

На правах рукописи

ИЛЬЧИБАЕВА ТАТЬЯНА ВИТАЛЬЕВНА

**ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННОЕ АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ
И НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ МОЗГА**

03.03.01 - физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в лаборатории нейрогеномики поведения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Научный руководитель – Владимир Сергеевич Науменко, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нейрогеномики поведения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Официальные оппоненты:

Людмила Федоровна Гуляева, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» (г. Новосибирск);

Марина Валерьевна Храпова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейроиммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (г. Новосибирск).

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383)335-97-54, эл. почта: dissovet@physiol.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИФФМ» и на сайте <http://www.physiol.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

В.Н. Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Агрессия является сложным социальным поведением. Данный тип поведения вызывает у ученых постоянный интерес, который периодически обостряется, что, по-видимому, связано с чисто социальными факторами (Попова и др., 1978). В современном человеческом обществе агрессия становится главной мировой социальной проблемой, т.к. лежит в основе криминального и асоциального поведения. Также немаловажным является тот факт, что многие нейродегенеративные и психиатрические заболевания ассоциированы с повышенной агрессивностью. Поэтому изучение механизмов возникновения и развития агрессивного поведения представляет собой крайне актуальную научную задачу.

Существует много определений агрессии и агрессивного поведения. Одно из них звучит как «открытое поведение, содержащее намерение причинить вред или действовать деструктивно по отношению к другому организму» (Volavka, 1995), другое как «некоторая форма поведения, направленная на причинение ущерба или вреда другому живому существу, которое заинтересовано избежать такого воздействия» (Baron, Richardson, 1994). Давно признано, что у животных существует много типов агрессивного поведения. Они различаются по механизмам, раздражителям, развитию, функциям и филогении. Агрессия, вызванная страхом, направлена на защиту от нападения хищника или человека и является защитно-оборонительной (defensive aggression) (Maxson, 2000). Элиминирование данного типа агрессии представляет собой ключевой фактор в доместикации животных.

Уникальный, не имеющий аналогов в мире эксперимент по доместикации диких серых крыс привёл к созданию двух линий, абсолютно различных по выраженности защитно-оборонительной агрессии – неагрессивные ручные и крайне агрессивные крысы. (Naumenko et al, 1989; Blanchard et al., 1994; Плюснина, Соловьева, 2010). На ранних этапах селекции у этих крыс были оценены различные формы агрессивного поведения. В то время как были показаны очевидные различия в выраженности агрессии, вызванной страхом, никаких различий в уровне межсамцовой и материнской агрессии, а также агрессии хищника между неагрессивными и агрессивными крысами выявлено не было (Popova et al., 1993; Konoshenko, Plyusnina, 2012). Перекрестное вскармливание ручных крыс агрессивной матерью и агрессивных крыс неагрессивной матерью не оказало значительного эффекта на выраженность агрессивного поведения по отношению к человеку (Albert et al., 2008, Plyusnina et al., 2009), что говорит о сильной роли генотипа в регуляции агрессивности. Однако остается неясным, как генетическая предрасположенность к защитно-оборонительной агрессии связана с другими типами агрессивного поведения. Особый интерес вызывает важный вопрос, касающийся связи между патологической агрессией и другими видами агрессивного поведения.

Механизмы регуляции агрессии являются сложными и активно изучаются. Известно о вовлечении серотонинергической (5-HT) и дофаминергической (ДА) систем (Popova, 2006; Rosell, Siever, 2015), а также нейропептидов и нейротрофических факторов (НТФ) (Takahashi et al, 2012) в регуляцию данного вида поведения.

В настоящее время объектом наиболее интенсивных исследований являются нейротрофические факторы, которые играют важнейшую роль в росте, выживании и дифференцировке развивающихся и зрелых нейронов, что составляет основу процессов нейропластичности. Благодаря своим функциям НТФ принимают участие в регуляции различных форм поведения, как в норме, так и при патологии. Существуют данные об участии нейротрофического фактора мозга (BDNF) в механизмах агрессивного поведения. В частности, мыши с глобальной делецией одного аллеля гена *Bdnf* (Lyons et al., 1999) или локальной делецией двух аллелей гена *Bdnf* в переднем мозге (Ito et al., 2011) демонстрируют усиление агрессии. Дефицит BDNF в эмбриональном мозге приводит к последующему развитию агрессивного поведения (Chan et al., 2006). С другой стороны, в работе Lang с соавторами (2009) показан более высокий уровень белка BDNF в гиппокампе и коре высокоагрессивных мышей АВН по сравнению с неагрессивными мышами линии АВГ. Также показано, что центральное введение BDNF может приводить к усилению межсамцовой агрессии у мышей (Naumenko et al., 2014).

Таким образом, данные об участии BDNF в регуляции агрессивного поведения немногочисленны и противоречивы. Существует очевидная нехватка данных о взаимосвязи генетически детерминированного агрессивного поведения и экспрессии BDNF. Ничего неизвестно об участии предшественника BDNF – proBDNF в регуляции данного типа поведения.

В отличие от BDNF, такие НТФ, как глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF), никогда не изучались во взаимосвязи с агрессивным поведением. Особенностью данных НТФ является их участие в дифференцировке, росте, выживании и восстановлении ДА нейронов (Saavedra et al, 2008; Lindholm, Saarma, 2010). А так как ДА система участвует в регуляции агрессивного поведения, то изучение GDNF и CDNF, а также их белков-предшественников представляет значительный интерес.

Цель и задачи исследования: Целью данной работы стало изучение экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) у крыс с генетически детерминированным защитно-оборонительным агрессивным поведением.

В соответствии с целью были сформулированы следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать выраженность различных типов агрессивного поведения у крыс с генетически детерминированной защитно-оборонительной агрессией;
- 2) Изучить уровни мРНК генов *Bdnf*, *Gdnf* и *Cdnf* у крыс с высоким уровнем агрессии по отношению к человеку, либо с её отсутствием;
- 3) Исследовать уровни белков BDNF, GDNF и CDNF в структурах мозга крыс с генетической предрасположенностью к высокой агрессивности или её отсутствию;
- 4) Определить уровни белков предшественников proBDNF, proGDNF и preCDNF у крыс с генетически детерминированным защитно-оборонительным агрессивным поведением.

Научная новизна:

- ❖ впервые обнаружены различия в патологической и хищнической агрессии у крыс с генетической предрасположенностью к высокой агрессивности или её отсутствию. У высокоагрессивных крыс наблюдается усиление агрессии хищника и асоциального патологического поведения.
- ❖ впервые выявлено повышение экспрессии нейротрофического фактора BDNF и его белка-предшественника proBDNF в структурах мозга крыс, демонстрирующих высокий уровень агрессии, вызванной страхом. В частности, у высокоагрессивных крыс было обнаружено существенное увеличение экспрессии BDNF в миндалевидном комплексе и гиппокампе, которые ответственны за фиксацию памяти о страхе и поражении, а также в прилежащих ядрах, контролирующими социальное избегание и готовность к агонистическим взаимодействиям.
- ❖ впервые показано вовлечение нейротрофического фактора GDNF, его проформы proGDNF, а также димера зрелой формы GDNF в механизмы агрессивного поведения.
- ❖ впервые обнаружено усиление экспрессии CDNF и его предшественника preCNDNF в ряде структур головного мозга крыс с генетически детерминированной агрессией, вызванной страхом, что является первым свидетельством вовлечения данного НТФ в механизмы регуляции агрессии, как формы поведения.
- ❖ впервые выявлено увеличение экспрессии НТФ разных семейств (BDNF, GDNF и CDNF), в ключевой серотониновой структуре – области ядер шва среднего мозга – у высокоагрессивных крыс, что предполагает необходимость нейротрофической поддержки 5-НТ системы при генетически детерминированном агрессивном поведении.

Научно-практическая значимость

Предложена новая нейротрофическая гипотеза регуляции агрессивного поведения. Данная гипотеза предполагает вовлечение НТФ в механизмы, лежащие в основе генетически детерминированной агрессии, и подразумевает необходимость трофической поддержки нейротрансмиттерных систем, вовлеченных в агрессию. Поскольку ряд нейродегенеративных и психических заболеваний сопряжен с повышенной агрессивностью, данные о вовлечении НТФ в её механизмы позволят выработать новые подходы и стратегии коррекции патологической агрессии.

Также полученные данные будут использоваться в курсе лекций «Молекулярные и клеточные основы нейропластичности» для магистрантов факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Обнаружено усиление хищнической и патологической агрессии у крыс с высоким уровнем генетически детерминированного защитно-оборонительного агрессивного поведения.
2. Генетически детерминированное агрессивное поведение связано с усилением экспрессии BDNF, что выражается в повышении уровня мРНК гена *Bdnf*, а также уровня белка proBDNF и зрелой формы BDNF.

