

DOI: 10.7868/S0869813918090083

ПРЕИМПУЛЬСНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ У МЫШЕЙ-НОКАУТОВ ПО ТААР1 РЕЦЕПТОРУ

© Н. В. Полякова, Е. П. Виноградова, А. А. Александров,
Р. Р. Гайнетдинов

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: nadezhda.polyakova@spbu.ru

Преимпульсное торможение (PPI) рассматривается как эндофенотип шизофрении, что позволяет использовать животные модели как для выявления фармакологических эффектов, так и для выяснения механизмов функционирования нейронных сетей. В последнее время большое внимание уделяется изучению так называемых TAARs (TAAR1—TAAR9) рецепторов следовых аминов, которые могут иметь отношение к патогенезу различных видов нейропсихиатрических расстройств, включая шизофрению. Исследование проводили на самцах мышей линий C57BL/6 ($n = 16$), дикий тип WT ($n = 29$) и нокаутные мыши (knockout, KO) по TAAR1 ($n = 19$). Исходными для WT и KO являлись мыши линий 129S1/Sv и C57BL/6. Результаты данного исследования показали, что преимпульсное торможение хорошо выражено у всех исследованных линий. Кроме того, амплитуда ответа на стимул (SS) в паре стимул с престимулом (PP-SS) у животных линии KO достоверно выше по сравнению с ответом у животных линии WT.

Ключевые слова: преимпульсное торможение, рецепторы следовых аминов, мыши, мыши-нокауты по рецептору TAAR1.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 9. С. 1098—1105. 2018

N. V. Polyakova, E. P. Vinogradova, A. A. Aleksandrov, R. R. Gainetdinov. PREPULSE INHIBITION IN THE TAAR1 KNOCKOUT MICE. Saint-Petersburg University, St. Petersburg, Russia; e-mail: nadezhda.polyakova@spbu.ru.

Prepulse inhibition (PPI) is considered as endophenotypes in schizophrenia, which allows applications of PPI in animal models, both for revealing pharmacological effects and for finding out the mechanisms of functioning of neural networks. Recently, much attention has been paid to the study of the so-called TAARs (TAAR1—TAAR9) of trace amine receptors, can be related to the pathogenesis of various types of neuropsychiatric disorders, including schizophrenia. The experiments were conducted on male mice C57BL / 6 ($n = 16$), wild type WT ($n = 29$) and TAAR1 knockout mice (KO) ($n = 19$). WT and KO were derived from 129S1/Sv and C57BL/6. Our results suggest that the prepulse inhibition is well expressed in all the strains studied. In addition, the response amplitude to the stimulus (SS) in the stimulus pair with prestimulus (PP-SS) in the KO strain animals is significantly higher than the response in the WT line animals. TAAR1 knockout mice (KO) exhibited prepulse inhibition (PPI) impairment.

Key words: prepulse inhibition (PPI), trace amine-associated receptor, mice, TAAR1 knock-out mice (KO).

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 9. P. 1098—1105. 2018

Шизофрения характеризуется большим разнообразием когнитивных расстройств, в частности нарушениями в переработке сенсорной информации. Во многих работах показано снижение уровня преимпульсного торможения (PPI) на звуковые стимулы у пациентов с шизофренией по сравнению со здоровыми людьми [17, 28]. Реакция испуга (startle) состоит из набора рефлекторных актов, предназначенных для подготовки ответа организма к потенциально значимому стимулу. Этот ответ может быть модулирован несколькими факторами, такими как, например, неоднократное предъявление стимула или предшествующее предъявление слабого стимула. Преимущество исследования именно этих процессов заключается в том, что они могут изучаться у людей и животных практически одинаковыми методами.

