

На правах рукописи

**Леушкина Наталья Федоровна**

**НЕЙРОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫС ЛИНИИ  
WAG/Rij, ИМЕЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ ГЕНОТИПА  
ПО ЛОКУСУ Taq1A *DRD2***

03.03.01 – Физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань 2014

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и зоологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Башкирского государственного университета

**Научный руководитель:**

**Ахмадеев Азат Валерьевич**  
доктор медицинских наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

**Любашина Ольга Анатольевна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кортико-висцеральной патологии Института физиологии им.И.П. Павлова РАН

**Инюшкин Алексей Николаевич**  
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет»

**Ведущее научное учреждение:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «03» марта 2015 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» [www.ksu.ru](http://www.ksu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
профессор



Т.А.Аникина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Для исследования механизмов синхронизации деятельности нейронов, составляющих ведущий нейрофизиологический феномен, в физиологии используются модели эпилепсии. Результаты этих исследований вносят вклад в фундаментальную науку, а также имеют важное научно-прикладное значение, проясняя патогенетические механизмы эпилепсии, которые на сегодняшний день остаются непознанными и представляют собой медико-социальную проблему.

Распространенность эпилепсии в Российской Федерации находится в пределах 1,9 – 5,7 на 1000 населения. Противосудорожная терапия оказывается эффективной по данным многих авторов в 60-70% наблюдений. В остальных случаях, преимущественно при неправильном подборе лекарственных препаратов, эпилептический процесс приобретает прогрессивное течение. При этом развивается фармакорезистентная форма заболевания, характеризующаяся высоким процентом инвалидизации – в 13,8-69,7% случаях (Касумов, 2011).

Значительный вклад в совершенствование лечения эпилепсии может внести фармакогенетика, достижения которой позволят индивидуализировать терапевтический подход к лечению эпилепсии, а также снизить риск возникновения побочных эффектов (Авакян и соавторы, 2010). Особенно это касается детей, страдающих абсансной эпилепсией, так как отсутствие эффекта лечения ведет к продолжению заболевания у взрослых, несет социальные и экономические проблемы, как для больного, его родственников, так и всего общества в целом.

В успешном решении указанных задач большую роль играет наличие моделей патологии мозга, которые позволяют в экспериментах на животных углубить имеющиеся представления о механизмах развития заболевания, а также осуществить проведение исследований по поиску новых лекарственных препаратов.

Крысы линии WAG/Rij являются инбредной линией с генетически детерминированной абсансной эпилепсией. Абсансы («petit mal», малый припадок) имеют высокоспецифичные поведенческие проявления, и сопровождаются определенными электрофизиологическими паттернами. Они широко используются в качестве адекватной модели для изучения механизмов генерализованной абсансной эпилепсии человека (Coenen and van Luijelaar, 2003), причины возникновения которой остаются до настоящего времени неизвестными.

Известно, что у крыс линии WAG/Rij одним из патогенетических механизмов эпилептической активности является гипофункция дофаминергической системы мозга (Kuznetsova et al., 2000). Однако механизмы формирующегося снижения активности этой системы остаются нераскрытыми. Предполагается, что дефицит дофаминергической системы у крыс линии WAG/Rij может быть предопределен изменением функционирования дофаминовых рецепторов (Кузнецова и др., 1996; Базян и др., 2001, Birioukova et al., 2005; Midzyanovskaya, 2006).

Рецепторы D2 являются наиболее распространенным типом дофаминовых рецепторов. Они представлены в коре головного мозга, в среднем мозге, и особенно широко в лимбической системе. От режима функционирования данных рецепторов и уровней дофамина (ДА) зависит стратегия приспособительного поведения (Шаляпина, 2005), которая может проявляться в двух формах – активной и пассивной.

Проведенные исследования полиморфизма Taq 1A рестрикционного локуса гена, кодирующего синтез дофаминовых рецепторов второго типа (*DRD2*) у крыс линии WAG/Rij показали наличие двух аллелей ( $A_1$  и  $A_2$ ) в этом локусе и выявили частоту представительства генотипов  $A_1/A_2$ ,  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в популяции этой линии крыс (Калимуллина и соавторы, 2005). Целенаправленное скрещивание крыс позволило получить на кафедре морфологии и физиологии человека Башкирского госуниверситета две субпопуляции гомозиготных крыс указанной линии (с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ ).

Установлена роль ряда полиморфных локусов *DRD2*, включая и Таq 1A, в патогенезе шизофрении и аддиктивных расстройств (Ахмадеев, 2010, Hallikainen et al., 2003, Lawford et al., 2005), однако, влияние этого локуса на процессы эпиптогенеза до последнего времени оставалось не исследованным. Впервые это показано в работе Федоровой (2012), выполненной на крысах линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в локусе Таq 1A *DRD2*, в которой выявлены особенности электроэнцефалографических (ЭЭГ) и структурно-количественных характеристик, регистрируемых в основном эпиптогенном очаге – первичной соматосенсорной коре. Показано, что у крыс с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Таq 1A *DRD2* в ЭЭГ первичной соматосенсорной коры регистрируются пик-волновые разряды первого типа, которые имеют большую продолжительность и частоту возникновения у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ . У крыс с генотипом  $A_2/A_2$  наряду с типичными для абсансной эпипсии пик-волновыми разрядами в первичной соматосенсорной коре выявлены атипичные разряды, а также пик-волновые разряды второго типа в затылочной области коры.

Результаты Федоровой (2012) выявили связь характеристик эпиптических разрядов на ЭЭГ с полиморфными вариантами локуса Таq 1A *DRD2*. Вопрос - существуют ли ассоциации полиморфизмов локуса Таq 1A *DRD2* с особенностями поведения этих крыс – не исследован. Необходимость его изучения продиктована тем, что характеристики поведения являются важными нейрофенотипическими показателями, дающими интегральную оценку состояния нервной системы и создающими основу для последующего нейробиологического анализа механизмов формирования выявившихся особенностей. Известно, что эпипсия является заболеванием нервной системы, которое, в большей или меньшей степени, всегда сопровождается коморбидными психическими нарушениями (Архипов и соавторы, 2001, Саркисова и соавторы, 2005).

Согласно теории функциональных систем П.К. Анохина (1968), поведенческий акт начинается со стадии афферентного синтеза, в осуществлении которого первостепенную роль играет миндалевидный комплекс мозга (МК). Он представляет собой ядерно-палеокортикальный компонент (Акмаев, Калимуллина, 1993), который осуществляет анализ полисенсорной информации поступающей из внешней и внутренней среды, и направляет ее к центрам ствола головного мозга и его высшим отделам - зрительному бугру и неокортексу (Любашина, 2001, Пруцкова, 2006, Любашина, 2008). Участвуя в системной обработке информации наряду с другими корковыми и подкорковыми структурами, МК определяет формирование адаптивного поведения.

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли МК в патогенезе эпипсии человека (Чепурнов, Чепурнова, 1981, Pitkanen et al., 2000 и др.). Принимает ли участие МК в механизмах абсансной эпипсии неизвестно. По мнению ряда ученых (van Luijtelaa, Coonen, 1989, Inoue et al., 1993, Kandel et al., 1996) лимбическая система не участвует в формировании характерной для абсанс-эпипсии пик-волновой активности, которая является основным ЭЭГ - показателем этой формы эпипсии. Другие исследователи (Tolmacheva et al., 2004, Midzyanovskaya, 2006) не исключают возможность участия структур лимбической системы в регуляции вероятности появления этой активности.

Известно, что уровень внеклеточного дофамина (ДА) определяется полиморфизмами в генах *DRD2* и переносчика дофамина - *SLC6A3*, которые влияют на синтез и тоническое выделение ДА из терминалей дофаминергических нейронов и его эвакуацию. Выяснено, что ауторецептор  $D_2$  (представляющий собой короткую изоформу рецептора -  $D2S$ ) определяет активность переносчика дофамина (Mortensen, Amara, 2003, Bertolino et al., 2009). Исходя из этого, мы решили выяснить, существует ли связь полиморфного локуса 256A/G *SLC6A3* с особенностями поведения у двух групп изучаемых нами крыс.

Известно, что путь от гена к психологическому признаку лежит через морфо - функциональный уровень, т.к. в геноме человека закодирован не «интеллект в столько-то

баллов», а такие морфо - функциональные особенности организма, которые вместе со средовыми влияниями и создают все разнообразие интеллектов, темпераментов (Равич-Щербо и др., 1999). Важно при этом и мнение ведущего физиолога, академика РАН Ю.В. Наточина (2000), который отметил, что: «Выдающиеся достижения молекулярной биологии, молекулярной генетики только тогда обретут реалии в оценке их места в природе деятельности живого существа, когда будут встроены в систему целостного организма».

Изложенное обосновывает актуальность проведенного исследования, в котором мы стремились показать особенности экспрессии двух вариантов полиморфного локуса *Taq 1A DRD2* в интегральном показателе состояния нервной системы – поведении, а также приблизиться к пониманию детерминирующих выявленные особенности поведения факторов путем анализа нейрхимических и структурно-количественных характеристик мозга.

