Влияние дефицита катехол-О-метилтрансферазы на подкрепляющие эффекты кокаина (экспериментальное исследование)

Л.В. МУС[1], О.А. ДРАВОЛИНА*[1], А.Ю. БЕСПАЛОВ[1, 2], М. КАЕНМЯКИ[3], Р. ТАЛКА[3], О. САЛМИНЕН[3], Р.К. ТУОМИНЕН[3], П.Т. МЯННИСТО[3], Э.Э. ЗВАРТАУ[1]

[1]Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана; [2]Отдел нейронаук, Эбботт, Людвигсхафен (Германия); [3]факультет фармакологии и токсикологии, кафедра фармакологии университета Хельсинки (Финляндия)

Effect of Catechol-O-methyltransferase deficiency on reinforcing effects of cocaine (experimental study)

L.V. MUS, O.A. DRAVOLINA, A.Yu. BESPALOV, M. KÄENMÄKI, R. TALKA, O. SALMINEN, R.K. TUOMINEN, P.T. MÄNNISTÖ, E.E. ZVARTAU

Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Valdman Institute of Pharmacology, St. Petersburg, Russia; Neuroscience Research, GPRD, Abbott, Ludwigshafen, Germany; Division of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Finland

Изучали влияние дефицита катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) на чувствительность к подкрепляющему действию кокаина. Исследование было проведено на самцах мышей с выключенным геном КОМТ линии C57BL/6J и мышах дикого типа той же генерации. Животные были обучены выглядыванию в отверстия за получение внутривенных инфузий кокаина (0,3 мг/кг на инфузию; режим подкрепления с фиксированным соотношением количества реакций и получаемых подкреплений 3:1 (ФС3), тайм-аут 30 с). После начальной фазы выработки реакции в режимах подкрепления ФС3 и возрастающего соотношения (ВС) были построены кривые доза—эффект для кокаина (0,03, 0,1, 0,3, 1 и 3 мг/кг на инфузию). Реакция самовведения кокаина характеризовалась зависимостью между дозой и эффектом, причем общее потребление кокаина в режимах ФС3 и ВС не отличалось у мышей обоих типов. Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о том, что индивидуальные различия в активности КОМТ не влияют на чувствительность мышей к первично-подкрепляющему действию кокаина.

Ключевые слова: *катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ), методика самовведения, кокаин, мыши.*

Catechol-O-methyltransferase (COMT) remains an important regulatory element in prefrontal cortex dopamine homeostasis. The literature data suggest that individual differences in COMT activity (Val158Met polymorphism) might have indirect downstream effects on the reward system. The aim of the present study was to examine whether COMT deletion affects reinforcing effects of cocaine in mice. The study was conducted in male mice with homozygous COMT deletion as well as their C57BL/6J wild-type littermates. Animals were trained to nose-poke to receive response-contingent intravenous infusions of cocaine (0.3 mg/kg per infusion; final schedule of reinforcement — fixed ratio (FR) 3 time out 30 s). Following the initial acquisition phase, cocaine self-administration dose-effect functions (0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg per infusion) were determined under FR3 and progressive ratio (PR) schedules of reinforcement. Cocaine dose-dependently maintained responding under FR3 and PR schedule of reinforcement when the unit dose of cocaine was varied across the sessions. The total cocaine intake did not differ in COMT deletion mice and wild-type mice. The results of this study suggest that individual differences in COMT activity do not affect primary reinforcing effects of cocaine in mice.

Key words: *catechol-O-methyltransferase (COMT), self-administration, cocaine, mice.*

Катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) — фермент, катализирующий О-метилирование катехоламинов и их гидроксилированных метаболитов, синтезируется многими типами клеток периферической и центральной нервной системы [16]. В мозге КОМТ экспрессируется в пирамидных нейронах префронтальной коры (ПФК) и гиппокампе, где принимает участие в процессах элиминации из синаптической щели дофамина (ДА) [17]. Основное значение для метаболизма ДА имеет его обратный захват в пресинаптические окончания, осуществляемый транспортером ДА, с последующим его разрушением ферментом моноаминоксидазой. Однако в областях мозга с низким уровнем экспрессии транспортера ДА, таких как ПФК, ведущую роль в инактивации играет постсинаптический транспортер норадреналина, сопряженный в работе с КОМТ [18].

