэтью [12]. Амплификацию локуса *NcoI* DRD2 проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР) на амплификаторе «Терцик» производства г.Пушино с использованием ДНК-полимеразы *Termus aquaticus* производства фирмы «Биотекс» (Москва). Праймеры

5'-GAAACAGACGCCCAACAGGAC-3'

5'-CCAGAAACCGCGAAAGAAGAT-3'

были подобраны с помощью программы Primer3 (<http://frodo.wi.edu/primer3>) с.н.с. отдела геномики человека (зав. – проф. Э.К. Хуснутдинова) Института биохимии и генетики УНЦ РАН Казанцевой А.В. Для определения нуклеотидных замен использовали метод анализа ПЦР-ПДРФ. После денатурации (3 мин при 94°) выполняли 34 циклов амплификации по схеме: отжиг праймеров – 30 секунд при 94°, синтез ДНК 1,5 мин – при 59°, денатурация – 1 мин – при 72°, затем пробы выдерживали 5 мин – при 72°, охлаждали. Для выявления полиморфизма, 10 мкл реакционной смеси обрабатывали 3 единицами рестриктазы – *NcoI*. В результате реакции аллель N_1 локуса *NcoI* длиной 446 пар оснований оставался интактным, а N_2 подвергался ферментативному гидролизу. Длины фрагментов N_2 были равны 252 и 194 пар оснований. Результаты рестрикционного анализа оценивали при проведении электрофореза в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Содержание ДФ и ДОФУК в МК определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 M). Область МК выделяли из нативного мозга и гомогенизировали в 20 объемах холодной 0,1 М перхлорной кислоты (Sigma, USA) и 1 пг/50 мкл дигидроксibenзиламина гидробромида (ДГБА, 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. Статистическую обработку проводили в программном пакете Statistica 5,5.

Результаты оценки распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *NcoI* гена DRD2 в группах крыс линии WAG/Rij (A1A1 и A2A2), представлены в таблице.

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного маркера *NcoI* гена DRD2 крыс линии WAG/Rij (A1A1 и A2A2)

Крысы WAG/Rij	Генотипы			Аллели	
	N_1/N_1	N_1/N_2	N_2/N_2	N_1	N_2
A1A1	0,45	0,45	0,09	0,68	0,32
A2A2	0,27	0,43	0,30	0,49	0,51

В обеих группах крыс обнаружено три генотипа: N_1/N_1 , N_1/N_2 , N_2/N_2 . В группе крыс A2A2, характеризующихся повышенным уровнем тревожности, преобладает генотип N_1/N_2 (с частотой 0,43), следующим по частоте является генотип N_2/N_2 (0,30), а частота генотипа N_1/N_1 составляет 0,27. Частота встречаемости аллелей составляет 0,49 (N_1) и 0,51 (N_2). В группе крыс A1A1 генотипы имеют следующую частоту: N_1/N_1 – 0,45, N_2/N_2 – 0,45, наиболее редкий генотип N_1/N_2 – 0,09. Частота встречаемости аллелей составляет 0,68 (N_1) и 0,32 (N_2). Распределение частот генотипов и аллелей в выборках соответствует распределению Харди-Вайнберга ($p = 0,993$ для крыс A1A1 и $p = 0,602$ для крыс A2A2).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов локуса *NcoI* гена DRD2 показал статистически значимые различия между группами крыс как в распределении частот аллелей ($\chi^2 = 5,76$, $df = 1$, $p = 0,016$), так и генотипов ($\chi^2 = 6,67$, $df = 2$, $p = 0,035$). Дальнейший анализ выявил, что в группе крыс A2A2 с повышенным уровнем тревожности имеет место статистически значимое увеличение частоты генотипа N_2/N_2 ($\chi^2 = 4,66$, $df = 2$, $p = 0,031$) и аллеля N_2 ($\chi^2 = 5,76$, $df = 1$, $p = 0,016$) по сравнению с частотами аллелей и генотипов в группе крыс A1A1. Таким образом, установлено, что маркером повышенной тревожности крыс A2A2 является генотип N_2/N_2 локуса *NcoI* (OR = 4,29, 95%CI 1,17-17,76) и аллель N_2 (OR = 2,25, 95%CI 1,14-4,43).

Анализ содержания ДФ, ДОФУК в МК показал, что при почти равных количествах содержания в ткани МК ДОФУК ($p > 0,05$), содержание ДФ значительно больше у крыс A1A1 ($p < 0,01$). Соотношение ДОФУК/ДФ вдвое меньше ($0,17 \pm 0,03$ против $0,39 \pm 0,03$) у крыс A1A1, что указывает на его ускоренный метаболизм. Эти результаты показывают, что тревожность крыс A2A2 связана со сниженным содержанием ДФ и замедленным его метаболизмом в МК, который является ведущей структурой мозга в определении стратегии поведения.