**Цель работы** – выявление особенностей поведения у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2* и механизмов их формирования путем анализа морфо-функциональных характеристик МК и данных генотипирования полиморфного локуса гена переносчика дофамина.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. выполнить сравнительный анализ ориентировочно-исследовательского поведения крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2*;

2. оценить уровни тревожности крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2* путем сравнительного анализа показателей их поведения в приподнятом крестообразном лабиринте, в темно-светлой камере и тесте на гипонеофанию;

3. на основании сравнительного анализа морфометрических характеристик мозга и МК определить свойственные каждой группе крыс, имеющих различия генотипа локуса *Taq 1A DRD2*, особенности структурно-количественных характеристик;

4. выполнить сравнительный анализ цитологических и структурно-количественных особенностей базолатерального ядра МК у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2*;

5. выявить различия в содержании дофамина в МК и его основных (кортикомедиальной и базолатеральной) группировках структур с учетом фактора пола у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2*;

6. исследовать генетические предпосылки формирования тревожного поведения путем анализа полиморфного локуса *256A/G SLC6A3* у крыс двух изучаемых групп, различающихся уровнями тревожности.

**Научная новизна исследования.** Впервые выявлены особенности ориентировочно-исследовательского поведения крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2*, ассоциированные с генотипом указанного локуса. Впервые проведена оценка уровней тревожности у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2*, и показана ассоциация большего уровня ее экспрессии с генотипом  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2* и генотипом  $A/A$  по локусу *256 A/G SLC6A3*. Впервые выявлены различия в относительной массе мозга, величинах удельных площадей МК и его основных (кортикомедиальной и базолатеральной) группировок структур у крыс, имеющих разные генотипы по локусу *Taq 1A DRD2*. Впервые, на основе сравнительного структурно-количественного анализа базолатерального ядра МК крыс с разными генотипами по локусу *Taq 1A DRD2*, выявлены особенности представительства интернейронов, свидетельствующие о значимом увеличении их количества у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  по сравнению с крысами – носителями генотипа  $A_1/A_1$ . Впервые установлено наличие различий в содержании дофамина в МК крыс с различиями генотипа по локусу *Taq 1A DRD2*, оно значимо ниже у

крыс с генотипом  $A_2/A_2$ . Впервые на морфо-функциональном уровне охарактеризованы формирующиеся фенотипы, ассоциированные с генотипами локуса *Taq 1A DRD2*.

**Практическое и теоретическое значение работы.** Полученные в работе результаты углубляют существующие представления о роли дофаминергической системы в механизмах синхронизации биоэлектрической активности нейронов, в патогенезе эпилепсии и коморбидных психопатических осложнениях. Генетический анализ исследованного в работе локуса *DRD2* у больных с абсансной эпилепсией может объяснить особенности выявляемых поведенческих показателей, а, следовательно, и клинического течения заболевания. Результаты работы вносят вклад в развитие фармакогенетики эпилепсии, проясняя молекулярно-генетические основы патофизиологических механизмов ее генеза и создавая основу для разработки новых антиабсансных препаратов. Крысы с повышенной тревожностью, имеющие генотип  $A_2/A_2$  локусу *Taq 1A DRD2* в сочетании с генотипом  $A/A$  локуса *256A/G SLC6A3*, могут быть использованы в качестве валидной модели 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.

Полученные результаты используются на лекциях и практических занятиях общих курсов «Гистология» и «Физиология человека и животных», занятиях большого практикума, спецкурса «Нейрогистология» на кафедре физиологии человека и зоологии Башкирского государственного университета.

**Положения выносимые на защиту:**

1. Гомозиготные по разным аллелям локуса *Taq 1A DRD2* крысы линии WAG/Rij при исследовании ориентировочно-исследовательского поведения и регистрации уровней тревожности демонстрируют различные стратегии поведения. Генотип  $A_1/A_1$  локуса *Taq 1A DRD2* крыс линии WAG/Rij ассоциирован с гиперактивностью, генотип  $A_2/A_2$  – гиподинамией и тревожностью.

2. Выявленным структурно-функционально-генетическим базисом большего уровня тревожности крыс с генотипом  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1A DRD2* является сниженное содержание дофамина в базолатеральной группировке МК мозга, большая удельная площадь базолатерального ядра за счет увеличения количества интернейронов, генотип  $A/A$  по локусу *256 A/G* гена переносчика дофамина.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на Всероссийской конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), на конкурсах научных работ студентов ВУЗов РБ (Уфа, 2006, 2008), на международном научном конгрессе «В.М.Бехтерев – основоположник нейронаук, творческое наследие, история и современность» (Казань, 2007), международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2007», «Ломоносов-2008», «Ломоносов-2009», «Ломоносов-2010» (Москва, 2007, 2008, 2009, 2010), на IV и VI международном междисциплинарном конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2008, 2010), на IV и X конгрессах международной ассоциации морфологов (Бухара, Узбекистан, 2008, Ярославль, 2010), Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2010, 2011, 2014), на XXI съезде физиологического общества им. И.П.Павлова (Калуга, 2010), на XII международной научной школе-конференции «Адаптация растущего организма» (Казань, 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 29 работ, семь из которых в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы (2 главы), описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований (3 главы), обсуждения полученных результатов и выводов. Указатель литературы содержит сведения о 307 источниках, 89 из которых на русском и 218 на иностранных языках. Иллюстрации представлены 17 рисунками (из них 13 микрофотографий), цифровой материал сгруппирован в 26 таблицах.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объекты.** Исследования проведены на двух группах половозрелых крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Taq 1A *DRD2* с массой тела 250-320 г (всего 324). Для выявления закономерностей нейронной организации базолатерального ядра МК использовано 15 крыс-самцов линии Вистар. Подробно численность животных в экспериментальных группах представлена в приведенной ниже таблице.

Крысы линии WAG/Rij были получены от родительских особей, предоставленных профессором Г.Д.Кузнецовой (Институт ВНД, г. Москва) с любезного согласия проф. J.van Luijteleaer и проф. A. Coenen (Dept. of Comparative and Physiological Psychology, NICI, KUN, Nijmegen, The Netherlands). Две субпопуляции крыс линии WAG/Rij, имеющих генотипы  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Taq 1 A *DRD2*, 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 *DRD2* у крыс линии WAG/Rij был выполнен под руководством заведующего отделом геномики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН профессора Э.К. Хуснутдиновой.

К настоящему времени две популяции крыс линии WAG/Rij, имеющих генотипы  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Taq 1 A *DRD2*, прошли более 20 поколений. Всех использованных в работе крыс содержали в стандартных условиях вивария, характеризующихся постоянством комнатной температуры ( $20^0$ - $22^0$ )С и уровнем влажности. Пищу и питье животные получали ad libitum, продолжительность светового дня составляла 12-14 часов. Все процедуры с животными выполняли с соблюдением международных правил и норм (European Communities Council Directives, 1986).

**Поведенческие методики.** Ориентировочно-исследовательское поведение крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Taq 1 A *DRD2* в условиях новизны обстановки изучали в установке «открытое поле». Оно представляло собой квадратную освещенную в центре арену (лампой 40 Вт) площадью 100 см<sup>2</sup>, разделенную на 16 равных частей. Крысу в начале тестирования в открытом поле помещали в один из центральных квадратов, и наблюдали за ее поведением в течение пяти минут. Регистрировали показатели горизонтальной и вертикальной активности, определяли количество эпизодов и время, затрачиваемое крысой на груминг, пребывание в состоянии неподвижности и латентный период до пересечения первого квадрата (амбуляции). Вегетативные реакции крыс регистрировали на основании учета числа уринаций и болюсов.

Часть экспериментов (экспертные исследования в лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры ВНД МГУ проведены под руководством доцента, кандидата биол. наук Плескачевой М.Г.) была выполнена с использованием установки «большое открытое поле». Тест представлял собой круглую арену 1,5 м в диаметре с высотой стенок 0,8 м, в котором условно выделяли 2 зоны: центральную и периферическую. На высоте 2 м над центральной зоной поля была расположена лампа мощностью 40 Вт. Процедура тестирования проводилась в течение 15 минут с использованием системы автоматической регистрации траектории движения животных Noldus EthoVision 3.0 (Нидерланды). Показатели исследовательской деятельности – количество стоек, прыжков и вегетативной реакции, регистрировали вручную.

Показатели тревожности, выявившиеся у крыс при изучении их ориентировочно-исследовательского поведения, анализировали с помощью теста «приподнятый

крестообразный лабиринт» (ПКЛ). ПКЛ, использованный в работе, представлял собой установку, состоящую из двух закрытых и двух открытых лучей, расположенных друг против друга. Высота стенок закрытых рукавов лабиринта составляла 20 см. На месте пересечения открытых и закрытых рукавов лабиринта находилась открытая площадка. Лабиринт устанавливали на высоте одного метра от пола. В начале сеанса регистрации поведения крысу помещали в центр лабиринта, головой к открытому рукаву. В течение пяти минут регистрировали ряд параметров: количество посещений и время пребывания в открытых и закрытых рукавах лабиринта, количество стоек в открытом и закрытом рукаве, количество свешиваний с открытого рукава, число эпизодов и продолжительность груминга, длительность состояния неподвижности, количество болюсов и уринаций.