© Коллектив авторов, 2012

*e-mail: olga.dravolina@gmail.com

Zh Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova 2012;112:7:48

Интерес к COMT возник в 90-е годы прошлого века после открытия функционального полиморфизма в кодоне 158 (Val158Met), определяющего разную активность фермента [13]. Вариации нуклеотидов в экзоне 3 гена COMT (gtg и atg) приводят к замене аминокислот (валин на метионин) при синтезе белка COMT. Один из полиморфных аллелей — H (Val, валин) сопряжен с нормальным уровнем активности фермента, второй — L (Met, метионин) вызывает 3—4-кратное его снижение [12]. Наличие подобной генетической изменчивости — это редкий случай, когда возможно выделить индивидуальные различия в функционировании отдельного фермента, важного для регуляции нейромедиаторных процессов. За прошедшее время было проведено несколько тысяч исследований, в которых изучалось влияние данной генетической вариации на болевую чувствительность, когнитивные способности, тревожность и подверженность наркотической зависимости [1—4, 8, 20]. Все эти процессы связаны с метаболизмом ДА в ЦНС, хотя четкой корреляции между активностью COMT и клиническими фенотипами испытуемых выявить не удалось [14, 15]. Однако было показано, что у кокаиновых наркоманов из популяции афроамериканцев чаще встречается повышенная экспрессия аллеля L по сравнению со здоровой контрольной группой той же популяции, несущей аллель H и имеющей нормальный уровень COMT (35 и 27% соответственно) [15,1].

Генетически модифицированные животные с направленной мутацией по выбранному гену представляют исключительный интерес для выяснения роли COMT, в частности в функционировании мезокортиколимбической системы «награды» мозга. Центральным звеном этой системы, играющей ведущую роль в механизмах формирования и поддержания наркотической зависимости, являются дофаминергические проекции из вентральной тегментальной области мозга в стриатум. Было показано, что животные с выключенным геном COMT имеют нормальные двигательные функции, однако демонстрируют некоторые отклонения когнитивного функционирования, агрессивности, тревожности и чувствительности к стрессу и боли [19]. В ряде экспериментов с использованием методов *in vivo* микродиализа и хронамперометрии было установлено, что недостаток данного фермента у мышей существенно не влияет на уровень катехоламинов в стриатуме [22]. Однако у этих животных наблюдалось двукратное увеличение времени элиминации ДА в ПФК и значительное повышение концентрации его метаболита дигидроксифенилуксусной кислоты по сравнению с мышами дикого типа, свидетельствующее о существенной роли COMT в гомеостазе ДА в этой области мозга [10].

Принимая во внимание важную роль COMT в метаболизме катехоламинов ПФК и наличие нисходящей функциональной связи между ПФК и стриатумом [21], было выдвинуто предположение о влиянии уровня активности COMT на чувствительность к подкрепляющему действию кокаина. Кокаин обладает выраженными подкрепляющими свойствами благодаря способности увеличивать концентрацию ДА в ЦНС путем быстрого обратимого блокирования транспортера ДА, обеспечивающего обратный захват и дальнейшее разрушение катехоламина. Низкая активность COMT увеличивает продолжительность действия и эффективность ДА в синапсах ПФК, тем самым вызывая когнитивные, эмоциональные и поведенческие отклонения, обусловливающие предрасположенность к формированию зависимости от кокаина [20].

Цель исследования — изучение влияния дефицита COMT на чувствительность к подкрепляющему действию кокаина.