Преимпульсное торможение проявляется в снижении моторной реакции организма на сильный резкий звуковой стимул (startle stimulus, SS), при наличии слабого предварительного стимула — престоимула (prepulse, PP). Известно, что PPI рассматривается как индикатор сенсомоторной фильтрации, а также играет ключевую роль в дифференцировке релевантной и нерелевантной сенсорной информации. Во многих работах показано нарушение PPI у пациентов с различными видами нейропсихиатрических расстройств, таких как дефицит внимания [18], болезнь Гентингтона [26], синдром Туретта [27], аутизм [15, 20], при паническом расстройстве [14], при обсессивно-компульсивном расстройстве [24]. Наиболее изучены изменения PPI у больных с диагнозом шизофрения [5, 9, 16, 17, 28]. Преимпульсное торможение может рассматриваться как один из эндофенотипов шизофрении [12, 29]. Наличие такого биомаркера позволяет использовать животные модели как для выявления фармакологических эффектов, так и выяснения механизмов функционирования нейронных сетей [6, 8].

Достаточно давно высказывалось предположение о роли следовых аминов в патогенезе шизофрении [23]. В связи с этим в последнее время большое внимание уделяется изучению так называемых TAARs (TAAR1—TAAR9) рецепторов следовых аминов. Обнаружено, что агонист TAAR5 рецепторов существенно изменяет сенсорный гейтинг, который тоже рассматривается как эндофенотип шизофрении [2]. В отношении роли рецепторов по TAAR1 в литературе имеются противоречивые данные. Так, при сравнении процента PPI у линии мышей-нокаут по TAAR1 и линии дикого типа (WT) показано как наличие статистически значимых различий между линиями [30], так и их отсутствие [11].

Задачей данного исследования являлось оценка выраженности преимпульсного торможения у мышей разных линий по сравнению с нокаутными животными по рецептору TAAR1 (trace amine-associated receptor 1).

МЕТОДИКА

Все опыты проводили в соответствии с международными нормами по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [7]. Протокол эксперимента одобрен Этическим комитетом биологического факультета СПбГУ.

Объект исследования. Исследование проводили на самцах мышей линий C57BL/6 ($n = 16$), дикий тип WT ($n = 29$) и нокаутные мыши (knockout, KO) по TAAR1 ($n = 19$). Исходными для линий WT и KO являлись мыши линий 129S1/Sv и C57BL/6. Все животные были получены из вивария Института трансляционной биомедицины СПбГУ в возрасте от 2 до 3 месяцев. Средняя масса животных составляла (г): 28.1; 29.0, 27.8 (WT, KO, C57BL/6 соответственно). Животные содержались в стандартных условиях при свободном доступе к пище и воде. В каждую клетку помещали самцов от 2 до 5 особей только из одного помета. До начала проведения всех манипуляций с животными их содержали в лаборатории 7—10 дней.

Аппаратура и методы. Для регистрации преимпульсного торможения использовалась экспериментальная камера размером 32×24×18 см с закрывающейся крышкой. Установка выполнена из красного оргстекла с целью предотвращения визуального контакта животного с окружающей средой. Пол камеры оборудован датчиками ускорения (пьезоэлементами) для регистрации как спонтанных движений экспериментального животного, так и вздрагивания на предъявляемые стимулы. Динамик расположен на задней стенке камеры на высоте 12 см от пола.

При исследовании преимпульсного торможения животным предъявляли два типа проб, включающих либо только стимул (SS), либо пары престоимул-стимул (PP-SS). Длительность PP — 40 мс, длительность SS — 60 мс, интервал между PP и SS составлял 100 мс [22]. В качестве фона использовали белый шум (75 дБ). В свое время было показано, что при стабильном фоновом шуме реакция животного на SS сильнее по сравнению с реакцией на SS при пульсирующем фоновом шуме [10]. Стимулы также представляли собой белый шум. На основании анализа данных литературы нами была выбрана оптимальная громкость PP (на 4 дБ выше уровня шума) для регистрации более выраженного PPI [11, 30], громкость SS составляла 107 дБ. Длительность интервалов между пробами изменяли в случайном порядке от 4 до 10 с.

Схема эксперимента. Перед регистрацией преимпульсного торможения в течение 3 дней проводили процедуру адаптации: животное 3—5 мин находилось в экспериментальной камере при непрерывном предъявлении белого шума (75 дБ). Далее, в течение 2—3 дней проводили процедуру габитуации [21]: животное также 3—5 мин находилось в камере, но на фоне белого шума предъявляли 5—10 стимулов (SS) интенсивностью 107 дБ, длительностью 60 мс.