Экспериментальная установка теста «черно-белая камера» представляла собой прямоугольную камеру, разделенную на два смежных отсека: темный, закрытый (30×30×30 см) и ярко освещенный (2 лампы по 40 Вт) (30×30×30 см), соединенные на уровне пола через четырехугольное отверстие (10×10). Крыса могла свободно переходить из одного отсека в другой через отверстие в пластине, отделяющей темный отсек от светлого. Животное помещали на середину площадки светлого отсека, хвостом к отверстию в темный отсек. Эксперимент проводили в течение 5 минут с регистрацией параметров, характеризующих двигательную активность, исследовательскую деятельность, характеристики груминга и вегетативные компоненты.

Тест на гипонеофагию (позволяет оценить степень тревожности) проводили в незнакомой для животных комнате, в камере площадью 30×30 см., с высотой стен 50 см. Одна из вертикальных стен камеры была сделана из прозрачной пластмассы, что делало ее очень удобной для наблюдения и записи эксперимента. Камера была освещена лампой дневного света. Перед началом эксперимента, на расстоянии около 5 см от прозрачной стенки камеры оставляли кусочки незнакомой для животного пищи (зерна сладкой консервированной кукурузы). Животное помещали в камеру спиной к пище и фиксировали латентное время до взятия первого зерна, далее второго и третьего. Как только крыса съедала третий кусочек, эксперимент прекращался. Затем камера подвергалась полной чистке и подготовке к следующему этапу.

**Нейрогистологические методы.** Цитоархитектонические и цитологические характеристики структур заднего отдела МК изучены у крыс линии WAG/Rij с разными генотипами по локусу *Taq 1 A DRD2*. Головной мозг извлекали из полости черепа, фиксировали в 10% нейтральном формалине, и заливали в парафин. Готовили серии фронтальных срезов мозга толщиной 20 мкм и 10 мкм, которые окрашивали по методу Ниссля (Меркулов, 1969).

Особенности нейронной организации базолатерального ядра МК исследованы на фронтальных срезах мозга толщиной 100 мкм обработанных методом Гольджи (15 крыс самцов линии Wistar половозрелого возраста). Для этого мозг после фиксации в жидкости Мюллера и дополнительной фиксации в смеси двуххромовокислого калия и четырехоксида осмия выдерживали в 1% растворе нитрата серебра 10 суток в термостате, после чего обезвоживали в нескольких порциях этанола возрастающих концентраций, заливали в целлоидин, и готовили срезы на микротоме. Выявлявшиеся нейроны изучали с помощью микроскопа МБИ-11 (ЛОМО, Россия). Принадлежность нейронов к I или II типу по Гольджи, их подтип и класс определяли на основании классификационных признаков, разработанных Т.А.Леонтович (1978).

**Морфометрические исследования.** Морфометрические исследования заднего отдела МК и его двух основных группировок структур – кортикомедиальной и базолатеральной - выполнены на двух группах крыс линии WAG/Rij, имеющих различия генотипа локуса *Taq1A DRD2* ( $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ ), с использованием цитоархитектонических препаратов. Препараты изучали с помощью тринокулярного светового микроскопа серии MC-300 (Австрия), пользуясь объективами 10 и 40. Микрофото получали с

использованием цифрового фотоаппарата Nikon CoolPix 4500. Полученные изображения экспортировали в компьютер, и анализировали с помощью программы ImageJ 1.38 (USA).

Таблица 1. Объекты, методы, методики и количество использованных крыс.

Объекты	Методы	Методики	количество $A_1/A_1+A_2/A_2=$
Крысы линии WAG/Rij с генотипом $A_1/A_1$ по локусу Taq 1 A <i>DRD2</i> Всего 162	Поведенческие	Квадратное открытое поле (ОП)	$66(33\♂+33\♀)+66(33\♂+33\♀)=132$
		Круглое (большое) ОП	$6\♂+6\♂=12$ МГУ
		Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ)	$66(33\♂+33\♀)+66(33\♂+33\♀)=132$
		Гипонеофагия	$6\♂+6\♂=12$ МГУ
		Черно-белая камера	$6\♂+6\♂=12$ МГУ
Крысы линии WAG/Rij с генотипом $A_2/A_2$ по локусу Taq 1 A <i>DRD2</i> Всего 162	Нейро гистологические	Цитоархитектоника (Метод Ниссля)	$10(5\♂+5\♀)+10(5\♂+5\♀)=20$
		Морфометрия (Метод Ниссля)	$10(5\♂+5\♀)+10(5\♂+5\♀)=20$
		Нейронная организация (Метод Гольджи)	$15\♂$
Крысы линии Вистар 15	ВЭЖХ	Определение содержания дофамина	$40(20\♂+20\♀)+40(20\♂+20\♀)=80$
		Молекулярно - генетические	Генотипирование локуса 256 A/G гена переносчика дофамина SLC6A3
Всего 339			

Подсчет количества нейронов крупного и малого размера, содержащих ядрышки, в базолатеральном ядре МК проводили в поле зрения микроскопа МБИ-11 (ЛОМО, Россия) при увеличении в 600 раз (объектив 40, окуляр 15), площадь поля зрения при этом составляла 0,035 мм<sup>2</sup>.

Для определения относительной массы мозга крыс линии WAG/Rij, имеющих различия генотипа по изучаемому локусу, использованы данные, полученные при измерениях массы тела и мозга 224 крыс [112 крыс (равное количество самцов и самок) в каждой группе].

**Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).** При помощи ВЭЖХ определяли содержание дофамина в МК, его заднем отделе, в составе кортикотомедальной и базолатеральной группировок у двух изучаемых групп крыс линии WAG/Rij, имеющих разные генотипы. Материал для исследования брали от 3-4 крыс, умерщвленных передозировкой эфирного наркоза. После декапитации извлекали из черепа головной мозг, и с помощью специальных устройств из нативного мозга на льду

выделяли МК (патент на изобретение РФ № № 1679246 от 28 апреля 1994 года) и отдельно кортикомедиальную и базолатеральную группировки (патент РФ на изобретение № 2438193 от 27 декабря 2011). Образцы, взятые из правого и левого полушария у крыс, взвешивали (в среднем, вес навески был 25-30 мг) и анализировали в одной пробе.

Очищенные супернатанты анализировали на ВЭЖХ (Аквилон, Россия) со спектрофотометрическим детектором (UVV-104 M) в ЦКП БашГУ. Детектирование проводилось при длине волны 215 нм. Анализируемый образец вводился в петлю объемом 50 мкл, и соединения идентифицировались по времени выхода пиков стандартных веществ. Количественно содержание дофамина определяли на основании зависимости площади пика соединения от концентрации стандартного образца.

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  $p < 0,05$ .

**Молекулярно-генетические исследования.** Анализ ассоциаций полиморфного локуса 256A/G гена *SLC6A3* с тревожным поведением у крыс линии WAG/Rij выполнен с использованием банка ДНК, созданного на кафедре МФЧЖ БашГУ. Анализ полиморфного локуса проведен с использованием ДНК 80 крыс (40 крыс с генотипом  $A_1/A_1$ , 40 крыс с генотипом  $A_2/A_2$ ) в совместных исследованиях с магистром А. Я. Ханнановой под руководством с.н.с. отдела геномики человека ИБГ Уфимского центра РАН А.В.Казанцевой (зав. отделом геномики человека – проф. Э. К. Хуснутдинова).

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Для определения нуклеотидных замен использовали метод анализа ПЦР-ПДРФ. Праймеры

5'-AGC AAA GCC GAT GAC TGA TAG CAG GAA TC-3'

5'-ATT TTC TTG CTC CAG GTC TCC CGC TCT GA-3'

были подобраны с помощью программы Primer3 (<http://frodo.wi.edu/primer3>).

Длины фрагментов были равны 180 и 32 пар оснований. Результаты рестрикционного анализа оценивали при проведении электрофореза в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием видеосистемы «Geldokulant» (Франция).

Статистическая обработка молекулярно-генетических данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 5.0» (StatSoft), 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 (Roff et al., 1989).

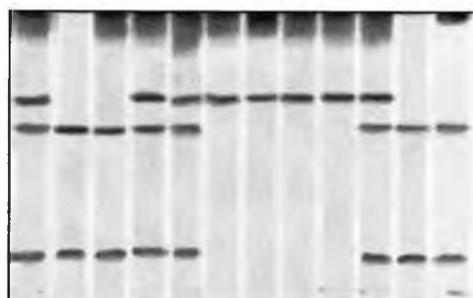


Рис.1. Электрофореграмма, демонстрирующая генотипирование полиморфного локуса 256A/G *SLC6A3*.

A/G G/G A/A

При попарном сравнении частот генотипов и аллелей в группах крыс (с проявлением тревожности и без нее) использовался критерий  $\chi^2$  (P) для таблиц сопряженности 2x2 с поправкой Йетса на непрерывность. Силу ассоциаций с риском возникновения тревожного поведения оценивали в значениях показателя соотношения

шансов (odds ratio, OR) по формуле:  $OR=(a*d)/(b*c)$ . Доверительный интервал для относительного риска рассчитывали с помощью программы: <http://www.biometrika.tomsk.ru:8100/lib/freq.htm>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

**1. Результаты исследования поведения крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в установке «открытое поле» (ОП).** Они показали, что популяция крыс (самцы+самки) с генотипом  $A_1/A_1$   $DRD_2$  характеризуется большей двигательной активностью ( $p<0,001$ ), более интенсивной исследовательской деятельностью ( $p<0,001$ ), большим количеством эпизодов и длительностью груминга ( $p<0,001$ ,  $p<0,01$  соответственно), меньшей выраженностью иммобилизации ( $p<0,01$ ) и незначительным числом уринаций ( $p<0,01$ ) по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$  (Рис.2).