Материал и методы

Исследование было выполнено на 15 самцах мышей линии C57BL/6J с выключенным геном COMT (KO) [9] и 15 мышах дикого типа (WT) той же линии, полученных из питомника Университета Хельсинки (Финляндия). Животных содержали в индивидуальных клетках стандарта TII («Velaz», Чешская Республика) с подстилом TierWohl («J.Rettenmaier&Söhne GmbH&Co», Германия) в условиях контролируемой влажности (40—70%) и температуры (21±1°C) воздуха. Животные имели неограниченный доступ к очищенной воде (фильтр «Аквафор», Санкт-Петербург) и полнорационному комбикорму (ООО «Лабораторснаб», Москва). Эксперименты проводили во время светлой фазы поддерживаемого фоторежима (08.00—20.00). Все животные были приучены к рукам экспериментатора до проведения экспериментов.

Сессии ВВС проводили в стандартных экспериментальных камерах размером 18×18×29 см, помещенных в звуко- и светоизолирующие боксы, оборудованные вентиляторами для обеспечения воздухообмена. Экспериментальные камеры были снабжены двумя отверстиями для выглядываний и инфузионной системой, точность дозирования которой обеспечивали использованием насосов с шаговым двигателем («RITEC», Санкт-Петербург). Управление насосами и регистрацию выглядываний осуществляли при помощи IBM-совместимого компьютера, оснащенного аппаратными и программными средствами («Med Associates», Inc., США) с расширениями, написанными на языках Medstate Notation и Delphi.

Для наркотизации животных была использована смесь кетамина (65 мг/кг; ФГУП «Эндокринный завод», Москва) и ксилазина (10 мг/кг; «Interchemie», Нидерланды). Внутривенные катетеры были имплантированы в яремную вену по методике, описанной ранее [6]. После операции животных содержали в помещении с теплым воздухом (24°C) в течение 12 ч. Имплантированные катетеры промывали один раз в сутки растворами, содержащими антибиотик цефазолин (1% — 0,03 мл; «Синтез», Курган) и гепарин (50 МЕ/мл — 0,03 мл; «ICN Galenika», Сербия). Проходимость катетеров проверяли еженедельно или при появлении изменений в поведении животного с помощью разового введения через катетер кетамина (30 мг/кг). Признаком проходимости являлась мгновенная седация животного. Все мыши с отсроченной/отсутствующей реакцией были исключены из исследования и последующего анализа данных.

Через 3 дня после операции проводили ежедневные сессии внутривенного самовведения кокаина. Выглядывания в одно из отверстий камеры — «активное» (правое для половины животных и левое для остальных) — инициировали внутривенное введение кокаина (20 мкл, 3 с) и выключение света в камере на 30 с (тайм-аут). В течение этого периода выглядывания в активное отверстие регистрировали, но это не приводило к инфузии кокаина. Выглядывания в другое отверстие («неактивное») на протя-

жении всей экспериментальной сессии записывались программой, но не имели никаких последствий.

Для расчета точной дозы вещества животных взвешивали перед каждой экспериментальной сессией. Внутривенное самовведение кокаина (0,3 мг/кг на инфузию) в течение первых 5 дней проводили в режиме фиксированного соотношения 1 (ФС1), при котором внутривенными инфузиями подкрепляли каждое выглядывание в «активное» отверстие. Далее в соответствии с режимом ФС3 инфузия кокаина сопровождала каждое третье выглядывание. Для предотвращения причинения вреда здоровью животных вследствие употребления высоких доз психостимулятора максимальную дозу вводимого кокаина ограничивали 30 мг/кг за сессию. Экспериментальные сессии завершали по истечении 3 ч или по достижении критерия максимально возможной дозы в зависимости от того, что происходило раньше.