Для регистрации PPI животное помещали в экспериментальную камеру, в которой оно находилось при стабильном фоновом шуме в течение 5 мин для адаптации. Тест длительностью 3 мин 10 с включал 30 проб по 15 предъявлений каждого типа (SS и PP-SS). Пробы предъявлялись в псевдослучайном порядке.

Сигнал акселерометра, зарегистрированный пьезоэлементами установки в ответ на моторную реакцию животного (вздрагивание), фиксировался в условных единицах. Процент PPI оценивали по формуле $100 - (A1/A2 \cdot 100)$, где A1 амплитуда ответа на стимул (SS) в паре (PP-SS), A2 — амплитуда ответа на одиночный стимул (SS).

Статистический анализ. Статистическая оценка различий по PPI производилась с помощью методов дисперсионного анализа. (SPSS 11.5). Использовался вариант трехфакторной модели с факторами «проба» (число уровней 2: SS и SS в паре PP-SS), «амплитуда» (число уровней 15) и «линия животных» (число уровней 3: дикий тип, нокауты по TAAR1 и C57BL/6). Процент преимпульсного торможения оценивали с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При общем анализе полученных данных было выявлено, что амплитуда ответа на стимул в паре стимул с престоимом достоверно меньше по сравнению с амплитудой на стимул ($p \leq 0.001$) для всех линий мышей (рис. 1).

Поскольку взаимодействие факторов «проба» \times «амплитуда» достигает уровня статистической значимости ($p = 0.017$), был проведен более подробный анализ отдельно для каждого типа проб. Выявлено статистически значимое отличие линий животных между собой по амплитуде ответа ($p = 0.044$), а именно на стимул в паре PP-SS амплитуда ответа у животных КО по TAAR1 и у мышей линии C57BL/6 (рис. 2) достоверно больше по сравнению с амплитудой ответа у мышей линии WT ($p = 0.047$ и $p = 0.031$ соответственно).

Кроме того, у линии WT процент преимпульсного торможения (рис. 3) достоверно выше ($p = 0.003$) по сравнению с процентом PPI у животных линии C57BL/6 (61.3 и 47.3 % соответственно). Процент преимпульсного торможения у мышей линии нокауты по TAAR1 имел промежуточное значение (57.7 %) и не достигал уровня статистически значимых различий при сравнении с обеими линиями.

Следует отметить, что хотя внутри каждой из групп наблюдалась вариабельность амплитуды ответа на SS, тем не менее данный показатель не влиял на процент преимпульсного торможения. Это согласуется с результатами, полученными как на мышах, так и на крысах, демонстрирующими, что базовая реакция испуга не влияет на выраженность торможения [19, 25].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что следовые амины имеют очевидный нейрологический эффект и могут рассматриваться как нейромодуляторы, а возможно, и как настоящие нейромедиаторы [4]. Рецепторы следовых аминов (TAARs), относящиеся

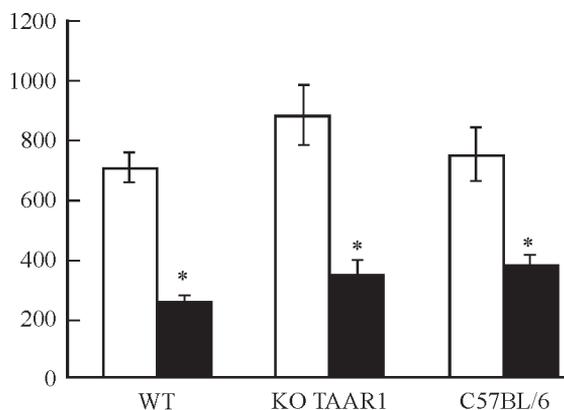


Рис. 1. Амплитуда ответа у животных разных линий на звуковые стимулы при регистрации преимпульсного торможения.