Эти данные свидетельствуют, что между двумя группами крыс существуют значимые различия по всем изученным параметрам, регистрируемым в ОП. Крысы с генотипом  $A_1/A_1$   $DRD_2$ , активно перемещающиеся и интенсивно исследующие новую среду, демонстрируют активную, а крысы с генотипом  $A_2/A_2$   $DRD_2$ , для которых характерна гиподинамия, частые периоды иммобилизации и низкая исследовательская деятельность - пассивную стратегию поведения.

Поскольку дофамин служит важнейшим медиатором в структурах мозга, участвующих в организации ориентировочно-исследовательского поведения (Ventura et al., 2002), среди которых ведущее место занимает миндалевидный комплекс (МК) – было решено определить каково содержание дофамина (ДА) в МК у двух популяций изучаемых нами крыс. Его результаты показали, что в МК крыс с генотипом  $A_1/A_1$  на 75% ( $p<0,05$ ) больше ДА по сравнению с крысами, имеющими генотип  $A_2/A_2$ . Это подтвердило мнение нейрофизиологов о том, что ДА причастен к активному типу поведения (Шалапина, 2005).

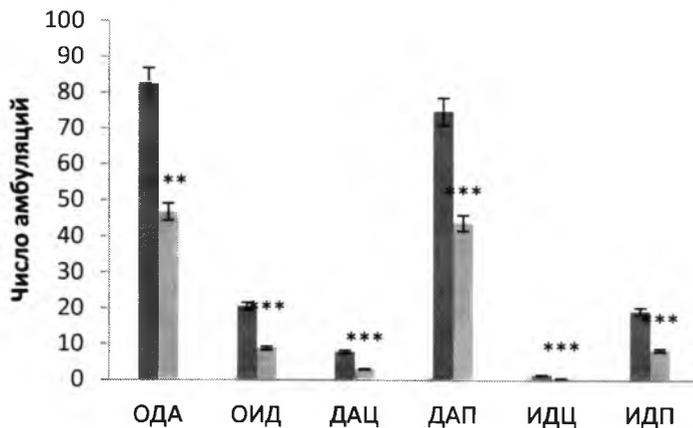


Рис. 2. Показатели поведения крыс с генотипом  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в ОП: ОДА - общая двигательная активность, ОИД - общая исследовательская деятельность, ДАЦ - двигательная активность в центре, ДАП - двигательная активность на периферии, ИДЦ - исследовательская деятельность в центре, ИДП - исследовательская деятельность на периферии

Полученные данные подтверждены результатами экспертных исследований, проведенных в лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры ВНД МГУ с использованием установки «большое открытое поле» и системы автоматической регистрации траектории Noldus EthoVision 3.0 (Нидерланды). Они показали, что средняя скорость перемещения крыс с разными генотипами ( $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ ) значительно различается ( $p<0,001$ ) и составляет у крыс с генотипом  $A_1/A_1$   $17,17\pm 0,63$  см/сек, а у крыс с генотипом  $A_2/A_2$   $11,88\pm 0,76$  см/сек. Длина пройденного пути при этом у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  равна  $15119,6\pm 720,85$  см, у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  составляет  $10692,98\pm 681,89$  см ( $p<0,01$ ). Записи траектории движения на рис.3 отражают интенсивность перемещений крыс с разными генотипами, которая выше по периферии открытого поля.

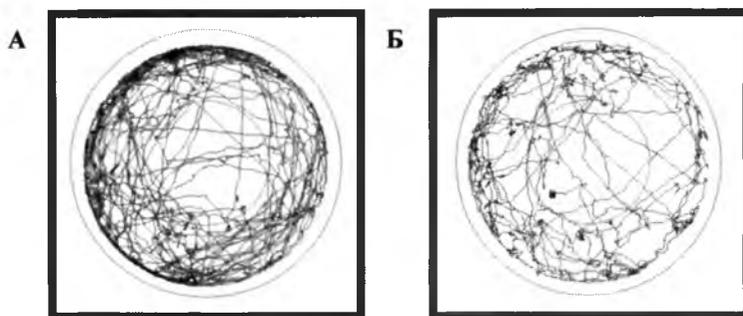


Рис. 3. Траектория движения крыс с генотипом  $A_1/A_1$  (А) и  $A_2/A_2$  (Б) в тесте «круглое открытое поле».

Подтверждены данные о гиподинамии и выраженной иммобилизации крыс с генотипом  $A_2/A_2$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ . Длительность неподвижности оказалась в четыре раза выше у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  -  $3,28 \pm 1,36$  с по сравнению с периодом, равным  $0,71 \pm 0,25$  с, отмеченным у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  ( $p < 0,05$ ).

Обнаруженные различия хорошо объяснимы на основании результатов исследований по молекулярной генетике. Показано, что аллель  $A_1$  локуса Taq 1 A *DRD2* находится в неравновесии по сцеплению ( $D' = 0,855$ ) с минорными аллелями (Т) двух фланкирующих 6 экзон интронных локусов (rs 2283265 и rs 1076560) этого гена, снижающими экспрессию короткой изоформы рецептора (D2S). Приведенные данные (Zhang et al., 2007) подтверждены и Jocham et al. (2009), показавшими наличие неравновесия по сцеплению между локусами rs 1800497 и rs 2283265 ( $D' = 0,78$ ). Так как *DRD2* у крысы на 95% гомологичен с этим геном человека (Jonathan, Sagvolden, 2005), можно полагать, что выявленная закономерность имеет место и у крыс. Известно, что снижение экспрессии D2S и изменение в силу этого соотношения длинной и короткой изоформ приводит к повышению синтеза и выделения ДА, что предопределяет повышение его содержания в тканях мозга (Usiello et al., 2000, Bertolino et al., 2009 и др.).

Выяснено, что D2S локализуется пресинаптически и представляет собой ауторецептор, в то время как длинная изоформа (D2L) преимущественно располагается на постсинаптическом компоненте (Usiello et al., 2000, De Mei et al., 2009). Активация D2S нарушает синтез и выделение ДА, ограничивая эти процессы, и приводит к снижению двигательной активности, в то время как активация D2L повышает локомоторную активность (Beaulieu, Gainetdinov, 2011).

Приведенные сведения 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 ДА из пресинаптической терминали дофаминергического синапса, проявлением чего является гиперактивность. У крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , исходя из выявленных нами особенностей 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. (2000), которые исследовали поведение *D2L*<sup>-/-</sup> мышей. Авторы показали, что *D2L*<sup>-/-</sup> мыши (у которых сохранялась экспрессия только D2S, и она была повышена) по сравнению с контролем демонстрировали в установке ОП снижение двигательной активности и исследовательской деятельности. Данные, тождественные Wang et al. (2000) получены и другими авторами на *D2L*<sup>-/-</sup> мышах (Hranilovic et al., 2008, Colelli et al., 2010, Naughton et al., 2011, Bulwa et al., 2011).

Полученные результаты выявили ассоциацию генотипа  $A_1/A_1$  по локусу Taq 1 A *DRD2* с гиперактивностью в ОП и с повышенным содержанием ДА в мозге экспериментальных животных, в то время как генотип  $A_2/A_2$  по этому локусу проявлял себя противоположными характеристиками – меньшей двигательной активностью и менее интенсивной исследовательской деятельностью.

Исследование половых различий в поведении крыс линии WAG/Rij, различающихся генотипом по локусу Taq 1 A *DRD2*, показало, что самки крыс с

генотипом  $A_1/A_1$  по указанному локусу *DRD2* по сравнению с самцами обладают большей двигательной и исследовательской активностью ( $p < 0,001$ ), показывают более интенсивный груминг ( $p < 0,001$ ) при отсутствии различий в иммобилизации и выраженности вегетативных компонентов. У крыс с генотипом  $A_2/A_2$  половые различия отсутствуют по общей двигательной активности и исследовательской деятельности в центре поля, длительности иммобилизации и количеству эпизодов груминга, количеству уринаций и боллюсов, но проявляются более интенсивной исследовательской деятельностью на периферии поля ( $p < 0,01$ ) и большей длительностью груминга ( $p < 0,05$ ) у самок крыс. Основные компоненты поведения в тесте «открытое поле» у самок и самцов двух изучаемых популяций представлены на рисунке 4.

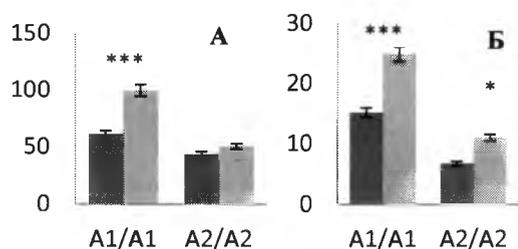


Рис.4. Особенности поведения в ОП у самцов (черный столбик) и самок (серый столбик) двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу *Taq 1 A DRD2*: А - общая двигательная активность; Б - общая исследовательская деятельность

Анализ содержания ДА у самцов и самок в МК выявил, что оно выше у самок крыс [с генотипом  $A_1/A_1$  на 23%] и [с генотипом  $A_2/A_2$  на 44%], это согласуется с обнаруженными особенностями поведения.