После выработки устойчивого самовведения кокаина (0,3 мг/кг на инфузию) в режиме ФС3 мыши были переведены на режим возрастающего соотношения (ВС). Критерием устойчивости поведения являлось поддержание самовведения на уровне 70% предпочтения «активного» отверстия с общим количеством инфузий не менее 10 в течение каждой из двух последовательных сессий. В ходе одной сессии ВС количество выглядываний в активное отверстие, необходимое для получения одной инфузии, пошагово увеличивали в соответствии с формулой $ВС=С_{шаг-1}+(шаг/2)$, определяющей последовательность: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 25, 30 и т.д. [7]. После этого этапа животные были разделены на две группы. Для одной из них доза кокаина была снижена до 0,1 мг/кг на инфузию в течение двух последовательных сессий в режиме ФС3 и одной — в режиме ВС, после чего в соответствии с той же схемой дозу кокаина увеличивали до 1 мг/кг на инфузию. Вторая группа мышей получала инфузии кокаина согласно той же схеме, но порядок предъявления доз был обратным. Далее дозы кокаина были изменены на 0,03 и 3 мг/кг на инфузию (рис. 1).

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью пакета статистических программ SPSS (версия 16, США). Статистическую значимость оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Межгрупповые сравнения (тест Бонферрони) проводили только при условии выявления значимого результата процедурой дисперсионного анализа. Зависимыми переменными были количество инфузий и выглядываний в «активное» и «неактивное» отверстия для ФС и ВС сессий. Независимыми — доза кокаина (5 уровней: 0,03, 0,1, 0,3, 1 и 3 мг/кг на инфузию) и тип животного (2 уровня: WT и KO).

Результаты и обсуждение

Как указывалось выше, в данной работе чувствительность к действию кокаина оценивали с использованием метода внутривенного самовведения. Согласно классическому определению феномена подкрепления, позитивно-подкрепляющие стимулы характеризуются способностью увеличивать вероятность повторения поведенческой реакции, которая предшествует их предъявлению [5]. Реакция самовведения кокаина в дозе 0,3 мг/кг/инфузия была успешно выработана у мышей как KO, так и WT. Более того, в диапазоне исследуемых доз (0,03, 0,1, 0,3, 1 и 3 мг/кг на инфузию) сопоставимый уровень самовведения кокаина наблюдали у KO и WT мышей в каждом из режимов подкрепления. Так, в режиме подкрепления ФС3 (рис. 2) мыши получили следующее количество инфузий за экспериментальную сессию ($M\pm m$): 0,03 мг/кг/инфузия — 36,4±15,4 (WT) и 41,7±14,4 (KO); 0,1 мг/кг/инфузия — 39,9±9,9 (WT) и 44,6±12,7 (KO); 0,3 мг/кг/инфузия — 77,5±7,7 (WT) и 88,4±7,3 (KO); 1 мг/кг/инфузия — 29,1±0,9 (WT) и 30,0±0,0 (KO); 3 мг/кг/инфузия — 10,0±0,0 (WT) и 10,0±0,0 (KO). В режиме ВС, традиционно используемом для оценки максимального усилия, которое может приложить животное, чтобы получить подкрепление, реакция самовведения мышей характеризовалась следующим количеством инфузий раствора кокаина