По горизонтали — группы животных разных линий, по вертикали — амплитуда ответа (усл. ед.) на одиночный стимул (SS) — светлые столбики и на стимул в паре престоим-стимул (PP-SS) — черные столбики. WT — животные линии «дикий тип» ($n = 29$), КО TAAR1 — нокаутные мыши по TAAR1 ($n = 19$) и C57BL/6 ($n = 16$). * $p \leq 0.001$ — различия между амплитудой ответа на одиночный стимул (SS) и на стимул в паре престоим-стимул (PP-SS).

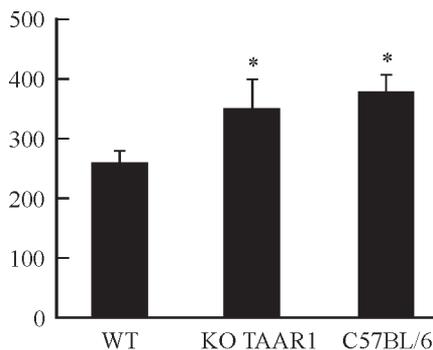


Рис. 2. Амплитуда ответа (усл. ед.) на стимул в паре престимул-стимул у животных разных линий.

По горизонтали — группы животных разных линий, по вертикали — амплитуда ответа на стимул в паре престимул-стимул (усл. ед.). * $p \leq 0.05$ — отличия линий KO TAAR1 и C57BL/6 по сравнению с животными линии WT.

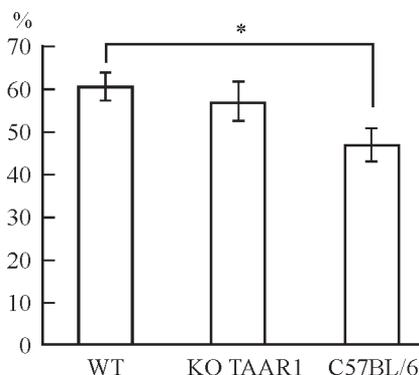


Рис. 3. Процент преимпульсного торможения у животных разных линий.

По горизонтали — группы животных разных линий, по вертикали — процент преимпульсного торможения.* $p \leq 0.05$.

к классу G-белковых рецепторов, идентифицированы как у человека (6 подтипов), так и у других позвоночных и беспозвоночных [1, 3].

Для наиболее изученного рецептора (TAAR1) показано, что он экспрессируется во многих отделах ЦНС и активируется амфетамином и другими психотропными агентами. Мыши-нокауты по TAAR1 не отличаются от животных дикого типа по таким физиологическим показателям, как масса, размер и температура тела. Также животные этих линий не различаются и по поведенческим тестам, оценивающим уровень тревожности и рабочую память (приподнятый крестообразный лабиринт и Y-лабиринт). Тем не менее в фармакологических исследованиях выявлено различие между мышами-нокаутами по TAAR1 и мышами дикого типа, что проявляется в увеличении чувствительности к амфетамину, которую оценивали по изменению локомоторной активности [13, 30]. Фармакологические и поведенческие исследования мышей-нокаутов по TAAR1 позволяют предположить, что стимуляция TAAR1 влияет на

моноаминергическую передачу и модулирует нейрхимические и поведенческие эффекты амфетамина и кокаина.

В нашей работе помимо линий КО TAAR1 и WT мы изучали PPI на животных линии C57BL/6. Было показано, что преимпульсное торможение хорошо выражено у всех исследованных линий (Рис. 1). Выявлено, что амплитуда ответа на стимул (SS) в паре стимул с престоимом (PP-SS) у животных линии КО достоверно выше по сравнению с ответом на этот же стимул у животных линии WT, что может свидетельствовать о дефиците преимпульсного торможения у мышей КО. В настоящее время в литературе имеются противоречивые данные о роли рецепторов по TAAR1 в формировании преимпульсного торможения. Полученные нами результаты согласуются с данными работы Т. D. Wolinsky и соавт. [30], однако в исследовании R. Karmacharya и соавт. [11] различие по преимпульсному торможению между группами WT и КО TAAR1 не достигает уровня статистической значимости. Исследование животных линии C57BL/6 показало, что преимпульсное торможение у мышей WT достоверно отличается не только от PPI у мышей линии КО с выключенным рецептором TAAR1, но и от такового у мышей линии C57BL/6.