Выявленные половые различия, характеризующие большую активность самок крыс в условиях новизны обстановки, согласуются с имеющимися в литературе данными по крысам линии Вистар (Ордян, 2005, Cabrera et al., 2002, Frye et al., 2000, 2006), которые объясняет этот феномен меньшей выраженностью у них тревожности. Известно, что у самок крыс низкий уровень тревожности связан с высоким уровнем прогестерона в периферической крови (Galeeva, Tuochimaa, 2001), а также с экспрессией эстрогенного рецептора типа бета ( $ER\beta$ ), активация которого происходит на фоне повышенных уровней  $17\beta$  эстрадиола и прогестерона (Isgor et al., 2002, Guerra-Araiza et al., 2003).

При анализе ориентировочно-исследовательского поведения выявлены ассоциированные как с генотипом, а так и с фактором пола особенности груминга. Длительность груминга и количество его эпизодов больше у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$ , и у самок по сравнению с самцами в обеих группах изучаемых крыс. Эти данные свидетельствуют о том, что функционирование *D2*, который причастен к его формированию (Лепехина, 2001, Lepekhina, Tsitsuri, 2009), имеет особенности, связанные с генотипом локуса *Taq 1 A DRD2*. Это согласуется с данными литературы, указывающими на чувствительность характеристик груминга к дофаминергическим дисфункциям (Berridge et al., 2005, Matell, 2006).

2. **Результаты сравнительного анализа уровней тревожности крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$**  показали, что для поведения крыс (самцы+самки) с генотипом  $A_2/A_2$  характерны признаки тревожности, которые проявляются предпочтением закрытого рукава (ЗР) лабиринта (по критерию времени, проведенном в нем,  $p < 0,001$ ), меньшей интенсивностью исследовательской деятельности в обоих рукавах лабиринта ( $p < 0,001$ ) и меньшим числом свешиваний с открытого рукава (ОР) по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$  ( $p < 0,001$ ). У крыс с генотипом  $A_1/A_1$  количество посещений и время пребывания в ОР и ЗР лабиринта не различаются, а равное время, затрачиваемое крысами на одно посещение каждого из рукавов, указывает на стереотипный (челночный) характер их перемещений (Рис.5).

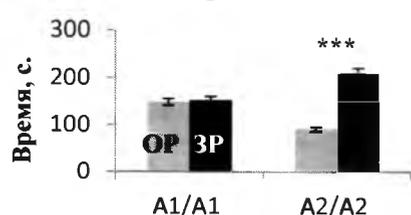


Рис. 5. Время пребывания в открытом (ОР) и закрытом (ЗР) рукавах приподнятого крестообразного лабиринта крыс с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ :

Исследование поведения крыс с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в установке «черно-белая камера», выполненное только на самцах крыс, выявило достоверные различия по двум параметрам. Латентное время до старта было в два раза выше ( $p < 0,001$ ) у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$ . Значимые различия ( $p < 0,05$ ) выявлены также по количеству выглядываний из темного отсека, который значимо больше у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ . Можно предполагать, что это говорит о большей комфортности темного отсека по сравнению со светлым для крыс с генотипом  $A_2/A_2$ . Вегетативный компонент в поведении крыс практически отсутствовал.

При проведении теста на гипонеофагию было отмечено, что крысы с генотипом  $A_1/A_1$  в 2 раза быстрее подходят и берут в лапы первый кусочек пищи, чем крысы с генотипом  $A_2/A_2$ , ( $p < 0,01$ ), быстро поедая все остальные. Общая длительность эксперимента была небольшой, и составила в среднем  $3,18 \pm 0,69$  мин. Для крыс с генотипом  $A_2/A_2$  она оказалась равной  $7,86 \pm 1,14$  мин. ( $p < 0,01$ ). Столь явные различия по общему времени эксперимента связаны с тем, что крысы с генотипом  $A_2/A_2$  не проявляли интереса к новой пище, демонстрируя в большей степени ориентировочно-исследовательскую реакцию. Результаты показали, что крысы с генотипом  $A_2/A_2$  проявляют большую степень тревожности по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ .

Изучение половых различий поведения в ПКЛ крыс с генотипом  $A_1/A_1$  выявило меньший уровень тревожности у самок. Это нашло отражение в том, что самки по сравнению с самцами этой группы, чаще посещали ОР ( $p < 0,001$ ). При этом время, проведенное ими в ЗР меньше ( $p < 0,05$ ), чем в ОР ( $p < 0,01$ ) по сравнению с самцами. Время иммобилизации у самцов в ЗР превышало аналогичный показатель у самок в десять раз, что является показателем (в совокупности с другими) наличия у них большего уровня тревожности. У крыс с генотипом  $A_2/A_2$  половые различия ни по одному регистрируемому параметру в ПКЛ не выявлялись (Рис.6).

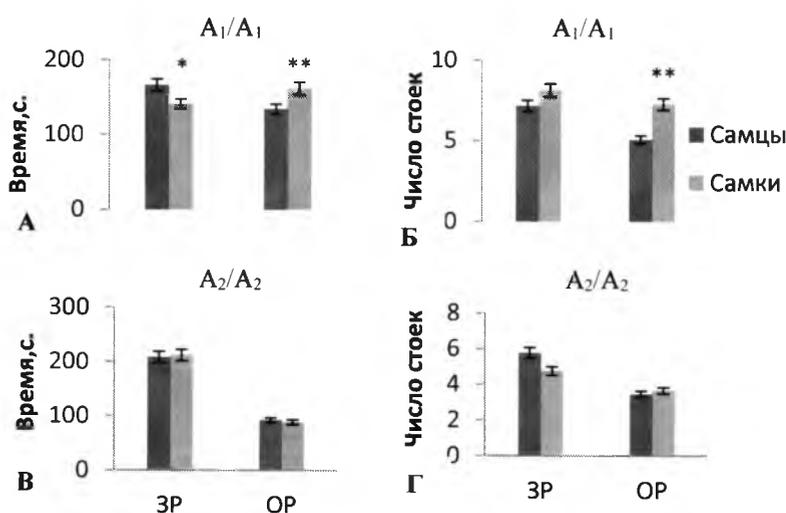


Рис.6. Показатели поведения самцов и самок крыс в ПКЛ: А - длительность пребывания в ОР и ЗР лабиринта самцов и самок крыс с генотипом  $A_1/A_1$  (с); Б - число стоек в ОР и ЗР лабиринта у самцов и самок крыс с генотипом  $A_1/A_1$ ; В - длительность пребывания в ОР и ЗР лабиринта самцов и самок крыс с генотипом  $A_2/A_2$  (с); Г - число стоек в ОР и ЗР лабиринта у самцов и самок крыс с генотипом  $A_2/A_2$ .

Итак, самцы и самки с генотипом  $A_2/A_2$  показывают однонаправленные сдвиги в поведении, свидетельствующие о высоком уровне тревожности в отличие от самцов и самок с генотипом  $A_1/A_1$ . Это объясняет тот факт, что при сравнении показателей поведения в ПКЛ самцов и самок с генотипом  $A_2/A_2$  статистически значимые различия не выявлены и свидетельствует о том, что и самцам, и самкам крыс с генотипом  $A_2/A_2$  присуща тревожность.

**3. Морфометрическая характеристика МК и относительная масса головного мозга у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ .** Различия в поведении двух групп крыс линии WAG/Rij указали на необходимость анализа структурно-количественных характеристик МК как ведущего центра мозга в организации поведенческих реакций животных.

Проведенный цитоархитектонический анализ заднего отдела у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$ , и сравнение полученных данных с крысами линии

Вистар, показал, что по общей структурной организации отклонений у крыс с разными генотипами по локусу Таq 1 A *DRD2* между собой и с крысами линии Вистар не существует. В составе заднего отдела есть все ядерные центры, формации палеокортекса, а также присутствует межзубчатая формация – заднее кортикальное ядро.

Структурно-количественный анализ выявил, что удельная площадь МК у крыс линии WAG/Rij с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  по локусу Таq 1A *DRD2* не различается. Сравнение удельных площадей двух основных группировок структур МК – кортикомедиальной и базолатеральной - у крыс с разными генотипами выявило, что существуют высоко значимые различия по величине удельной площади базолатеральной группировки.

Не связана ли большая площадь базолатеральной группировки у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  с большей массой у них мозга? Для ответа на этот вопрос мы провели сравнительный анализ величин массы тела и головного мозга, а также рассчитали относительную массу мозга (ОММ – масса мозга в мг разделена на массу тела г) у двух изучаемых нами групп крыс с разными генотипами (табл.№2). Его результаты показали, что масса тела крыс с генотипом  $A_1/A_1$  значимо больше ( $p<0,001$ ), чем у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , в то время как масса головного мозга и ОММ больше у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  ( $p<0,001$ ), чем у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ . Таким образом, крысы с генотипом  $A_2/A_2$  имеют большую массу мозга и ОММ, чем у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ , что коррелирует с наличием большей площади базолатеральной группировки МК.