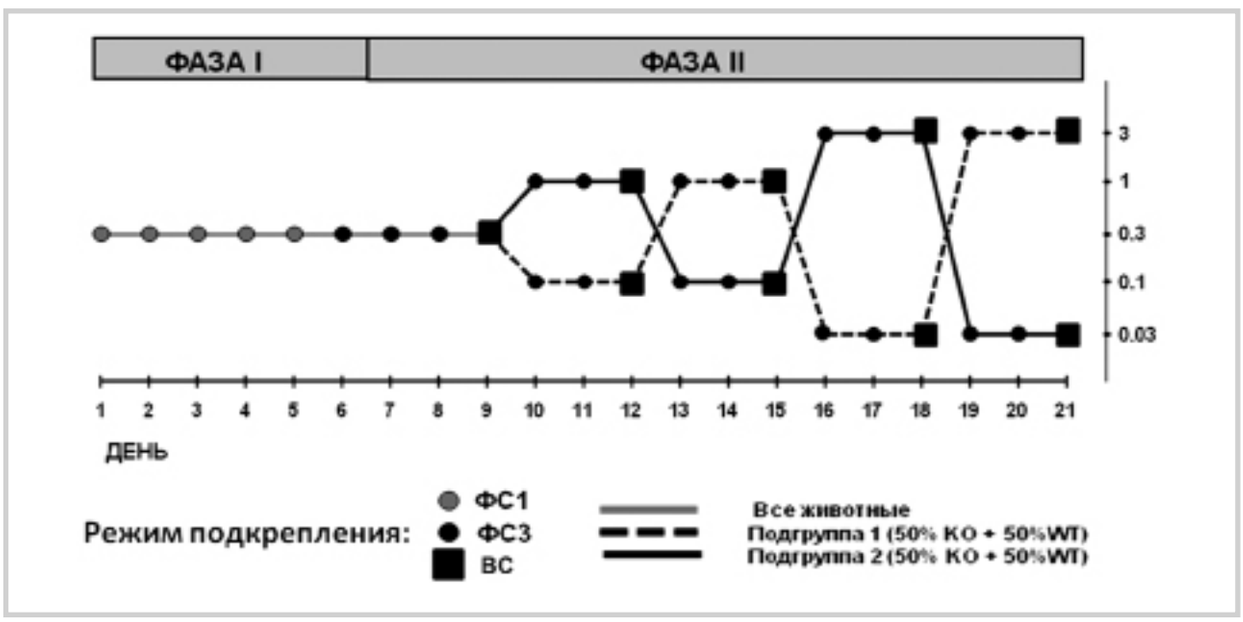


Рис 1. **Схема эксперимента внутривенного самовведения кокаина у мышей.**
По оси абсцисс — дни эксперимента, по оси ординат — доза кокаина (мг/кг/инфузия).

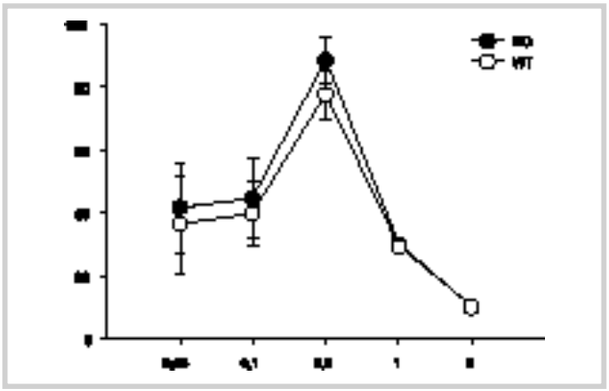


Рис. 2. **Суммарное количество инфузий кокаина (*M*±*m*), полученных KO и WT мышами в ходе экспериментальных сессий в режиме подкрепления ФС3.**

Здесь и на рис. 3, 5, 6: по оси абсцисс — доза кокаина (мг/кг/инфузия), по оси ординат — количество инфузий.

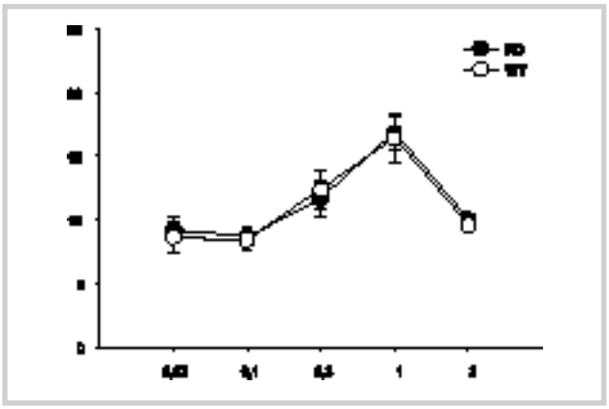


Рис. 3. **Суммарное количество инфузий кокаина (*M*±*m*), полученных KO и WT мышами в ходе экспериментальных сессий в режиме подкрепления ВС.**