3. Наблюдаются значительные различия как в уровнях мРНК, так и в уровне мономерной и димерной форм зрелого белка GDNF, а также его предшественника proGDNF между ручными и агрессивными крысами, что указывает на вовлечение GDNF в механизмы генетически детерминированной агрессии.
4. У крыс с высоким уровнем защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом, наблюдается увеличение экспрессии CDNF в ряде структур головного мозга. Значительно увеличивается уровень мРНК гена *Cdnf* в большинстве исследованных структур мозга высокоагрессивных крыс, а также уровень белка предшественника preCDNF в гиппокампе, гипоталамусе и зрелой формы CDNF во фронтальной коре.
5. Зрелая форма белка CDNF детектируется только в области ядер шва среднего мозга, гиппокампе, фронтальной коре и чёрной субстанции, тогда как preCDNF наблюдается во всех исследуемых структурах головного мозга.

Апробация работы

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на: 17th Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society (Uppsala, Sweden, 2015), 10th Annual Canadian Neuroscience Meeting (Toronto, Canada, 2016), 10th FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark, 2016).

Публикации

Материал диссертации представлен в 9 публикациях, в том числе в 6 статьях в отечественных (2) и зарубежных (4) реферируемых журналах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Эксперименты проводились на взрослых самцах серых крыс (*Rattus norvegicus*), селекционированных в Институте цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирск в течение 85 поколений на высокий уровень агрессии, вызванной страхом по отношению к человеку, или ее отсутствие (Naumenko et al., 1989, Plyusnina, Oskina, 1997). Животные содержались по 4 особи в металлических клетках размером 50x33x20 см в стандартных лабораторных условиях (температура 18-22°C, относительная влажность 50-60%, естественное освещение (12 часов света и 12 часов темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде.

Для выполнения поведенческих экспериментов за два дня до эксперимента крысы возрастом 6 месяцев и весом 300-350 г были рассажены в индивидуальные клетки для снятия групповых эффектов. Эксперименты были одобрены этической комиссией Института Цитологии и Генетики (протокол №29 от 02.10.2015). Все эксперименты записывались на видеокамеру, с последующей обработкой с помощью программы, разработанной в лаборатории эволюционной генетики, которая позволяет оценить число и время проявления каждого поведенческого паттерна (Плюснина и др., 2003).

В эксперименте по определению уровня экспрессии НТФ использовали по 8 интактных животных каждой линии. После декапитации из мозга были выделены следующие структуры: гиппокамп, фронтальная кора, область ядер шва среднего мозга, стриатум, гипоталамус, черная субстанция, прилежащие ядра и миндалевидный

комплекс. Структуры мозга были заморожены в жидком азоте и хранились при -80°C до последующих процедур.

Содержание экспериментальных животных и все процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80023), 1996.

Поведенческие тесты

Все поведенческие тесты выполнялись на интактных животных.

Тест на защитно-оборонительную агрессию, вызванную страхом (тест на предъявление перчатки). В возрасте 6 месяцев, по 25 ручных и агрессивных самцов были подвергнуты тесту на предъявление перчатки для определения уровня агрессивности. Уровень выраженности защитно-оборонительной агрессии оценивался по шкале от -4 до +4 (Plyusnina, Oskina, 1997; Plyusnina et al., 2009).

Тест на межсамцовую агрессию на нейтральной территории. В тесте было использовано по 12 самцов из ручной и агрессивной линий и эквивалентное количество самцов линии Вистар. Ручных и агрессивных животных попарно ссаживали с самцами линии Вистар в незнакомой клетке ($40 \times 40 \times 60$ см), которая была разделена на два равных отсека перегородкой (Naumenko et al., 1989). В отсеки помещали крыс одинаковой массы, а затем убирали перегородку и течение 10 мин регистрировали различные виды поведения.

Агонистическое поведение оценивали по поведенческим показателям описанных в Пошивалов, 1978 и De Boer et al., 2003, а именно латентному периоду первого агрессивного взаимодействия и числу атак. Кроме того, оценивали суммарное время социального неагрессивного поведения, которое включало латентное время первого приближения и обнюхивания интродера.

Тест на патологическую агрессию по отношению к ювенильному самцу. Для данного эксперимента было взято по 12 самцов из агрессивной и ручной линий, в качестве «оппонентов» были использованы ювенильные самцы той же линии, что и тестируемое животное, в возрасте 19-21 дней. Животных попарно ссаживали с соответствующим ювенильным самцом в незнакомой клетке ($40 \times 40 \times 60$ см), которая была разделена на два равных отсека перегородкой, а затем убирали перегородку и регистрировали различные виды поведения. Но поскольку у агрессивных животных атака носила патологический характер (укусы были направлены в наиболее уязвимые места оппонента и не прекращались после принятия последним субмиссивной позы), было принято решение не учитывать такой параметр как число атак и прекращать эксперимент после первой атаки. Если атаки не наблюдалось, то длительность теста составляла 10 мин.

Тест на агрессию хищника. Агрессию хищника изучали, подсаживая мышь в “домашнюю” клетку животного (Naumenko et al., 1989). За 30 минут до проведения теста клетку с резидентом помещали в комнату, где проводили эксперимент. По окончании 30-ти минутного периода адаптации к новой комнате жертву помещали в клетку. В данном тесте было использовано 9 ручных и 10 агрессивных самцов. В качестве жертвы использовали взрослых мышей линии C57BL6. Сразу после

проявления крысой первой атаки тест прекращали. В случае если таковой не наблюдалось, время тестирования составляло 10 мин. Оценивали процент животных, напавших на мышь. Кроме того, для крыс, напавших на жертву, регистрировали латентный период нападения.

Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени

Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent (“Life technologies”, USA) в соответствии с инструкцией производителя. РНК была обработана ДНКазой без РНКазной активности (1 ед. на пробу, 37°C, 10 мин), разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при -80°C. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее (Науменко, Куликов, 2006; Kulikov et al., 2005; Naumenko et al, 2008).

Реакция обратной транскрипции была проведена по стандартному протоколу, описанному ранее (Науменко, Куликов, 2006). Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20°C.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR). Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов, разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании “Биосан” (Новосибирск). 1 мкл кДНК смешивали с 19 мкл Master mix’a (R-414, Синтол, Москва, Россия), содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I. ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System (“Roche”, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94°C, 1 цикл; 10 сек при 94°C, 30 сек при 64°C (*rPol II*, *Gdnf*) и 59°C (*Bdnf*, *Cdnf*), 30 сек при 72°C, 40 циклов. В качестве внешнего экзогенного стандарта для контроля ПЦР была использована геномная ДНК, выделенная из ядер гепатоцитов самца Вистар по методу, предложенному Moisan с соавторами (Moisan et al., 1996). Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась для построения калибровочной кривой в координатах Ct (значение порогового цикла) – log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК), которая была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Для контроля специфичности амплификации использовался анализ кривой плавления для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*rPol II*), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Вестерн блот анализ

Цитозольный белок выделяли, гомогенизируя соответствующие структуры мозга в буфере, содержащем 10мМ Трис HCl, pH 7.2, 1мМ EDTA, 5мМ β-меркаптоэтанол и ингибиторы протеаз (GE Healthcare, США). Центрифугировали на 2000 g 15 мин при 4°C, отбирали супернатант, переносили в чистую пробирку и центрифугировали на 14000 g при 4°C 1 час. Количество общего белка оценивали с помощью BCA метода, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Образцы приводили к равной концентрации (1мг/мл) с помощью 4-кратного

Лемли буфера, содержащего 62 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 10% сахарозы, 2% SDS, 5% β -меркаптоэтанол и денатурировали в течение 5 минут при 95°C. Белок разделяли с помощью SDS-PAGE гель-электрофореза, используя 15%-ный (BDNF) и 12% (CDNF, GDNF) разделяющий гель, и переносили с помощью полусухого электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-rad Laboratories Ltd., USA) в течение ночи при силе тока 50мА. Для переноса использовали буфер, содержащий 0.19М глицина, 25мМ Трис-НСl рН 8.3 и 20% метанола. В качестве маркера использовали смесь Full Range RPN800E (GE Healthcare, США).