Итак, результаты исследования показывают, что у крыс A2A2 пассивная стратегия поведения, обусловленная высокой базовой

тревожностью, связана с генотипом N_2/N_2 локуса *NcoI* и наличием аллеля N_2 , сниженным содержанием дофамина и замедленным его метаболизмом в ключевой структуре лимбической системы – МК. Роль МК в формировании тревожности показана различными методами в многочисленных исследованиях на человеке и животных [8, 10].

На основании полученных нами данных можно предполагать, что между двумя изученными полиморфными локусами гена *DRD2 – TAG 1A и NcoI* – существует связь, и гаплотип *DRD2 A₂/N₂* предопределяет повышенную тревожность крыс A2A2. В пользу этого суждения говорят данные Казанцевой [2], показавшей в исследованиях на людях, что у мужчин русской этнической принадлежности повышенный нейротизм (черта тревожного ряда) ассоциирован с гаплотипом *DRD2 A₂/N₂*.

В составе *DRD2* описано несколько десятков полиморфных локусов, функциональное значение которых интенсивно изучается в последние годы [14]. Показано, что минорные аллели ряда полиморфных локусов этого гена (*rs2283265* и *rs1076560*) снижают экспрессию короткой изоформы рецептора (*DRD2S*), которая располагается пресинаптически и представляет собой ауторецептор. В популяции крыс *WAG/Rij* аллель A_1 в локусе *TAG 1A* является минорным, что позволяет предполагать, что его наличие будет приводить к тому же эффекту, который показан в отношении указанных выше локусов. А это значит, что будет определяться повышенное содержание дофамина, что и выявлено нами в МК у крыс *A1A1*. Исследования проведенные на добровольцах с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии с введением (*[18F]FDOPA*), радиоактивного аналога предшественника дофамина *L-DOPA*, показали, что у носителей аллеля A_2 (с генотипом A_2/A_2) снижена активность ДОФА-декарбоксилазы, конечного фермента в синтезе дофамина [11].

Ген *DRD2* является наиболее распространенным вариантом дофаминовых ре-

цепторов. Он встречается в коре головного мозга, в среднем мозге, и особенно широко распространен в лимбической системе. От режима функционирования данных рецепторов и уровней дофамина зависит стратегия приспособительного поведения [6]. Предполагается, что в норме существует сбалансированная функциональная активность пре- и постсинаптических *DRD2* рецепторов в головном мозге. При нарушении этого баланса могут формироваться определенные особенности дофаминергической трансмиссии и возникать отклонения в адаптивном поведении [9].

Авторы приносят благодарность заведующему отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН заслуженному деятелю науки РФ, профессору, доктору биологических наук Хуснутдиновой Эльзе Камилевне за консультативную помощь.

Список литературы

1. Башкатова В.Г. // Психофармакология и биологическая наркология – 2008. – Т. 8, №1-2. – С. 17.
2. Казанцева А.В., Гайсина Д.А., Малых С.Б., Хуснутдинова Э.К. // Медицинская генетика. – 2008. – №3. – С. 3.
3. Леушкина Н.Ф., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. – 2008. – №10. – С. 18.
4. Леушкина Н.Ф., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. – 2010. – №10. – С. 14-20.
5. Леушкина Н.Ф., Ахмадеев А.В., Калимуллина Л.Б. // Успехи современного естествознания. – 2011.
6. Шаляпина В.Г. Основы нейроэндокринологии. – СПб.: Элби, 2005. – 156 с.
7. Benjamin J., Ebstein R., Belmaker H. // American Psychiatric Publishing Inc. – 2002. – P. 356.
8. Bremner J. // Expert Rev Neurother. – 2004. – Vol. 4, № 2. – P. 275.
9. Brown S.L., Steinberg R.L., Van Praag H.M. // Handbook of depression and anxiety. – 1994. – P. 313
10. Charney D. // Acta Psychiatr Scand. – 2003, Suppl. – Vol. 417. – P. 38-50.
11. Laakso A., Pohjalainen T., Bergman J. et al. // Pharmacogenet Genomics. – 2005. – Vol. 15, №6. – P. 387.
12. Mathew C.C. Methods in Molecular Biology / Ed. Walker J.M. – New York: Human Press, 1984. – Vol. 2. – P. 31.
13. Roy-Byrne P. P., Katon W. // J. Clin. Psych. – 1997. – № 58. Suppl. 3. – P. 34.
14. Zhang Y., Bertolino A., Fazio L. et al. // PNAS. – 2007. – Vol. 104, №51. – P. 20557.