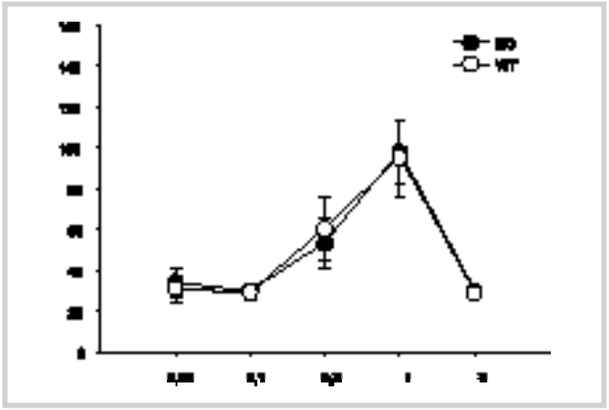


Рис. 4. **Финальные значения соотношения (ось ординат) количества выглядываний (*M*±*m*), необходимых для получения разовой инфузии кокаина, достигнутые KO и WT мышами в ходе экспериментальных сессий в режиме подкрепления ВС.**

(*M*±*m*), полученных за экспериментальную сессию (рис. 3): 0,03 мг/кг/инфузия — 8,6±1,1 (WT) и 9,2±1,1 (KO); 0,1 мг/кг/инфузия — 8,4±0,8 (WT) и 8,7±0,6 (KO);

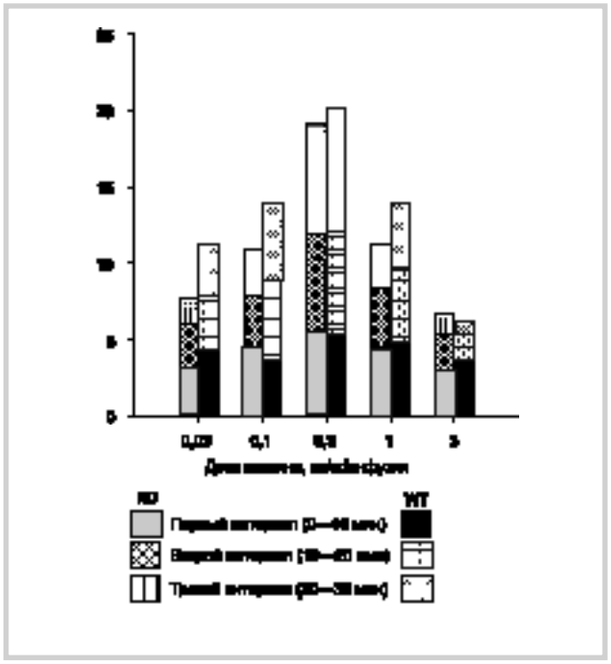


Рис. 5. **Среднее количество инфузий кокаина, полученных KO и WT мышами в ходе первых 30 мин экспериментальных сессий в режиме подкрепления ФС3.**

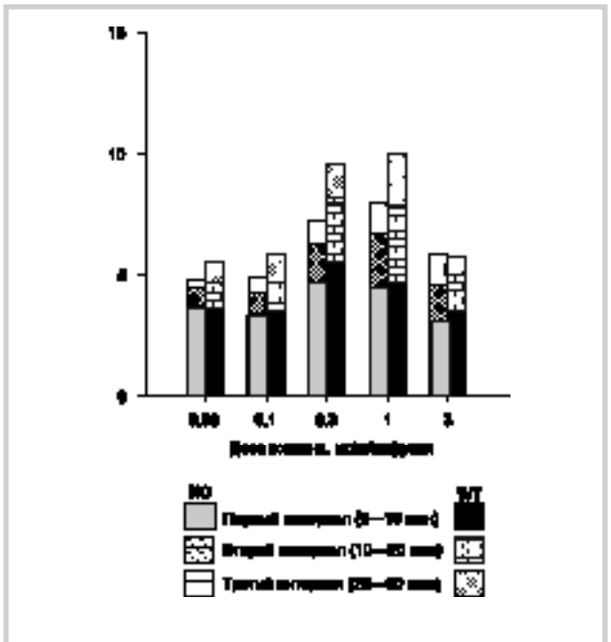


Рис. 6. **Среднее количество инфузий кокаина, полученных KO и WT мышами в ходе первых 30 мин экспериментальных сессий в режиме подкрепления ВС.**