Для иммунодетекции белка мембрану блокировали с 5%-ным сухим обезжиренным молоком, разведенном в TBS-T буфере (Tris Bufferd Saline with Tween 20, Santa Cruz, USA), 1 час при комнатной температуре и инкубировали в течении ночи при 4°C с первичными антителами. Были использованы поликлональные антитела кролика к белку BDNF (1:200, sc-546, Santa Cruz, USA), GDNF (1:100, ab18956, Abcam, UK) и CDNF (1:1000, ab136329, Abcam, UK). В качестве внутреннего контроля были использованы поликлональные антитела кролика к β -тубулину (1:20000, ab6046, Abcam, UK). Отмывали мембрану 5×5 мин буфером TBS-T, добавляли вторичные поликлональные антитела козы, направленные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:10000 для BDNF, GDNF, CDNF и 1:20000 для β -тубулина, sc-2004, Santa Cruz, USA), и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Повторяли отмывку мембраны. Связанные антитела визуализировались с помощью Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), в соответствии с инструкцией производителя, и гелъдокументирующей системы Fusion FX7-820 System (Vilber Lourmat, France). Полученное изображение денситометрировали и количественно оценивали содержание белка при помощи программы Scion Image. Экспрессию белка выражали в относительных единицах, нормировали на экспрессию β -тубулина, которая конститутивна для мозга, и представляли, как процент от ручных животных.

Указанные антитела и методика позволили детектировать не только зрелые формы НТФ, но и уровни белков-предшественников. Так при исследовании уровней белка BDNF, помимо зрелой формы с молекулярным весом 14кДа, была также детектирована форма белка-предшественника proBDNF с молекулярным весом 32кДа. Что касается других НТФ, то при использовании анти-GDNF антител было детектировано три формы белка GDNF: белок-предшественник proGDNF на 38 кДа (Sun et al., 2014), димер зрелой формы GDNF на 28 кДа (Lin et al., 1993; Euteneuer et al., 2013), а также мономер зрелой формы GDNF на 24 кДа (в соответствии с инструкцией к антителам). При использовании анти-CDNF антител также выявлено две формы белка: зрелая форма на 24 кДа (в соответствии с инструкцией к антителам) и дополнительная полоса на 32 кДа, которую определили, как preCDNF.

Статистическая обработка результатов

Все данные представляли, как $m \pm SEM$. Статистическую обработку данных, полученных при изучении поведения крыс в тестах на разные виды агрессии (кроме теста на предъявление перчатки), проводили с помощью непараметрического анализа ANOVA Крускала–Уоллис.

Все остальные результаты, включая тест реакции на перчатку, сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим сравнением по Фишеру. Предварительно данные были проверены на принадлежность крайних вариантов к совокупности, выбраковка осуществлялась с помощью критерия Диксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Связь защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом, с иными типами агрессивного поведения

Крысы с генетически детерминированным высоким уровнем агрессивной реакции на человека или ее отсутствием существенно различались ($F_{(1,49)}=584.72$, $p<0.001$) по выраженности защитно-оборонительной агрессии, вызванной страхом (Рис. 1).

Значительная разница между агрессивными и неагрессивными крысами была обнаружена в тесте на хищническую агрессию (Рис. 2). Было показано существенное снижение латентного времени атаки ($H_{(2,N=19)}=9.55$, $p<0.01$) у агрессивных животных по сравнению с ручными. В то же время существенных различий по проценту атакующих животных между агрессивными и неагрессивными крысами обнаружено не было. Процент крыс, атакующих мышей составил 66,6% для неагрессивных и 90% для агрессивных крыс.

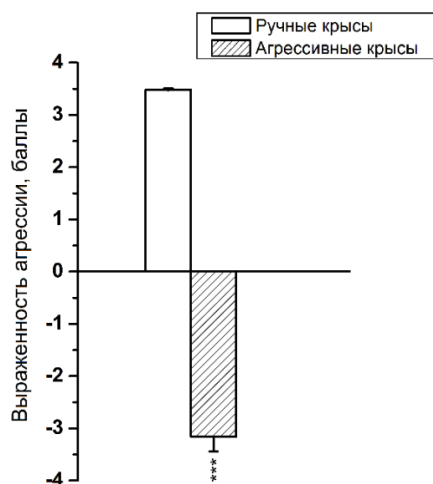


Рис.1 Уровень выраженности защитно-оборонительной агрессии в тесте на предъявление перчатки. *** $p<0.001$ – по сравнению с ручными животными

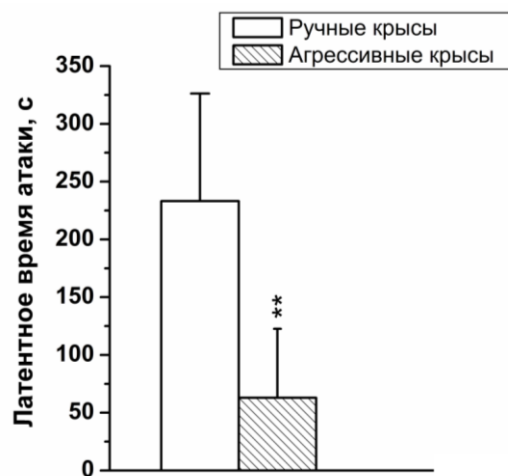


Рис. 2 Латентное время атаки в тесте на хищническую агрессию у высокоагрессивных и ручных крыс. ** $p<0.01$ – по сравнению с ручными животными

Неожиданные и очень интересные результаты были получены в тесте на патологическую агрессию по отношению к ювенильному самцу. Была выявлена значительная разница в выраженности этого типа агрессивного поведения между высокоагрессивными и ручными животными (Рис. 3). Было выявлено значительное влияние генотипа на латентное время первой атаки ($H_{(1,N=24)}=6.18$, $p=0.01$) и латентное время неагрессивного социального взаимодействия ($H_{(1,N=20)}=9.73$, $p<0.01$). Интересно отметить, что крысы с генетически детерминированным высоким уровнем агрессии, вызванной страхом, нападали на ювенильного самца значительно быстрее по сравнению

с неагрессивными крысами. В то же время, агрессивные крысы продемонстрировали увеличение латентного времени первого неагрессивного социального контакта, что указывает на нарушение социального поведения у данных животных.

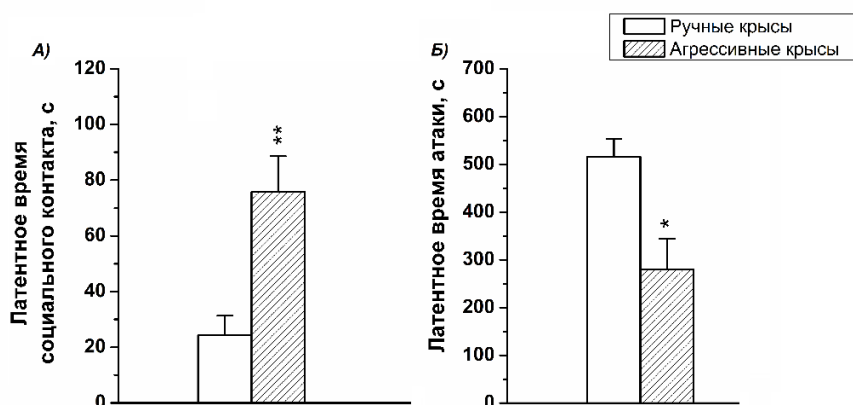


Рис. 3 Поведение высокоагрессивных и ручных крыс в тесте на патологическую агрессию по отношению к ювенильному самцу. А) латентное время первого социального контакта, Б) латентное время первой атаки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – по сравнению с ручными крысами.

Тем не менее, неагрессивные крысы также нападали на ювенильных самцов, хотя они показали значительно увеличенное латентное время первого агрессивного контакта и сниженное латентное время первого неагрессивного контакта по сравнению с агрессивными крысами.

Крысы с генетически детерминированным высоким уровнем агрессивной реакции на человека и ее отсутствием не отличались по выраженности межсамцовой агрессии (Рис. 4). Однако ни один из исследованных самцов неагрессивной линии не показал агрессивной реакции по отношению к крысам линии Вистар и, следовательно, латентное время атаки было равно продолжительности теста (600 сек). Использование непараметрического анализа Крускала-Уоллиса позволило выявить влияние генотипа на латентное времени атаки только на уровне тенденции ($H_{(1, N=24)} = 3.26$, $p = 0.07$). Никаких существенных различий в других поведенческих паттернах в данном тесте обнаружено не было.

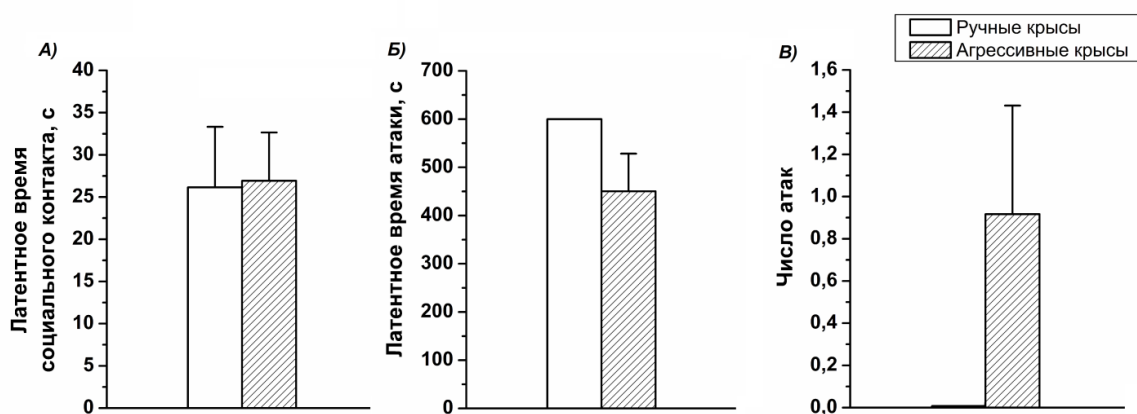


Рис. 4 Поведение высокоагрессивных и ручных крыс в тесте на межсамцовую агрессию. А) латентное время первого социального контакта, Б) латентное время первой атаки, В) количество атак.