Таблица № 2. Удельная площадь МК, группировок ее структур и показатели массы тела, головного мозга и относительной массы мозга (ОММ) у крыс с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  (M+m, проценты).

Генотип	$A_1/A_1$		$A_2/A_2$			
МК	20,47±0,85		19,86±0,51			
Отделы МК	кортико - медиальный	базо - латеральный	кортико - медиальный	базо - латеральный		
	15,85±1,83	18,81±0,81	16,32±1,87	21,98±0,48***		
Показатели	Масса тела (г)		Масса мозга (мг)		ОММ	
Генотип	$A_1/A_1$	$A_2/A_2$	$A_1/A_1$	$A_2/A_2$	$A_1/A_1$	$A_2/A_2$
Общая популяция	286,20 +3,05	262,56 +4,93	1787,39 +17,14	1905,70 +14,46	6,28 +0,05	7,50 +0,13
T, p	5,04, $p<0,001$		6,03, $p<0,001$		9,07, $p<0,001$	

Примечание: \*\*\* $p<0,001$  при сравнении базо-латеральной группировки МК у крыс с разными генотипами

**4. Результаты анализа цитоархитектоники и нейронной организации базолатерального ядра МК.** Установлено, что МК, и, прежде всего, его базолатеральное ядро (БЛ) является структурой, вовлеченной в функциональную систему формирования тревожности и страха (LeDoux, 2003, Toufexis, 2007, Lee et al., 2013). Ведущее значение при этом имеет дофаминергическая система, реализующая свое влияние через D1- и D2 рецепторы (de la Mora MP et al., 2010, Anushka et al., 2013 и др.).

В составе БЛ на цитоархитектонических препаратах, как у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ , так и  $A_2/A_2$ , выявлены нейроны крупного (20 мкм x 16 мкм) и малого (10 мкм и 14 мкм) размеров. Крупные нейроны обладают полигональной формой перикариона, широкая прослойка цитоплазма содержит глыбки и зерна базофильной субстанции, ядро крупное, светлое, с хорошо определяющимся ядрышком. Нейроны малого размера обладают округло-овальной или угловатой формой перикариона, имеют светлое ядро и небольшие прослойки цитоплазмы с пылевидной базофильной субстанцией. Около некоторых крупных нейронов можно видеть два – три нейрона малого размера.

Сравнительный анализ цитоархитектоники и цитологических особенностей нейронов БЛ у крыс WAG/Rij с разными генотипами позволил выявить определенные

особенности: 1. у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  крупные нейроны в идентичных условиях окраски препаратов воспринимают краситель менее интенсивно. Если крупные нейроны по тинкториальным свойствам у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  можно определить как хромонеутральные и умеренно хромофильные нейроны, то у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  они имеют характеристики умеренно хромофобных нейронов. Содержание базофильной субстанции, носящей характер мелких зерен и отдельных глыбок, снижено как в перикарионе нейронов, так и в начальных сегментах крупных дендритов, отхождение которых от тела нейрона хорошо определяется в препаратах; 2. у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  обращает на себя меньшая плотность расположения крупных нейронов и формируемых ими группировок, 3. малоклеточные зоны (нейропилы), разделяющие крупные нейроны, шире у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ ; 4. у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  нейроны малого размера встречаются в поле зрения микроскопа чаще, при этом они формируют группы около крупных нейронов, их количество представляется большим, чем у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ ; 5. среди нейронов малого размера у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  чаще встречаются гиперхромофильные и гиперхромофобные нейроны, что является показателем различий в их функциональном состоянии.

Изучение нейронной организации БЛ у крыс линии Вистар, проведенное с целью выявить эквиваленты нейронов крупного и малого размеров, показало, что крупные нейроны являются длинноаксонными густоветвистыми нейронами древовидного типа, которые по своему строению имеют пирамидообразную форму перикариона. Нейроны малых размеров, входящие в состав БЛ, носят характер короткоаксонных нейронов, имеющих обильное ветвление терминалей аксона на территории, прилежащей к телу нейрона. По характеру строения дендритов, опираясь на классификацию Леонтович (1976), они могут быть отнесены к гладкодendrитным, лохматым и нейронам с шипиками.

Таким образом, изучение нейронной организации этого ядра методом Гольджи позволило показать, что нейроны крупных размеров являются длинноаксонными густоветвистыми нейронами подкоркового типа, в то время как нейроны малого размера представляют собой короткоаксонные нейроны (которые обычно именуют интернейронами).

Подсчет количества нейронов крупного размера у крыс с разными генотипами обнаружил, что их больше у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  ( $p < 0,05$ ), что, вероятно, следует объяснить их более плотным расположением на меньшей площади этого ядра у данной группы крыс. Подсчет количества нейронов малого размера выявил более выраженные различия ( $p < 0,01$ ), а вычисление процентного соотношения нейронов крупного и малого размера показало, что у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  процент нейронов малого размера составляет  $14,10 \pm 0,79\%$ , в то время как у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  их больше -  $18,70 \pm 0,45\%$  ( $p < 0,01$ ).

Полученные результаты позволили объяснить большую удельную площадь БЛ у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  наличием у них большего количества интернейронов по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ . Возможно, в этом ядре у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  есть вероятность присутствия мощных волокнистых трактов, о чем свидетельствует расширение межнейрональных пространств.

Согласно данным литературы у крыс линии Вистар количество интернейронов в БЛ МК составляет 20 процентов от общего количества нейронов этого ядра (Caitlin et al., 2012). По нашим данным у крыс линии WAG/Rij содержание интернейронов снижено, при этом более значительно у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ . Эти данные согласуются с результатами исследований Федоровой (2012), которая показала, что в эпилептогенном очаге соматосенсорной коры крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_1/A_1$  количество интернейронов меньше, чем у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  и Вистар ( $A_1/A_1 - 4,91 \pm 0,62$ ;  $A_2/A_2 - 8,00 \pm 1,42$ ; Вистар -  $14,36 \pm 1,63$ ). Обнаруженный факт позволил автору объяснить большее количество и продолжительность пик-волновых разрядов, регистрируемых в

соматосенсорной коре у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$ .

Данные об увеличении удельной площади БЛ у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , проявляющих повышенный уровень тревожности, согласуются с данными литературы об увеличении объема МК у больных с рефракторными формами депрессии (Tendolkaret al., 2013, Vassilopoulou et al., 2013). Уместно отметить, что формирование страха условными аверсивными стимулами сопровождается снижением содержания ГАМК в базолатеральном ядре МК (Stork et al., 2002), снижением активности синтезирующих ГАМК энзимов (Heldt and Ressler, 2002), а также перестройками, происходящими во взаимоотношениях интернейронов (Szinyei et al., 2007).

В функциональной системе тревожности и страха БЛ МК совместно с другими ее структурами, вовлеченными в эту систему (вставочные массы, центральное ядро и другие), рассматривается как базисный элемент формируемых в системе ингибирующих кругов (Anushka et al., 2013) и процессов синхронизации (Popescu и Pare, 2011, Bienvenu et al., 2012).

**5. Результаты анализа содержания дофамина в ткани МК и группировках его структур.** Выявлено значимо большее его содержание у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ . Кроме различий в содержании дофамина в МК, выявлены особенности дофаминергической иннервации в кортико-медиальной и базолатеральной группировках. У крыс с генотипом  $A_2/A_2$  нет различий в содержании ДА между кортико-медиальной и базолатеральной группировками при наличии таковой у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ . Это может отражать изменение взаимосвязей между этими группировками.

Известно, что кортикомедиальная группировка представляет собой филогенетически древнюю часть МК, и представляет субстрат палеоамигдалы (Ахмадеев, Калимуллина, 2004), в то время как базолатеральная формируется в историческом развитии организмов позднее, и может быть обозначена как неоамигдала. Между указанными группировками существуют тесные функциональные связи, при этом кортикомедиальная оказывает стимулирующее на базолатеральную, а базолатеральная, наоборот, ингибирующее влияние на кортикомедиальную группировку структур МК (Чепурнов, Чепурнова, 1981, 1985). Поскольку дофаминергическая система способна оказывать модулирующее влияние на глутамат- и ГАМК – ергические системы, которые широко представлены в МК, наличие различий в содержании ДА или отсутствие, несомненно, скажется на взаимоотношениях указанных отделов МК, что проявится и в поведении. Возможно, изменение функциональных связей кортикомедиальной и базолатеральной группировки представляет один из факторов, определяющих формирование различий в поведении изучаемых нами двух групп крыс.

Как у самцов, так и у самок крыс с генотипом  $A_2/A_2$  снижено содержание ДА в обеих группировках структур МК по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ . Сравнение содержания ДА в базолатеральной группировке у крыс с разными генотипами выявило, что у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  его содержание значимо меньше, чем у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  ( $p < 0,05$ ).