0,3 мг/кг/инфузия — 12,4±1,5 (WT) и 11,6±1,4 (KO); 1 мг/кг/инфузия — 16,4±1,9 (WT) и 16,8±1,4 (KO); 3 мг/кг/инфузия — 9,5±0,4 (WT) и 10,0±0,0 (KO). Не было обнаружено значимых различий и в финальных значениях количества выглядываний, требуемых для получения подкрепления (рис. 4). Отсутствие различий поведения животных разного типа при разных режимах подкрепления может быть обусловлено выраженным увеличением концентра-

ции ДА в мозге, обеспечивающим самовведение кокаина животными в эксперименте вне зависимости от уровня активности KOMT.

Максимальное количество инфузий кокаина, получаемых за одну экспериментальную сессию, было ограничено критерием предельно допустимой дозы (30 мг/кг), что могло повлиять на «оперантный выход» и привести к искажению получаемых в рассматриваемой методике данных. В связи с этим были проанализированы первые 30 мин всех экспериментальных сессий, дающих представление об уровне чувствительности животных к подкрепляющему действию кокаина (рис. 5, 6). Однако детальная оценка «временной развертки» поведения животных, «самовводящих» кокаин, не выявила отличий у мышей KO и WT.

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод, что индивидуальные различия в активности KOMT не влияют на чувствительность мышей к первично-подкрепляющему действию кокаина. Сравнить полученные результаты с работами других авторов не представляется возможным, поскольку изучение чувствительности мышей с выключенным геном KOMT к действию психоактивных веществ с использованием метода внутривенного самовведения ранее не проводили. При сравнительной оценке эффектов амфетамина на двигательную активность самцов и самок мышей (KO и WT) было выявлено, что только самцы с дефицитом KOMT менее чувствительны к угнетающему действию вещества в дозе 10 мг/кг [11]. В дозах 1 и 5 мг/кг, стимулирующих двигательную активность животных, амфетамин оказывал одинаковое действие на мышей обоих типов.