Таким образом, крысы, селекционированные в течение 85 поколений на высокий уровень защитно-оборонительной агрессии или на ее отсутствие, также демонстрируют значительные различия, как в выраженности агрессии хищника, так и в социальном поведении. Нами обнаружено усиление хищнической агрессии и асоциального

поведения (инфантицид) у крыс, генетически предрасположенных к агрессии, вызванной страхом, по сравнению с неагрессивными животными. Вместе с этим, агрессивные и ручные крысы не отличались по выраженности межсамцовой агрессии, что указывает на различные механизмы, лежащие в основе регуляции защитно-оборонительной и межсамцовой агрессии.

Представляется вероятным, что длительная селекция на высокий уровень защитно-оборонительной агрессии усилила и другие виды агрессивного поведения, результатом чего стало повышение патологической агрессии.

Экспрессия BDNF у крыс с генетической предрасположенностью к высокой агрессивности или ее отсутствию

Значительное увеличение уровня мРНК данного гена было зафиксировано в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,14)}=9.45$, $p<0.01$), фронтальной коре ($F_{(1,13)}=5.72$, $p<0.05$), прилежащих ядрах ($F_{(1,10)}=29.08$, $p<0.001$), миндалевидном комплексе ($F_{(1,14)}=7.41$, $p<0.01$) и гипоталамусе ($F_{(1,13)}=6.53$, $p<0.05$) у высокоагрессивных крыс по сравнению с ручными животными (Рис. 5). Изменений в уровне мРНК BDNF в гиппокампе, стриатуме и черной субстанции обнаружено не было ($F_{(1,14)}=0.90$, $p=0.36$; $F_{(1,11)}=1.36$, $p=0.27$ и $F_{(1,13)}=0.16$, $p=0.70$ соответственно) (Рис. 5).

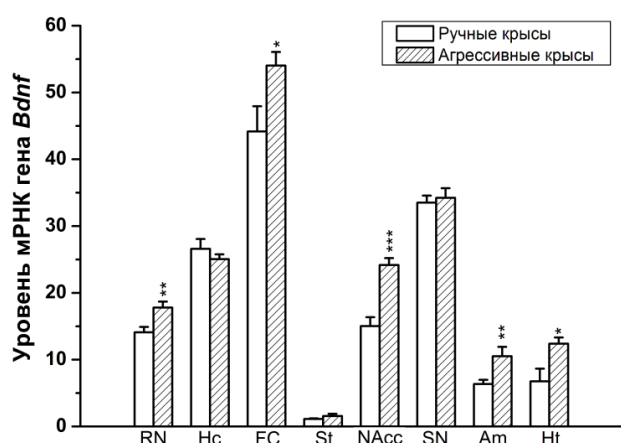
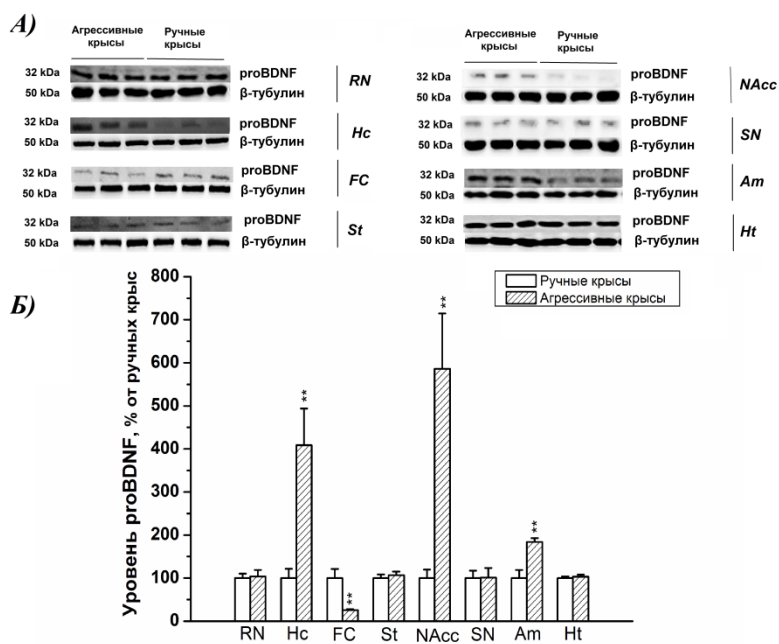


Рис. 5 Уровень мРНК гена *Bdnf* в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. Экспрессия генов представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий rPol2. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ – по сравнению с ручными животными.

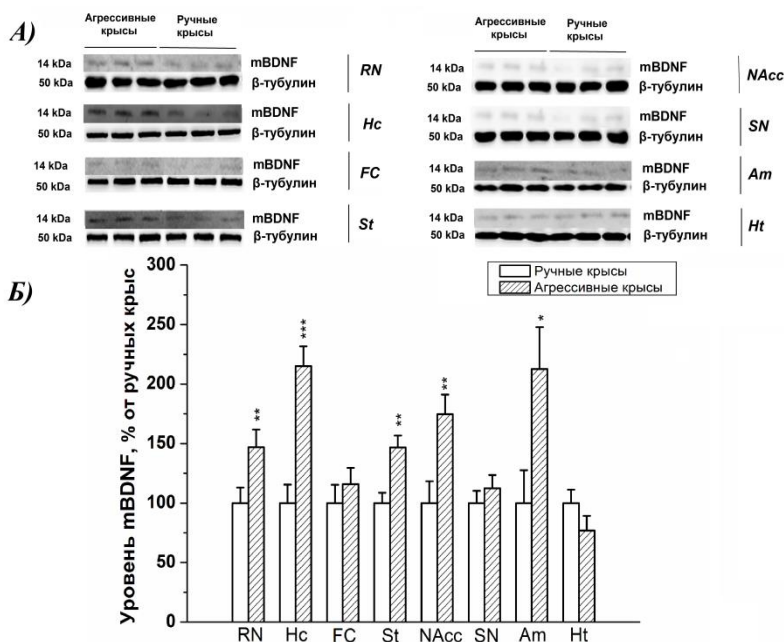
При исследовании уровня белка proBDNF было выявлено достоверное увеличение уровня данной формы в гиппокампе ($F_{(1,12)}=12.36$, $p<0.01$), прилежащих ядрах ($F_{(1,10)}=9.85$, $p<0.01$) и миндалевидном комплексе ($F_{(1,12)}=15.83$, $p<0.01$) агрессивных крыс по сравнению с ручными (Рис. 6). В то же время противоположные изменения были найдены во фронтальной коре ($F_{(1,11)}=10.47$, $p<0.01$). При изучении уровня данного белка в ядрах шва среднего мозга ($F_{(1,11)}=0.04$, $p=0.85$), стриатуме ($F_{(1,8)}=0.31$, $p=0.60$), черной субстанции ($F_{(1,10)}=0.001$, $p=0.98$) и гипоталамусе ($F_{(1,10)}=0.32$, $p=0.59$) не было обнаружено никаких достоверных различий между высокоагрессивными и ручными животными (Рис 6).

Также были обнаружены значительные изменения в уровне зрелого белка BDNF. Увеличение уровня данной формы белка было выявлено в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,11)}=5.44$, $p<0.05$), гиппокампе ($F_{(1,12)}=25.32$, $p<0.001$), стриатуме ($F_{(1,8)}=12.19$, $p<0.001$), прилежащих ядрах ($F_{(1,11)}=9.11$, $p<0.01$) и миндалевидном комплексе ($F_{(1,8)}=6.30$, $p<0.05$) высокоагрессивных животных при сравнении с неагрессивными крысами (Рис 7).



*Рис. 6 Уровень белка proBDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка proBDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. ** $p < 0.01$ – по сравнению с ручными животными.*

Во фронтальной коре ($F_{(1,11)}=0.61$, $p=0.45$), черной субстанции ($F_{(1,10)}=0.63$, $p=0.45$), а также в гипоталамусе ($F_{(1,11)}=1.86$, $p=0.20$) не было найдено никаких достоверных различий между агрессивными и ручными животными (Рис 7).