Таким образом, в нашей работе показано, что при выключении рецептора TAAR1 у мышей можно говорить об определенном дефиците преимпульсного торможения, однако для окончательного выяснения роли данного рецептора в реализации PPI требуются дополнительные исследования.

Работа выполнена при поддержке грантов: РФФИ 17-04-00082 «Влияние агонистов TAARs рецепторов на электрофизиологические и поведенческие маркеры шизофрении»; РФФ 14-50-00069 «Трансгенные модели заболеваний человека на экспериментальных животных».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] *Accorroni A., Zucchi R.* Trace amine-associated receptors: ligands and putative role in the central nervous system. Chapter 11, 151—161. In: Trace amines and neurological disorders: potential mechanisms and risk factors. Eds Tahira Farooqui, Akhlaq. Farooqui. Acad. Press. 2016.

[2] *Aleksandrov A. A., Dmitrieva E. S., Volnova A. B., Knyazeva V. M., Gerasimov A. S., Gainetdinov R. R.* TAAR5 receptor agonist affects sensory gating in rats. *Neurosci. Letters.* 666: 144—147. 2018.

[3] *Berry M. D., Gainetdinov R. R., Hoener M. C., Shahid M.* Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol. Ther.* 180: 161—180. 2017.

[4] *Borowsky B., Adham N., Jones K. F., Raddatz R., Artymyshyn R., Ogozalek K. L., Durkin M. M., Lakhani P. P., Bonini J. A., Pathirana S., Boyle N., Pu X., Kouranova E., Harvey Lichtblau H., Ochoa Y., Branchek T., Gerald C.* Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 8966—8971. 2001.

[5] *Braff D. L., Swerdlow N. R., Geyer M. A.* Symptom correlates of prepulse inhibition deficits in male schizophrenic patients. *Am. J. Psychiatry* 156: 596—602. 1999.

[6] *Ellenbroek B. A.* Pre-attentive processing and schizophrenia: animal studies. *Psychopharmacol. (Berl.)* 174: 65—74. 2004.

[7] *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes*, 1986. *Experientia.* 51: 1—5. 1995.

[8] *Green M. F., Butler P. D., Chen Y., Geyer M. A., Silverstein S., Wynn J. K., Yoon J. H., Zemon V.* Perception measurement in clinical trials of schizophrenia: promising paradigms from CNTRICS. *Schizophr. Bull.* 35: 163—181. 2009.

[9] *Greenwood T. A., Light G. A., Swerdlow N. R., Calkins M. E., Green M. F., Gur R. E., Gur R. C., Lazzaroni L. C., Nuechterlein K. H., Olincy A., Radant A. D., Seidman L. J., Sie-*