Таким образом, полученные экспериментальные данные в сочетании с противоречивыми результатами клинических исследований роли Val158Met полиморфизма в предрасположенности к развитию наркотической зависимости [14] не дают оснований считать уровень экспрессии KOMT решающим фактором для развития зависимости от кокаина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алфимова М.В., Голимбет В.Е., Грищенко И.К., Лежейко Т.В., Абрамова Л.И., Стрельцова М.А., Хлопина И.В., Эбштейн Р.П.* Взаимодействие генов дофаминовой системы и когнитивные функции у больных шизофренией, их родственников и здоровых лиц из общей популяции. Журн неврол и психиат 2006; 7: 57—63.
2. *Анохина И.П., Иванец Н.Н., Шамакина И.Ю., Кибитов А.И., Воскобоева Е.Ю., Хуснутдинова Э.К.* Современные проблемы генетики зависимости от психоактивных веществ. Наркология 2004; 6: 71—77.
3. *Голимбет В.Е., Алфимова М.В., Грищенко И.К., Эбштейн Р.П.* Связь генов дофаминергической системы с экстраверсией и поиском новизны. Журн высш нерв деят 2006; 56: 4: 457—463.
4. *Кибитов А.О., Воскобоева Е.Ю., Бродянский В.М., Чупрова Н.А., Смирнова Е.В.* Анализ Val158Met полиморфизма гена катехол-орто-метилтрансферазы (KOMT) у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией с отягощенной наследственностью. Журн неврол и психиат 2010; 4: 84—88.
5. *Суханов И.М., Драволина О.А., Звартау Э.Э., Беспалов А.Ю.* Механизмы никотиновой зависимости. Мед акад журн 2008; 8: 2: 35—42.
6 *Chistyakov V.S., Tsibulsky V.L.* How to achieve chronic intravenous drug self-administration in mice. J Pharm Tox Meth 2006; 53: 117—127.
7. *Colby C.R., Whisler K., Steffen C., Nestler E.J., Self D.W.* Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. J Neurosci 2003; 23: 2488—2493.
8. *Craddock N., Owen M.J., O'Donovan M.C.* The catechol-O-methyltransferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. Mol Psychiatry 2006; 11: 446—458.
9. *Gogos J.A., Morgan M., Luine V., Santha M., Ogawa S., Pfaff D., Karayiorgou M.* Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9991—9996.
10. *Huotari M., Gogos J.A., Karayiorgou M., Koponen O., Forsberg M., Raasmaja A., Hyttinen J., Männistö P.T.* Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. Eur J Neurosci 2002; 15: 246—256.
11. *Huotari M., Garcia-Horsman J.A., Karayiorgou M., Gogos J.A., Männistö P.T.* D-amphetamine responses in catechol-O methyltransferase (COMT) disrupted mice. Psychopharmacology 2004; 172: 1—10.
12. *Ishiguro H., Haruo Shibuya T., Toru M. et al.* Association study between high and low activity polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcoholism. Psychiat Genet 1999; 9: 3: 135—138.
13. *Lachman H.M., Papolos D.F., Satio T., Yu Y.M., Szumlanski C.L., Weinshilboum R.M.* Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. Pharmacogenetics 1996; 6: 243—250.
14. *Lachman H.M.* Does COMT Val158Met affect behavioral phenotypes: yes, no, maybe? Neuropsychopharmacology 2008; 33: 3027—3029.
15. *Lohoff F.W., Weller A.E., Bloch P.J., Nall A.H., Ferraro T.N., Kampman K.M., Pettinati H.M., Oslin D.W., Dackis C.A., O'Brien C.P., Berrettini W.H.* Association between the catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. Neuropsychopharmacology 2008; 33: 3078—3084.
16. *Männistö P.T., Kaakkola S.* Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. Pharmacol Rev 1999; 51: 593—628.
17. *Matsumoto M., Weickert C.S., Akil M., Lipska B.K., Hyde T.M., Herman M.M., Kleinman J.E., Weinberger D.R.* Catechol-O-methyltransferase mRNA expression in human and rar brain: evidence for a role in cortical neuronal function. Neuriscience 2003; 116: 127—137.
18. *Moron J.A., Brockington A., Wise R.A., Rocha B.A., Hope B.T.* Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. J Neurosci 2002; 22: 389—395.
19. *Tammimäki A., Käenmäki M., Kambur O., Kulesskaya N., Keisala T., Karvonen E., García-Horsman J.A., Rauvala H., Männistö P.T.* Effect of S-COMT deficiency on behavior and extracellular brain dopamine concentrations in mice. Psychopharmacology 2010; 211: 389—401.
20. *Tunbrige E.M., Harrison P.J., Weinberger D.R.* Catechol-O-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. Boil Psychiatry 2006; 60:141—145.
21. *Yacubian J., Sommer T., Schroeder K., Gläscher J., Kalisch R., Leuenberger B., Braus D.F., Buchel C.* Gene-gene interaction associated wiyh neural reward sensitivity. J Neurosci 2007; 104: 8125—8130.
22. *Yavich L., Forsberg M., Gogos J.A., Karayiorgou M., Männistö P.T.* Site specific role of catechol-O-methyltransferase in dopamine overflow within prefrontal cortex and dorsal striatum. J Neurosci 2007; 27:10196—10202.