*Рис. 7 Уровень белка BDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка BDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с ручными животными.*

Обнаруженные изменения в экспрессии BDNF хорошо соотносятся с данными о повышенном уровне BDNF у мышей линии АВН, с высоким уровнем агрессивности, вызванной изоляцией (Lang et al, 2009). Также полученные данные согласуются с целым рядом работ, показывающих увеличение уровня BDNF при актах повторной агрессии и победах в агонистических взаимодействиях (Fiore et al, 2003; Kudryavtseva et al, 2010; Taylor et al, 2011). Вместе с этим, выявленная нами связь между высоким уровнем экспрессии BDNF и агрессивным поведением противоречит данным, полученным на животных с различными типами нокаута гена, кодирующего BDNF. Однако, первичный

дефицит BDNF, приводящий к существенным нарушениям в закладке и функциях 5-НТ системы, сам по себе является мощным триггером развития высокоагрессивного фенотипа. Следовательно, в данном случае мы можем говорить о разных механизмах развития агрессивного поведения, противоположным образом вовлекающих BDNF.

Примечательно, что высокий уровень экспрессии BDNF обнаружен нами в миндалевидном комплексе высокоагрессивных крыс. Широко известно, что данная структура мозга участвует в регуляции агрессивного поведения, а также является ключевой в консолидации памяти о страхе и поражении (Miczek et al, 2007). В ряде работ показано, что вызванное экспериментально нарушение в созревании зрелого BDNF из предшественника proBDNF в миндалевидном комплексе приводило к существенному снижению памяти о страхе (Ou, Gean, 2007) и поражении (Dulka et al., 2016). Таким образом, наши данные указывают на то, что повышение экспрессии BDNF в данной структуре мозга может быть связано с регуляцией памяти о страхе у крыс, которых в течение 85 поколений отбирали на высокий уровень агрессии, вызванной именно страхом. Также в консолидации и реконсолидации памяти о страхе (в основном контекстуальной) значительную роль играет гиппокамп (Izquierdo et al., 2016), в котором у высокоагрессивных крыс наблюдается значительное увеличение уровня белка BDNF и можно предположить, что усиление экспрессии данного НТФ в гиппокампе высокоагрессивных крыс способствует реализации у них памяти о страхе. Кроме того, победа в схватках (конфликт-индуцированное обучение) повышает уровень BDNF в гиппокампе (Taylor et al., 2011). Все это указывает на то, что высокий базовый уровень BDNF в свою очередь может создавать условия для значительной предрасположенности высокоагрессивных крыс к агонистическому поведению.

Привлекает внимание и высокая экспрессия BDNF в прилежащих ядрах высокоагрессивных крыс. Данная структура мозга не только отвечает за усиление рефлекторных ответов самцов-доминантов в агрессивных столкновениях, но и в равной степени вовлечена в реакцию социального избегания при поражении в агонистических контактах (Takahashi, Miczek, 2014). В целом активность прилежащих ядер характеризует как индивидуальную реакцию на агрессивную конфронтацию, так и готовность к такому событию (Miczek et al, 2007). В соответствии с представлениями о функциях прилежащих ядер в агонистическом поведении и роли BDNF, можно предположить, что усиление экспрессии данного НТФ может создавать условия, как для социального избегания, так и для высокой готовности агрессивных крыс вступать в конфронтацию. Выявленные нами признаки усиленной агрессивности и асоциального поведения подтверждают данное предположение.

Нами также было обнаружено повышение экспрессии BDNF в области ядер шва среднего мозга высокоагрессивных крыс. К настоящему времени накопилось значительное число свидетельств тесного взаимодействия BDNF и 5-НТ системы мозга (Homberg et al., 2014), демонстрирующих значительную роль данного НТФ как в созревании, так и дальнейшем функционировании 5-НТ нейронов. Поскольку ранее сообщалось о снижении активности 5-НТ системы у крыс, подвергшихся отбору на высокий уровень агрессивности по отношению к человеку, либо ее отсутствию (Porova

et al, 1998; Popova et al, 2005; Kondaurova et al, 2016), то можно предположить участие BDNF в поддержании и защите 5-НТ нейронов.

Неоднозначные изменения выявлены во фронтальной коре крыс, селекционированных на высокий уровень агрессии вызванной страхом. Повышение уровня мРНК сопровождалось снижением уровня proBDNF, но в то же время не отражалось на уровне зрелого белка. Причина данной рассогласованности в уровнях мРНК и различных форм белка может лежать в сложной регуляции экспрессии BDNF. В частности, существенный вклад могут вносить различные функциональные транскрипты BDNF, экспрессия и распределение которых в мозге может различаться на разных этапах развития (Perovic et al., 2013). Хочется отметить, что фронтальная кора – единственная из исследованных нами структур, где наблюдается выраженный дисбаланс в процессе созревания белка BDNF. В большинстве остальных структур просматривается определённая согласованность между уровнем proBDNF и зрелой формой, что указывает на усиление экспрессии и, как следствие, функций именно зрелого белка BDNF.

Экспрессия GDNF у крыс с генетической предрасположенностью к высокой агрессивности или ее отсутствию

Значительные различия в экспрессии GDNF, были выявлены между крысами с высоким уровнем генетически детерминированного агрессивного поведения или его отсутствием. У агрессивных животных по сравнению с ручными было обнаружено достоверное увеличение уровня мРНК гена *Gdnf* в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,14)}=16.59, p<0.001$) (Рис 8).

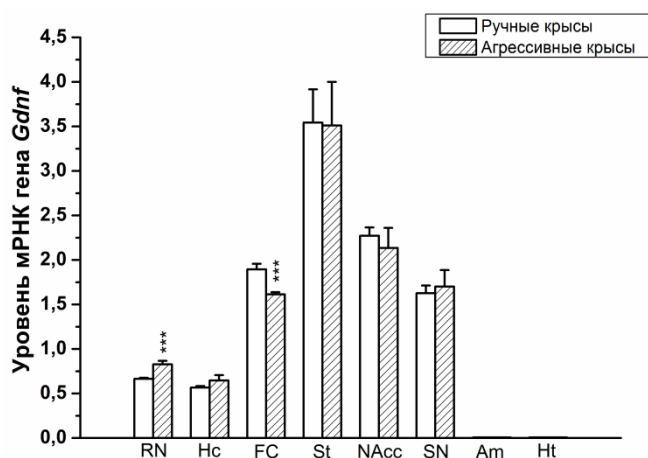


Рис. 8 Уровень мРНК гена *Gdnf* в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. Экспрессия генов представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий *rPol2*. *** $p<0.001$ – по сравнению с ручными животными.

Противоположные изменения были выявлены во фронтальной коре ($F_{(1,11)}=19.49, p<0.001$) (рис 8). В то же самое время в гиппокампе ($F_{(1,13)}=1.45, p=0.25$), стриатуме ($F_{(1,14)}=0.003, p=0.96$), прилежащих ядрах ($F_{(1,11)}=0.27, p=0.61$) и черной субстанции ($F_{(1,14)}=0.13, p=0.73$) никаких достоверных различий между агрессивными и ручными крысами не было обнаружено. Также нужно отметить, что в миндалевидной области и гипоталамусе мРНК данного гена не детектировалась.

Было выявлено снижение уровня proGDNF в области ядер шва среднего мозга у крыс с высоким уровнем генетически детерминированной агрессии ($F_{(1,10)}=12.89, p<0.01$) (Рис 9). Однако в остальных исследуемых структурах никаких статистически значимых

различий обнаружено не было ($F_{(1,11)}=0.99$, $p=0.34$ для гиппокампа, $F_{(1,12)}=1.39$, $p=0.26$ для фронтальной коры, $F_{(1,10)}=0.007$, $p=0.94$ для черной субстанции, $F_{(1,10)}=2.23$, $p=0.17$ для миндалевидного комплекса, $F_{(1,7)}=0.32$, $p=0.59$ для гипоталамуса) (Рис 9). Более того в стриатуме и прилежащих ядрах уровень белка proGDNF не детектировался.