- ver L. J., Silverman J. M., Stone W. S., Sugar C. A., Tsuang D. W., Tsuang M. T., Turetsky B., Freedman R., Braff D. L. Gating deficit heritability and correlation with increased clinical severity in schizophrenia patients with positive family history. *Am. J. Psychiatry*. 173(4): 385—391. 2016.
- [10] Hoffman H., Fleshler M. Startle reaction: Modification by background acoustic stimulation. *Science*. 141: 928—930. 1963.
- [11] Karmacharya R., Lynn S. K., Demarco S., Ortiz A., Xin Wang, Lundy M. Y., Xie Z., Cohen B. M., Miller G. M., Buttner E. A. Behavioral effects of clozapine: Involvement of trace amine pathways in *C. elegans* and *M. musculus*. *Brain Res*. 1393: 91—99. 2011.
- [12] Light G. A., Swerdlow N. R. Neurophysiological biomarkers informing the clinical neuroscience of schizophrenia: mismatch negativity and prepulse inhibition of startle. *Curr. Top. Behav. Neurosci*. 21: 293—314. 2014.
- [13] Lindemann L. I., Meyer C. A., Jeanneau K., Bradaia A., Ozmen L., Bluethmann H., Bettler B., Wettstein J. G., Borroni E., Moreau J. L., Hoener M. C. Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 324(3): 948—956. 2008.
- [14] Ludewig S., Geyer M. A., Ramseier M., Vollenweider F. X., Rechsteiner E., Cattapan-Ludewig K. Information-processing deficits and cognitive dysfunction in panic disorder. *J. Psychiatry Neurosci*. 30(1): 37—43. 2005.
- [15] McAlonan G.M., Daly E., Kumari V., Critchley H. D., van Amelsvoort T., Suckling J., Simmons A., Kathyrn T. S., Russell G. A., Schmitz N., Happe F., Howlin P., Murphy D. G. M. Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. *Brain*. 125: 1594—1606. 2002.
- [16] Mena A., Ruiz-Salas J. C., Puentes A., Dorado I., Ruiz-Veguilla M., De la Casa L. G. Reduced prepulse inhibition as a biomarker of schizophrenia. *Front. Behav. Neurosci*. 10: 1—9. 2016.
- [17] Moriwaki M., Kishi T., Takahashi H., Hashimoto R., Kawashima K., Okochi T., Kitajima T., Furukawa O., Fujita K., Takeda M., Iwata N. Prepulse inhibition of the startle response with chronic schizophrenia: a replication study. *Neurosci. Res*. 65: 259—262. 2009.
- [18] Ornitz E. M., Hanna G. L., de Traversay J. Prestimulation-induced startle modulation in attention-deficit hyperactivity disorder and nocturnal enuresis. *Psychophysiology*. 29: 437—451. 1992.
- [19] Paylor R., Crawley J. N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology*. 132: 169—180. 1997.
- [20] Perry W., Minassian A., Lopez B., Maron L., Lincoln A. Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol. Psychiatry*. 61: 482—648. 2007.
- [21] Pilz P. K. D., Schnitzler H.-U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. *Neurobiol. Learning Memory*. 66(1): 67—79. 1996.
- [22] Plappert C. F., Pilz P. K., Schnitzler H.-U. Factors governing prepulse inhibition and prepulse facilitation of the acoustic startle response in mice. *Behav. Brain Res*. 152(2): 403—412. 2004.
- [23] Potkin S. G., Karoum F., Chuang L. W., Cannon-Spoor H. E., Phillips I., Wyatt R. J. Phenylethylamine in paranoid chronic schizophrenia. *Science*. 206: 470—471. 1979.
- [24] Swerdlow N. R., Benbow C. H., Zisook S., Geyer M. A., Braff D. L. A preliminary assessment of sensorimotor gating in patients with obsessive compulsive disorder. *Biol. Psychiatry*. 33: 298—301. 1993.
- [25] Swerdlow N. R., Geyer M. A., Braff D. L. Neural circuitry of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*. 156: 194—215. 2001.
- [26] Swerdlow N. R., Paulsen J., Braff D. L., Butters N., Geyer M. A., Swenson M. R. Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with Huntington's Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 58: 192—200. 1995.
- [27] Swerdlow N. R., Karban B., Ploum Y., Sharp R., Geyer M. A., Eastvold A. Tactile prepulse inhibition of startle in children with Tourette's syndrome: in search of an «fMRI-friendly» startle paradigm. *Biol. Psychiatry*. 50(8): 578—585. 2001.
- [28] Takahashi H., Iwase M., Ishii R., Ohi K., Fukumoto M., Azechi M., Ikezawa K., Kurimoto R., Camuet L., Nakahachi T., Iike N., Tagami S., Morihara T., Okochi M., Tanaka T., Kazui H., Yoshida T., Tanimukai H., Yasuda Y., Kudo T., Hashimoto R., Takeda M. Impaired prepulse inhibition and habituation of acoustic startle response in Japanese patients with schizophrenia. *Neurosci. Res*. 62: 187—194. 2008.

[29] *Walters J. T., Owen M. J.* Endophenotypes in psychiatric genetics. *Mol. Psychiatry*. 12: 886—890. 2007.

[30] *Wolinsky T. D., Swanson C. J., Smith K. E., Zhong H., Borowsky B., Seeman P., Branchek T., Gerald C. P.* The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia. *Genes, Brain Behav.* 6: 628—639. 2007.

Поступила 14 VI 2018