Дофамин, поступающий в БЛ МК по мезолимбической системе, модулирует активность проекционных нейронов этого ядра через D2 рецепторы на интернейронах, которые являются ГАМК-ергическими (Pinard et al., 2008, Mascagni et al., 2009, Spampinato et al., 2011). Интернейроны формируют симметричные (тормозные) синапсы на телах проекционных нейронов (Muller et al., 2006). Глутамергические входы к интернейронам БЛ, исходящие, в основном, из областей новой коры, формирует возбуждающие синапсы на интернейронах (Spampinato et al., 2011), в результате чего выделение ГАМК из интернейронов увеличивается, и через этот механизм реализуется корой тормозный контроль функционального состояния БЛ.

Согласно имеющимся в литературе сведениям (Chu et al., 2012) ДА оказывает свое влияние на нейроны БЛ путем активации пресинаптического D2 рецептора на

интернейронах, вызывая снижение выделения ГАМК. Следствием этого является ослабление тормозного влияния интернейронов на проекционные нейроны. Проекционные нейроны БЛ ядра являются глутаматергическими (Woodruff, Sah, 2007), поэтому их растормаживание приводит к возбуждающему действию на кору.

У крыс с генотипом  $A_1/A_1$ , по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$ , в силу меньшего количества интернейронов в БЛ ядре тормозное влияние интернейронов на проекционные нейроны этого ядра будет ослаблено. Обильный глутаматергический выход из этого ядра на области неокортекса, с которыми ядро имеет связи, предопределяет возбуждающий эффект. Высказанная версия согласуется с большим количеством и продолжительностью пик-волновых разрядов, которые регистрируются у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_2/A_2$  (Калимуллина и соавторы, 2012). Глутаматергическая трансмиссия в БЛ, вероятно, может быть усилена, т.к. ингибирующее влияние ДА на этот процесс опосредуется только D2S при условии ее повышенной экспрессии (Centonze et al., 2004).

У крыс генотипом  $A_2/A_2$ , опираясь на полученные нами данные можно говорить, что тормозное влияние ГАМК на проекционные нейроны более выражено по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ , в силу чего глутаматергический вход из БЛ ядра в кору ослаблен. Это предположение хорошо объясняет особенность пик-волновых разрядов в соматосенсорной коре у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , для которых характерна меньшая продолжительность и количество а также наличие атипичных форм разрядов (Федорова, 2012).

Результаты изучения поведения крыс с разными генотипами по локусу Taq 1A *DRD2* указывают на больший уровень тревожности крыс с генотипом  $A_2/A_2$  по сравнению с крысами с генотипом  $A_1/A_1$ , при этом выявлен низкий уровень содержания дофамина. Это согласуется с указанием, что при депрессивно-тревожных расстройствах содержание дофамина в структурах мозга и МК снижено (Гуревич, 2002, Саркисова, 2011).

#### **6. Результаты анализа полиморфного локуса 256A/G гена переносчика дофамина *SLC6A3***

На роль локуса Taq 1A *DRD2* в формировании тревожности у человека есть указание в работе Куликовой (2008), которая исследовала ряд генетических полиморфизмов дофаминергической системы. Также известно, что аллель  $A_2$  локуса Taq1A *DRD2* сцеплен с аллелем  $N_2$  локуса NcoI *DRD2*, и существует ассоциация гаплотипа *DRD2\*A2-N2* с повышенным нейротизмом (чертой тревожного ряда, Казанцева, 2008).

Известно, что уровень внеклеточного ДА определяется полиморфизмами в генах *DRD2* и переносчика дофамина - *SLC6A3*, которые влияют на синтез и тоническое выделение ДА из терминалей нейронов и его эвакуацию. Выяснено, что D2S определяет активность переносчика дофамина (Meiergerd et al., 1993, Brown et al., 1994, Mortensen, Amara, 2003, Bolan et al., 2007, Bertolino et al., 2009). Исходя из этого, мы решили выяснить, существует ли связь полиморфного локуса 256A/G *SLC6A3* с уровнем тревожности у двух групп изучаемых нами крыс.

Для этого мы провели генотипирование и сравнительную оценку частот генотипов и аллелей полиморфного локуса 256A/G *SLC6A3* у крыс, как гомозиготных по аллелю  $A_2$ , так и у крыс гомозиготных по аллелю  $A_1$ , различающихся по уровню тревожности.

Результаты анализа распределения частот генотипов и аллелей полиморфного маркера 256A/G *SLC6A3* внутри популяций крыс  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  и показали существование трех генотипов: A/A, A/G, G/G. При этом было обнаружено, что в группе крыс, характеризующихся повышенным уровнем тревожности ( $A_2/A_2$ ), преобладал генотип A/A (с частотой 0.65), следующим по частоте был генотип A/G (0.32), а частота генотипа G/G составляла 0.03. Частота встречаемости аллелей составляла 0.82 (A) и 0.18 (G).

В группе крыс, гомозиготных по аллелю  $A_1$  локуса Taq1A *DRD2* (характеризующихся пониженным уровнем тревожности), генотипы имели следующую

частоту: A/A - 0.41, A/G - 0.44, наиболее редкий генотип G/G - 0.15. Частота встречаемости аллелей составляла 0.64 (A) и 0.36 (G) (Рис.7).

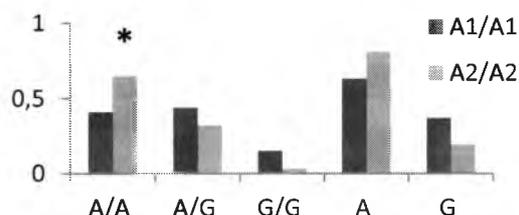


Рис.7. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного маркера 256A/G *SLC6A3* у крыс с генотипами A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>

В результате сравнительного анализа выявлены статистически значимые различия в распределении частот генотипов маркера 256A/G гена *SLC6A3* между группами крыс - носителями генотипа A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и генотипа A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> ( $\chi^2 = 6.87$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.032$ ), хотя в распределении частот аллелей статистически значимых различий обнаружено не было ( $\chi^2 = 3.05$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.081$ ). Дальнейший анализ показал, что в группе крыс с повышенным уровнем тревожности (A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>) выявлено статистически значимое увеличение частоты генотипа A/A гена *SLC6A3* ( $\chi^2 = 4.01$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0445$ ) по сравнению с группой крыс, гомозиготных по аллелю A<sub>1</sub> *DRD2*. Таким образом, нами установлено, что маркером повышенного риска развития тревожности является генотип A/A локуса 256A/G гена *SLC6A3* (OR = 2.77, 95%CI 1.02-7.64).

Результаты исследования показали, что у крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1 A *DRD2* пассивная стратегия поведения, обусловленная тревожностью, связана с генотипом A/A локуса 256A/G гена *SLC6A3* и сниженным содержанием дофамина в ключевой структуре лимбической системы – МК. На основании полученных нами данных можно предполагать, что между двумя изученными полиморфными локусами гена *DRD2* – Taq 1A и локуса 256A/G гена *SLC6A3* – существует связь.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ ориентировочно-исследовательского поведения двух групп крыс линии WAG/Rij с генотипами A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1 A *DRD2* выявил:

а) ассоциацию генотипа A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> с активной, генотипа A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> - пассивной стратегией поведения;

б) активность самок крыс обеих групп выше, чем самцов, но у крыс с генотипом A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> эти различия более выражены и имеют место со стороны большего числа параметров.

2. Оценка уровней тревожности крыс линии WAG/Rij с генотипами A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Taq 1 A *DRD2* показала:

а) для крыс (самцы+самки) с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> характерны признаки тревожности по сравнению с крысами с генотипом A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>, паттерн поведения которых указывает на стереотипный (челночный) характер их перемещений;

б) анализ половых различий поведения крыс с генотипом A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> свидетельствует о большем уровне тревожности у самцов; у крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> половые различия не обнаружены, т.к. самцы и самки демонстрируют одинаковые уровни тревожности.

3. Морфометрический анализ миндалевидного комплекса мозга (МК) выявил, что его площадь не различается у крыс линии WAG/Rij с генотипами A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>, но обнаружил высоко значимое увеличение удельной площади базолатеральной группировки структур МК и большую относительную массу головного мозга у крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>.

4. Анализ цитоархитектоники и нейронной организации базолатерального ядра МК выявил хромофобию и меньшую плотность крупных нейронов (длинноаксонных пирамидообразных густоветвистых) у крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> и увеличение представительства нейронов малого размера (короткоаксонных нейронов) по сравнению с крысами с генотипом A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>.

5. Хроматографический анализ ткани МК и его группировок показал:

а) в МК крыс с генотипом  $A_1/A_1$  содержится больше дофамина по сравнению с крысами, имеющими генотип  $A_2/A_2$ ;

б) у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  нет различий в содержании дофамина между кортико-медиальной и базолатеральной группировками при наличии таковой у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ , что может обуславливать изменение взаимосвязей между этими группировками;

в) анализ содержания дофамина у самцов и самок крыс с генотипами  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в МК выявил, что оно выше у самок обеих групп крыс, что согласуется с обнаруженными сдвигами при изучении поведения;

г) сравнение содержания дофамина в базолатеральной группировке у крыс с разными генотипами выявило, что у крыс с генотипом  $A_2/A_2$  его содержание значительно меньше, чем у крыс с генотипом  $A_1/A_1$ .