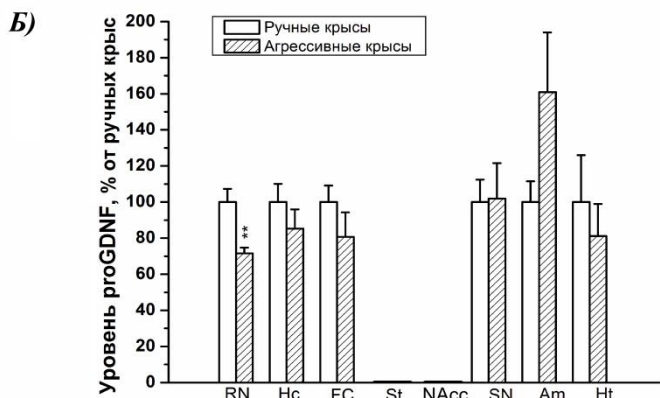
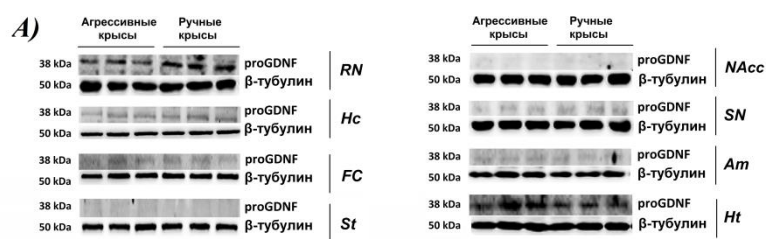


Рис. 9 Уровень белка proGDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка proGDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. ** $p<0.01$ – по сравнению с ручными животными.

Интересно отметить, что было выявлено две формы зрелого GDNF – мономерная (24 kDa) и димерная (32 kDa). Также хочется отметить, что крысы с высоким уровнем агрессивности, вызванной страхом, отличаются от ручных как уровнем мономерной, так и уровнем димерной формы данного белка.

Было обнаружено двукратное увеличение уровня мономера GDNF в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,10)}=9.19$, $p<0.01$), а также в миндалевидном комплексе ($F_{(1,7)}=7.46$, $p<0.05$) высокоагрессивных животных по сравнению с ручными (Рис 10).

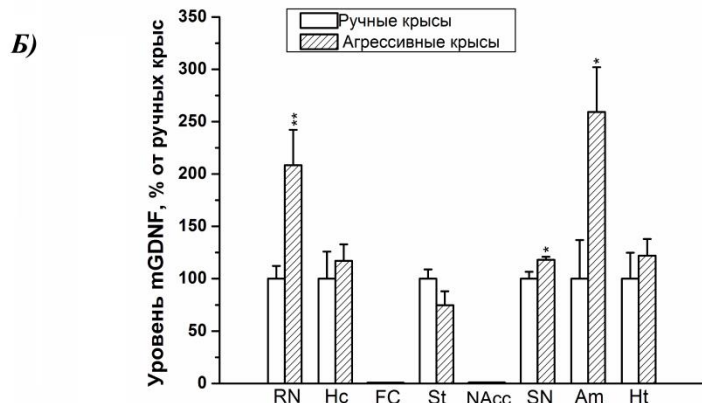
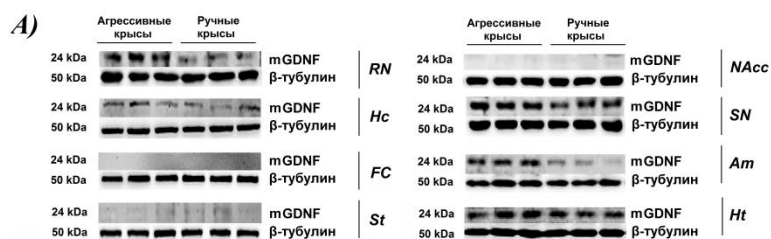


Рис. 10 Уровень белка GDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка GDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ – по сравнению с ручными животными.

Вместе с тем достоверно более высокий уровень GDNF был найден в черной субстанции ($F_{(1,11)}=5.49$, $p<0.05$) агрессивных крыс. Но в то же время в гиппокампе ($F_{(1,12)}=0.32$, $p=0.58$), стриатуме ($F_{(1,12)}=2.51$, $p=0.14$) и гипоталамусе ($F_{(1,9)}=0.59$, $p=0.46$) не выявлено никаких различий между исследуемыми животными (Рис 10). Кроме того, во фронтальной коре и прилежащих ядрах мономерная форма белка не была обнаружена.

В отличие от мономерной, димерная форма была зафиксирована во всех исследуемых структурах мозга. При этом в гиппокампе высокоагрессивных крыс наблюдалось снижение уровня димеров GDNF ($F_{(1,9)}=6.15$, $p<0.05$), тогда как в миндалевидном комплексе, наоборот, продемонстрировано увеличение ($F_{(1,11)}=34.97$, $p<0.001$) по сравнению с ручными животными (Рис 11).

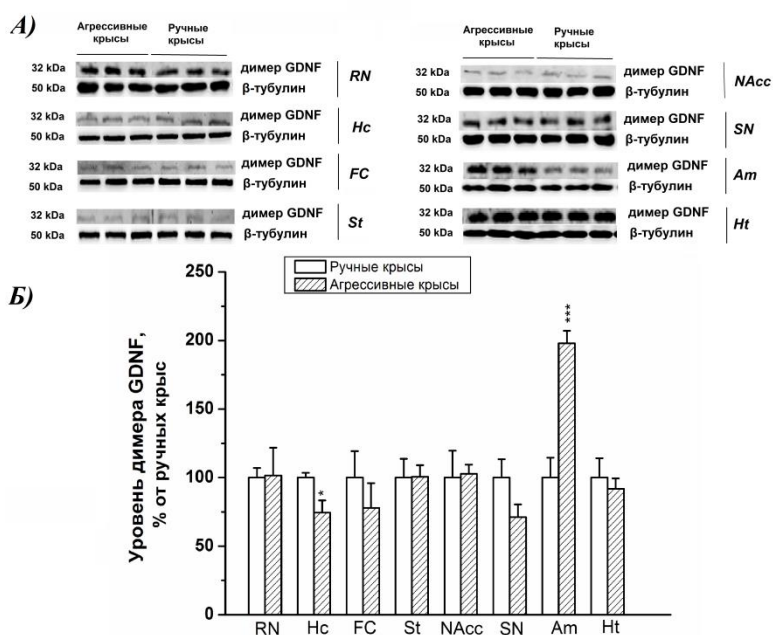


Рис. 11 Уровень димерной формы белка GDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ – по сравнению с ручными животными.

Но в остальных исследуемых структурах – ядрах шва среднего мозга ($F_{(1,12)}=0.004$, $p=0.95$), фронтальной коре ($F_{(1,12)}=0.69$, $p=0.42$), стриатуме ($F_{(1,11)}=0.002$, $p=0.97$), прилежащих ядрах ($F_{(1,12)}=0.02$, $p=0.90$), черной субстанции ($F_{(1,11)}=2.93$, $p=0.12$) и гипоталамусе ($F_{(1,8)}=0.31$, $p=0.59$) – не было обнаружено никаких различий (Рис 11).

Увеличение экспрессии GDNF в области ядер шва среднего мозга скорее всего не является случайным. В литературе имеются свидетельства о взаимодействии GDNF и 5-НТ системы (Hisaoka et al., 2004; Tsuchioka et al., 2008; Naumenko et al., 2013). Можно предположить, что, как и в случае с BDNF, GDNF участвует в защите и поддержании 5-НТ нейронов.

Также привлекает внимание отсутствие в стриатуме и прилежащих ядрах proGDNF. В первую очередь, это указывает на сложные механизмы, лежащие в основе трансляции, созревания и распределения GDNF в головном мозге. С другой стороны, GDNF имеет сложный механизм посттранскрипционной модификации. Известно, что мРНК гена *Gdnf* транслируется в preproGDNF с последующим специфическим процессингом белка. (Noori-Zadeh et al., 2014), который как раз и может привести к снижению proGDNF и увеличению GDNF.

Интересно отметить, что в отличие от проформы и мономерного зрелого белка, димерная форма GDNF присутствует во всех исследованных нами структурах головного мозга крыс. Факт гомодимеризации GDNF был отмечен ещё в первой работе посвящённой данному НТФ (Lin et al, 1993), и сегодня эта его особенность хорошо известна (Eutenauer et al., 2013). Тем не менее, данных о вовлечении димеров GDNF в регуляцию каких-либо форм поведения до настоящего времени не было.

Привлекает наше внимание, что в гипоталамусе и миндалевидном комплексе не было зафиксировано мРНК гена, кодирующего GDNF, но обнаружено присутствие всех детектируемых форм данного белка. Известно, что рецепторы GDNF экспрессируются во многих гипоталамических областях (Golden et al., 1998). В тоже время белок и рецепторы GDNF наблюдаются и в миндалевидном комплексе (Balaszczuk et al., 2013; Maheu et al, 2015). Все это указывает на то, что в указанные структуры мозга GDNF поступает уже после трансляции. Внутриклеточный транспорт белка GDNF плохо изучен, однако имеющиеся данные говорят о наличии как антероградного, так и ретроградного транспорта в пределах ДА системы мозга (Ito, Enomoto, 2016). Также GDNF может транспортироваться по ГАМКергическим нейронам (Hidalgo-Figueroa et al., 2012). Таким образом, GDNF может попадать в миндалевидный комплекс и гипоталамус по проекциям ДА и ГАМКергических нейронов. Нельзя не отметить значительное увеличение уровня как зрелой, так и димерной формы белка GDNF в миндалевидном комплексе высокоагрессивных крыс по сравнению с ручными. Вероятно, высокий уровень зрелой и димерной формы GDNF в данной структуре мозга, а также мономерной формы в чёрной субстанции направлен на усиление дофаминергической иннервации и/или активности ДА нейронов. Однако данное предположение является в большей степени гипотетическим, поскольку на сегодняшний день существует всего несколько работ, в которых было бы проведено сравнительное исследование активности ДА системы у высокоагрессивных и ручных крыс. Одна из работ посвящена исследованию уровня ДА и плотности D1 и D2 рецепторов в мезолимбических областях мозга ручных крыс по сравнению с крысами дикого типа (Nikulina et al., 1992). А в исследовании Albert с соавт., (2008) сравнивался уровень ДА уже между ручными и агрессивными крысами, но достоверных различий выявлено не было.

Экспрессия CDNF у крыс с генетической предрасположенностью к высокой агрессивности или ее отсутствию

Практически во всех исследуемых структурах мозга высокоагрессивных животных было выявлено увеличение уровня мРНК гена *Cdnf* по сравнению с ручными (Рис 12). Двукратное увеличение уровня мРНК было обнаружено в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,14)}=119.28$, $p<0.001$), гиппокампе ($F_{(1,14)}=26.15$, $p<0.001$) и гипоталамусе ($F_{(1,14)}=16.10$, $p<0.001$). Значительное увеличение было продемонстрировано во фронтальной коре ($F_{(1,11)}=31.38$, $p<0.001$) и черной субстанции ($F_{(1,14)}=15.72$, $p<0.001$) агрессивных животных по сравнению с ручными. Также достоверно более высокий уровень мРНК гена *Cdnf* был обнаружен в прилежащих ядрах высокоагрессивных крыс ($F_{(1,10)}=5.35$, $p<0.05$). В то же самое время в стриатуме ($F_{(1,12)}=1.37$, $p=0.27$) и

миндалевидном комплексе ($F_{(1,14)}=1.20$, $p=0.29$) никаких различий между агрессивными и ручными крысами обнаружено не было (рис 12).

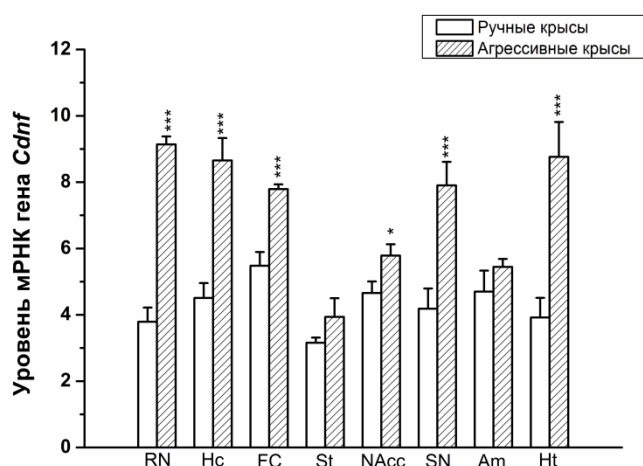


Рис. 12 Уровень мРНК гена *Cdnf* в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. Экспрессия генов представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий *rPol2*. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ – по сравнению с ручными животными.

Значительные различия в уровне мРНК гена *Cdnf*, однако, не сопровождались столь же значительными различиями в уровне как зрелой формы белка CDNF, так и его предшественника preCDNF. Так было показано, что у высокоагрессивных крыс уровень белка preCDNF значительно выше в гиппокампе ($F_{(1,10)}=7.12$, $p<0.05$) и гипоталамусе ($F_{(1,11)}=12.20$, $p<0.01$), тогда как во фронтальной коре ($F_{(1,10)}=6.05$, $p<0.05$), наоборот, наблюдается достоверное снижение уровня данного белка по сравнению с ручными животными (Рис 13).

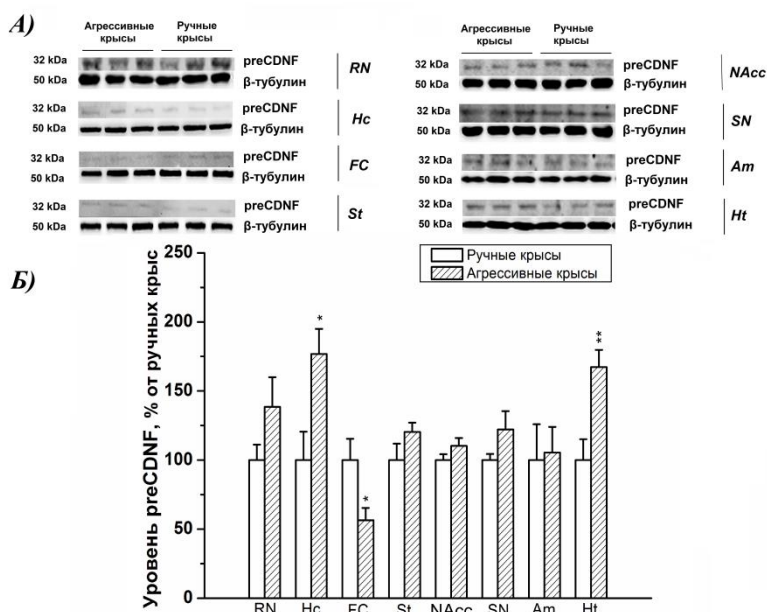


Рис. 13 Уровень белка preCDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка preCDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ – по сравнению с ручными животными.

В то же время в области ядер шва среднего мозга ($F_{(1,11)}=2.30$, $p=0.16$), стриатуме ($F_{(1,11)}=2.01$, $p=0.18$), прилежащих ядрах ($F_{(1,10)}=2.11$, $p=0.18$), черной субстанции ($F_{(1,10)}=2.49$, $p=0.15$) и миндалевидном комплексе ($F_{(1,11)}=0.03$, $p=0.87$) не было обнаружено достоверных отличий между агрессивными и неагрессивными крысами (Рис 13).

Что касается зрелой формы белка, то она детектировалась не во всех исследованных структурах. В стриатуме, прилежащих ядрах, миндалевидном комплексе

и гипоталамусе зрелой формы белка CDNF найдено не было. Среди структур, в которых удалось обнаружить данную форму белка, статистически значимые различия были выявлены только во фронтальной коре. В этой структуре наблюдается достоверное увеличение уровня белка CDNF у высокоагрессивных крыс по сравнению с ручными ($F_{(1,9)}=6.48$, $p<0.05$) (Рис 14). В ядрах шва среднего мозга ($F_{(1,10)}=2.05$, $p=0.18$), гиппокампе ($F_{(1,10)}=0.04$, $p=0.84$) и черной субстанции ($F_{(1,6)}=1.42$, $p=0.28$) различия между исследуемыми животными выявлены не были (Рис 14).

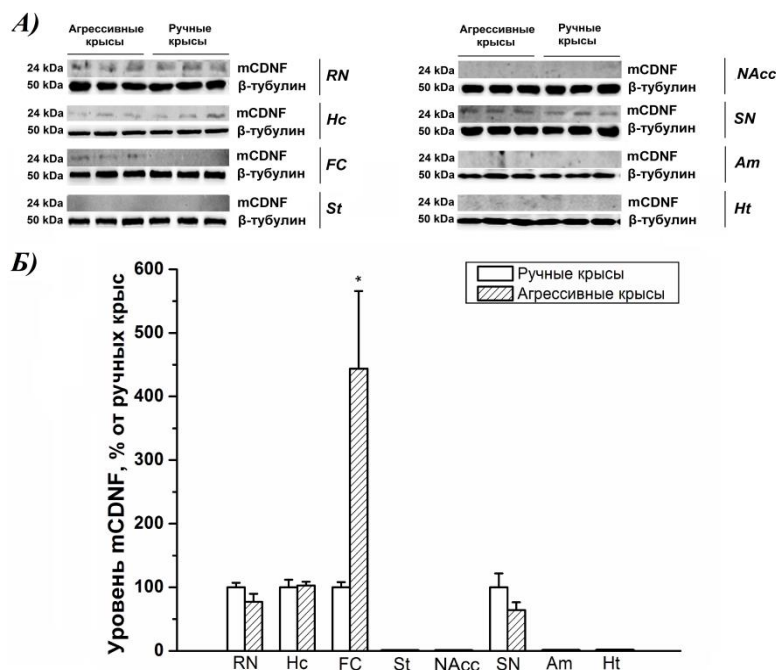


Рис. 14 Уровень белка CDNF в структурах мозга у высокоагрессивных и ручных крыс. А) Результат иммуноблота на мембране; Б) Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала. Уровень белка CDNF представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень β -тубулина. RN – ядра шва среднего мозга, Hc – гиппокамп, FC – фронтальная кора, St – стриатум, NAcc – прилежащие ядра, SN – черная субстанция, Am – миндалевидный комплекс, Ht – гипоталамус. * $p<0.05$ – по сравнению с ручными животными.