б. В группе крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , поведение которых характеризуется повышенным уровнем тревожности, при анализе полиморфного локуса 256A/G *SLC6A3* выявлено значимое увеличение частоты генотипа A/A по сравнению с группой крыс с генотипом  $A_1/A_1$ .

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сайфуллина, Л.Т. Результаты анализа поведения в открытом поле взрослых крыс линии WAG/Rij / Л.Т. Сайфуллина, **Н.Ф. Леушкина** // Тез. Всеросс. конф. мол. исследователей «Физиология и медицина». - СПб, 2005. - Вестник молодых ученых. - С.103.
2. **Леушкина, Н.Ф.** Особенности заднего отдела миндалевидного комплекса мозга двух субпопуляций крыс с модификацией гена *DRD2* / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // Всеросс. конф. мол. исследователей «Физиология и медицина». - СПб, 2006. - Вестник молодых ученых. - С. 190-191.
3. **Леушкина, Н.Ф.** Миндалевидный комплекс мозга: цитоархитектоника, нейронная организация и показатели влияния фактора пола на дендроархитектонику нейроэндокринных нейронов/ Н.Ф. Леушкина // XI конкурс научных работ студентов РБ. - Уфа, 2006. – Материалы докладов. - С. 38-39.
4. **Леушкина, Н.Ф.** Структурные основы особенностей поведения крыс с модификацией *DRD2* / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Сборник научн. статей молодых ученых кафедры МФЧЖ БашГУ «Интегративная физиология». – Уфа, 2007. - С. 48-53.
5. **Леушкина, Н.Ф.** Молекулярно-генетические модели для исследования тревожности и агрессивного поведения / Н.Ф. Леушкина, Л.Б. Калимуллина // *Международный научный конгресс «В.М.Бехтерев – основоположник нейронаук, творческое наследие, история и современность»*. – 2007. – Тезисы докладов. - Т. 39. - С. 98.
6. **Леушкина, Н.Ф.** Особенности поведения и структурной организации амигдалы в двух субпопуляциях крыс с модификацией гена дофамина *DRD2* / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // *Междунар. конф. молодых ученых «Ломоносов 2007»*. - Москва, 2007. – Тезисы докладов. - С.148-149.
7. **Leushkina, N. F.** Genetic and molecular-biological approaches in study of function of amygdala / N. F. Leushkina, A.V. Akhmadeev., L.B. Kalimullina // Fourth International Interdisciplinary Congress “Neuroscience for Medicine and Psychology”. - Sudak, Ukraine, 2008. - P. 178-179.
8. **Леушкина, Н.Ф.** Фенотипические характеристики крыс различного возраста с модификацией *DRD2* / Н.Ф. Леушкина, А.М. Мусина, А.Я. Ханнанова, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // *Конгресс Международной Ассоциации Морфологов. - Морфология*. – 2008. - Тезисы докладов. - Т. 133. - № 2. – С.77.
9. **Леушкина, Н.Ф.** Роль фактора модификации аллельной структуры *DRD2* в поведении крыс линии WAG/Rij / Н.Ф. Леушкина // Конкурс научных работ студентов ВУЗов РБ. - Уфа, 2008. – Тезисы докладов. - С.67-68.

10. **Леушкина, Н.Ф.** Результаты факторного анализа поведения крыс с модификацией *DRD2* / Н.Ф. Леушкина // ХУ Международная конференция молодых ученых «Ломоносов – 2008». - М, 2008. – Тезисы докладов. - С.58.
11. **Леушкина, Н.Ф.** Исследование влияния фактора пола на поведение крыс с модификацией аллельной структуры *DRD2* / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2009. - № 4. - С.14-17.
12. **Леушкина, Н.Ф.** Особенности в поведении особей разного пола крыс двух групп, имеющих различие по локусу *Taq1A* гена рецептора дофамина второго типа / Н.Ф. Леушкина // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009». - М, 2009. – Тезисы докладов. - С.137.
13. Hannanova, A. Study of the possible role of *DRD2* and *DAT1* gene polymorphisms on behavioral characteristics in animal model of epilepsy / A. Hannanova, A. Kazanzeva, N. **Leushkina**, L. Kalimullina // European journal of human genetics. – 2009. - V.17. - P.395-396.
14. **Леушкина, Н.Ф.** Характеристика поведения крыс, различающихся по генотипу локуса *Taq 1A* гена рецептора дофамина второго типа, в тесте приподнятый крестообразный лабиринт / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // **Фундаментальные исследования**. – 2010. - № 5. - С.34-38.
15. **Леушкина, Н.Ф.** Исследование влияния фактора пола на поведение крыс с различиями аллельной структуры гена рецептора дофамина второго типа (*DRD2*) в тесте приподнятый крестообразный лабиринт и морфометрические характеристики миндалевидного комплекса мозга. / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Успехи современного естествознания. – 2010. - № 4. - С. 26-31.
16. Kalimullina, L.B. Neurobiological basis of adaptive behavior / L.B. Kalimullina, N.F. **Leushkina**, A.V. Akhmadeev // Sixth Internatuional Congress “Neuroscience for medicine and Psychology”. - Sudak, Ukraine, 2010. - P.148-149.
17. Калимуллина, Л.Б. Нейробиологические и молекулярно-генетические маркеры различных стратегий поведения / Л.Б. Калимуллина, А.В. Ахмадеев, **Н.Ф. Леушкина**, А.М. Мусина, А.Я. Ханнанова, Э.К. Хуснутдинова // XXI съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова. – 2010. – Тезисы докладов. - С.257.
18. **Леушкина, Н.Ф.** Нейрогенетические аспекты в исследованиях структурно-функциональной организации миндалевидного тела / Н.Ф. Леушкина // **X Конгресс Международной Ассоциации морфологов**. – **Морфология**. – 2010. - Т.137. - №4. - С.113.
19. **Леушкина, Н.Ф.** Оценка показателей тревожности двух гомозиготных популяций крыс, различающихся по локусу гена рецептора дофамина *D2* в тесте свето-темнового выбора и при предъявлении незнакомой пищи в новых условиях / Н.Ф. Леушкина // XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломонсов-2010». – М, 2010. – Тезисы докладов. - С.232-233.
20. **Леушкина, Н.Ф.** Поведенческое фенотипирование двух сублиний крыс, различающихся по организации локуса рецептора дофамина *D2* в тесте ПКЛ / Н.Ф. Леушкина // Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье». – СПб, 2010. – Тезисы докладов. - С.45.
21. **Леушкина, Н.Ф.** Ассоциация полиморфного ДНК – локуса 256 A/G гена переносчика дофамина *SLC6A3* и уровней дофамина с повышенной тревожностью / Н.Ф. Леушкина, А.Я. Ханнанова, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Успехи современного естествознания. – 2011. - № 5. – С.19-21.
22. **Леушкина, Н.Ф.** Полиморфизм гена *D2*-рецептора и катехоламина в регуляции ориентировочно-исследовательского поведения крыс / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев, Л.Б. Калимуллина // Успехи современного естествознания. – 2011. - №9. – С. 8-10.
23. Егорова, О.А. Исследование структурных и молекулярных основ тревожности / О.А. Егорова, **Н.Ф. Леушкина** // XIV Всероссийская медико-биологическая конференция

молодых исследователей (с международным участием). – СПб, 2011. – Тезисы докладов. - С.88-89.

24. Карпеева, С.А. Исследование механизмов предрасположенности к алкоголизму: роль полиморфного локуса гена переносчика дофамина / С. А. Карпеева, **Н.Ф. Леушкина**, А.Я. Ханнанова // XV1 Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье». - СПб, 2013. – Тезисы докладов. – С. 512.

25. **Леушкина, Н.Ф.** Анализ поведения и содержания катехоламинов мозга до и после стресса у крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по локусу  $Taq1A$   $D_2$  рецептора / **Леушкина, Н.Ф.**, Федорова А.М., Калимуллина Л.Б. Ахмадеев А.В. // *Фундаментальные исследования* . – 2013. – Т.8. – С. 896-899.

26. **Леушкина, Н.Ф.** Ориентировочно-исследовательское поведение, половые стероиды и локус  $Taq1A$   $DRD2$  / Н.Ф. Леушкина, Р.И. Мухотдинова // XVII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина». - СПб, 2014. – Тезисы докладов. - С. 267.

27. **Леушкина, Н.Ф.** Ассоциация полиморфных вариантов локуса  $Taq1A$   $DRD2$  с уровнями дофамина и особенностями ориентировочно-приспособительного поведения / Н.Ф. Леушкина, А.В Ахмадеев // XII Всероссийская с международным участием Школа-конференция «Физиологические механизмы адаптации растущего организма». - Казань, 2014. - Тезисы докладов. - С. 65.

28. **Леушкина, Н.Ф.** *Нейрофенотипические характеристики крыс, имеющих различия генотипа по локусу  $Taq 1A$   $DRD2$  / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // *Фундаментальные исследования*. – 2014. - №9 (часть 4). – С.772-775.*

29. **Леушкина, Н.Ф.** *Особенности двигательной активности и исследовательской деятельности крыс, имеющих различия в экспрессии изоформ  $D_2$ -рецептора / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // *Фундаментальные исследования*. – 2014. - №9 (часть 11). – С. 2465-2468.*