Известно, что по механизму действия CDNF существенно отличается от остальных НТФ. Так, для осуществления его функций необходимо наличие каких-либо патологических процессов, таких как воспаление или стресс ЭПР (Voutilainen et al., 2015). Ранее нами было показано увеличение порога нейронального апоптоза у высокоагрессивных крыс, что в частности выражалось в снижении уровня мРНК гена *Bax* в гиппокампе данных животных (Ильчибаева и др., 2016). В то же время известно, что CDNF ингибирует апоптоз через прямое взаимодействие с BAX (Hellman et al., 2011). Исходя из этого, усиление экспрессии CDNF в гиппокампе может быть напрямую связано со снижением экспрессии гена проапоптотического белка BAX.

Кроме того, нами было выявлено, что в гипоталамусе высокоагрессивных крыс наблюдается повышенный уровень мРНК гена, кодирующего каспазу-3, основной эффектор апоптоза (Ильчибаева и др., 2016). Таким образом, на основании имеющихся в литературе данных, можно предположить, что усиление транскрипционной активности гена *Cdnf* и повышение уровня самого белка в различных структурах могут быть направлены на компенсацию проапоптотических процессов в мозге высокоагрессивных крыс. Точное представление о том, каким образом и в какой степени данные процессы происходят в мозге этих животных, остаётся предметом дальнейшего исследования. Хочется отметить тот факт, что высокий уровень экспрессии CDNF (по крайней мере, его транскриптов) наблюдается как в ДА, так и 5-НТ структурах и их проекционных областях. Таким образом, на основании особенностей биологии CDNF можно

заклучить, что он имеет универсальный принцип действия, для реализации которого не является принципиальным вовлечение той или иной нейротрансмиттерной системы. Другими словами, при наличии клеточного стресса CDNF будет одинаково оказывать свои эффекты как в ДА, так и в 5-НТ системе мозга. А учитывая тот факт, что активность 5-НТ системы снижена у высокоагрессивных животных, то неудивительно, что мы наблюдаем активацию экспрессии CDNF в исследуемых серотонинергических структурах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные указывают на тесную связь между защитно-оборонительной, хищнической и патологической агрессией, что позволяет предположить существование общих регуляторных механизмов, лежащих в основе этих типов агрессивного поведения. А сравнивая изменения в экспрессии исследованных НТФ нельзя не отметить как специфические, так и общие для каждого НТФ особенности. Поскольку все исследованные НТФ относятся к разным классам естественно предположить различные механизмы их действия. В частности, паттерн активности CDNF существенно выделяет его на фоне других нейротрофинов и ростовых факторов. Однако можно заметить и общие особенности, которые связаны с защитой 5-НТ и ДА нейротрансмиттерных систем. Также очень важным является наличие сходным образом направленных изменений в ряде структур головного мозга высокоагрессивных крыс (миндалевидный комплекс, гиппокамп, прилежащие ядра), участвующих в регуляции агрессивного поведения и памяти о страхе, что свидетельствует о вовлечении BDNF, GDNF и CDNF в формирование фенотипа со значительным уровнем агрессии, вызванной страхом.

Таким образом, полученные результаты позволяют сформулировать нейротрофическую гипотезу регуляции агрессивного поведения, которая постулирует необходимость поддержания нужного уровня нейропластических процессов в структурах мозга, участвующих в контроле агрессивного поведения. В соответствии с данной гипотезой, важной составной частью действия НТФ является трофическая поддержка нейротрансмиттерных систем, вовлеченных в агрессию.

ВЫВОДЫ

1. Длительный отбор на высокий уровень защитно-оборонительной агрессии, привёл к усилению хищнической и патологической агрессии, что указывает на тесную связь между данными типами агрессивного поведения.
2. Выявлено значительное повышение уровня мРНК гена *Bdnf* в области ядер шва среднего мозга, миндалевидном комплексе, прилежащих ядрах, гипоталамусе и фронтальной коре высокоагрессивных животных.
3. Обнаружено существенное увеличение уровня белка proBDNF и зрелой формы BDNF в гиппокампе, миндалевидном комплексе и прилежащих ядрах агрессивных животных, также у них отмечено повышение уровня зрелого белка BDNF в области ядер шва и стриатуме. Одновременно с этим, во фронтальной коре

- высокоагрессивных крыс наблюдается снижение уровня proBDNF, но без изменений в уровне зрелого белка.
4. Показано повышение уровня мРНК гена *Gdnf* в области ядер шва среднего мозга и снижение во фронтальной коре у агрессивных животных по сравнению с ручными. В миндалевидном комплексе и гипоталамусе исследуемых животных транскрипты данного гена обнаружены не были.
 5. У крыс, селекционированных на высокий уровень защитно-оборонительной агрессии, выявлено снижение уровня белка-предшественника proGDNF в области ядер шва среднего мозга; в стриатуме и прилежащих ядрах данная форма белка не была детектирована. Уровень зрелой мономерной формы белка GDNF оказался достоверно выше в миндалевидном комплексе, чёрной субстанции и области ядер шва среднего мозга высокоагрессивных крыс, в то время как в стриатуме и прилежащих ядрах мономеров GDNF не было обнаружено.
 6. Димерная форма белка GDNF выявлена во всех исследованных структурах мозга, при этом в миндалевидном комплексе агрессивных животных уровень данной формы существенно увеличен, а в гиппокампе снижен.
 7. Выявлено значительное увеличение уровня мРНК гена *Cdnf* в большинстве исследованных структур высокоагрессивных крыс за исключением стриатума и миндалевидного комплекса.
 8. В гиппокампе и гипоталамусе животных, селекционированных на высокий уровень вызванной страхом агрессии, обнаружено повышение уровня белка предшественника preCDNF и, вместе с этим, его снижение во фронтальной коре. В то же время, зрелая форма белка CDNF детектировалась только в области ядер шва среднего мозга, гиппокампе, фронтальной коре и чёрной субстанции. При этом у высокоагрессивных животных выявлено увеличение уровня белка CDNF во фронтальной коре.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ильчибаева Т.В.**, Цыбко А.С., Кожемякина Р.В., Наumenко В.С. Экспрессия генов апоптоза в мозге крыс с генетически детерминированной защитно-оборонительной агрессией // Мол биол. – 2016. – Т.50. – №5. – С. 814-820.
2. Попова Н.К., **Ильчибаева Т.В.**, Наumenко В.С. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга // Биохимия. – 2017. – Т.82. – №3. – С. 449-459.
3. Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., **Ильчибаева Т.В.**, Popova N.K. On the role of 5-HT1A receptor gene in behavioral effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor. // J. Neurosci. Res. – 2014. – Vol.92. – P.1035-1043.
4. **T.V. Pchibaeva**; E.M. Kondaurova, A.S. Tsybko, R.V. Kozhemyakina; N.K. Popova, V.S. Naumenko Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression // Behav. Brain. Res. – 2015. – Vol. 290. – P. 45-50.
5. **T.V. Pchibaeva**, A.S. Tsybko, R.V. Kozhemyakina, N.K. Popova, V.S. Naumenko Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in genetically defined fear-induced aggression // Eur J Neurosci. – 2016. – Vol.44. – №7. – P. 2467-2473.
6. **Pchibaeva T.V.**, Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Konoshenko M.Y., Popova N.K., Naumenko V.S. The relationship between different types of genetically defined aggressive behavior. // J Ethology. – 2017. – Vol.35. – №1. – P. 75-81.

7. **Ilchibaeva TV**, Kondaurova EM., Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Naumenko VS. Alteration of BDNF expression in genetically defined highly aggressive and nonaggressive rats. 2015. 17th Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society May 19 – 22, 2015 Uppsala, Sweden, P. 57.
8. **Ilchibaeva TV**, Tsybko AS, Kondaurova EM., Kozhemyakina RV, Naumenko VS. New evidence for the involvement of BDNF and pro-BDNF in the regulation of aggressive behavior. 2016. Meeting Program. 10th Annual Canadian Neuroscience Meeting 2016, Toronto, Canada, 2-B-19.
9. **Ilchibaeva TV**, Tsybko AS, Kozhemyakina RV, Naumenko VS. The first evidence for the involvement of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the regulation of aggressive behavior. 2016. 10th FENS Forum of Neuroscience, Copenhagen, Denmark, [Электрон. ресурс]. – Режим доступа: <https://apps.kenes.com/Planner/>