

## **АВТОРСКАЯ ВЕРСИЯ**

### **Роль локуса *Sac* в формировании вкусового предпочтения алкоголя у инбредных линий мышей.**

**Муровец В.О., Золотарев В.А., Бачманов А.А.<sup>\*</sup>**

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург

<sup>\*</sup> Центр исследования химической чувствительности им. А. Монелла, Филадельфия, Пенсильвания, 19104, США

*Представлено академиком В.Л. Свидерским.*

Генетические различия в хемосенсорном восприятии алкоголя (вкус, запах, жжение) в значительной степени влияют на формирование предпочтения алкоголя у животных и человека [1]. Особый интерес для поиска фенотипических маркеров алкогольной зависимости имеет функциональная связь между склонностью к потреблению сладких растворов и повышенным потреблением растворов алкоголя, выявленная как у грызунов [2, 3, 4], так и у человека [5]. Генетическая природа предпочтения сладкого впервые была обоснована Дж. Фуллером (Fuller, 1974) [6], выделившим локус *Sac*, определяющий повышенное потребление сахараина у мышей. Позднее было установлено соответствие данному локусу гена *Tas1r3* [7], который локализуется в 4-ой хромосоме мыши и 1-ой человека и кодирует в чувствительных клетках вкусового эпителия млекопитающих белок T1R3 [8]. Гетеродимерному белковому комплексу T1R2/T1R3 [7, 9, 10] отводится главная роль в рецепции сладкого вкуса [11]. Предполагается, что инбредные линии мышей с тастер-аллелью *Sac<sup>b</sup>*, например линия C57BL/6J [6, 7], предпочитающие сладкие растворы и этанол воде, предпочитают алкоголь, поскольку реагируют на сладкую составляющую его вкуса [3]. Действительно, линии-носители менее чувствительной (нон-тастер) аллели (*Sac<sup>d</sup>* для 129P3/J) [12] и, в особенности, ген-нокаутные по *Tas1r3* мыши [7, 9, 13], полученные на основе линий с тастер-аллелью *Sac*, в продолжительных тестах с выбором демонстрируют значительно меньшее предпочтение сахаров и алкоголя воде. Однако данные методики тестирования, хотя и используются чаще всего, не позволяют до конца обосновать роль вкуса в сравнении с постабсорбционными эффектами (наркотическим и метаболическим) в реакции предпочтения алкоголя. Также требуют дополнительного исследования как сама возможность восприятия мышами сладкого компонента вкуса у этанола, так и то, что именно белок T1R3 ответственен за его восприятие. В данном исследовании для оценки предпочтения вкусовых веществ был применен тест краткого доступа, максимально сокращающий время контакта с тестовым веществом и снижающий

## Авторская версия

объем его потребления, вследствие чего уменьшается вклад постабсорбционных воздействий. В работе проанализированы реакции мышей линий C57BL/6ByJ, 129P3/J, а также *Tas1r3*-ген-нокаутных мышей на алкоголь и два его прототипических вкусовых компонента – сладкий и горький. Показано, что наличие нон-тастер аллели локуса *Sac<sup>d</sup>* у линии 129P3/J, либо полное отсутствие *Sac* локуса (линия *Tas1r3*-/-), предопределяют отвергание этанола. При этом локус *Sac* не влияет на восприятие горькой составляющей и способность к вкусовому различению этанола.

Исследование, одобренное комиссией по биоэтике Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, было проведено на 4-6-ти месячных мышах обоих полов массой 20-30 г. Две инбредные линии, 129P3/J (далее – 129; n=31) и C57BL/6ByJ (Б6; n=37) были приобретены в Джексоновской Лаборатории (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Ген-нокаутные *Tas1r3*-/- мыши (n=14), полученные на основе C57BL/6ByJ [13] безвозмездно предоставлены доктором Р. Маргольски (Dr. R.F. Margolskee, Mount Sinai School of Medicine, NY, USA). Для дозированного предъявления и измерения потребления малых объёмов растворов вкусовых веществ в teste краткого доступа использовался автоматизированный ликометр Davis MS-160 (DiLog Instruments, Tallahassee, FL, USA), регистрировавший число лакательных движений языка, интервалы между лакательными движениями (МЛИ) и латентность подхода к поилке в попытках. Перед тестированием животные мотивировались каждой в течение 22-23 ч (полная водная депривация для тестирования этанола и хинина; частичная – для сахарозы) [14]. Водные растворы этанола (1.25-20%), сахарозы (1-32%) и гидрохлорида хинина (0.01-1 mM) тестировались в отдельных сессиях, состоявших из 24 5-с (время доступа к поилке после начала лакания) предъявлений 5 или 6 концентраций вещества, чередуясь с водой. Растворы предъявлялись в порядке увеличения концентрации трижды за сессию. Ассоциацию вкуса этанола с его прототипическими вкусовыми компонентами оценивали по генерализации условно-рефлекторной вкусовой аверзии (УРВА) к 10% этанолу (безусловный стимул – LiCl, внутрибрюшинная инъекция 0.23 г/кг) на хинин и сахарозу [4]. Статистические сравнения проводились для расчетного показателя – нормированного потребления (НП) тестовых веществ [14]. НП вычислялось для каждой предъявленной концентрации как отношение среднего числа лаканий за попытку к расчетной максимальной скорости лакания воды. Последняя определялась делением длительности попытки (5 с) на среднюю величину МЛИ [15] для воды на стадии обучения. Коэффициент НП близкий к 1.0 означает, что животное

## Авторская версия

демонстрировало практически максимальный уровень предпочтения данной концентрации вещества. Приближающийся к 0.0 НП указывает на негативную вкусовую реакцию. Статистический анализ производился с помощью программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) отдельно для каждого вкусового вещества посредством многоуровневого трёхфакторного дисперсионного анализа ANOVA, где факторами были: генотип (линии мышей), воздействие (УРВА) и концентрация. Апостериорный анализ проводился с использованием критерия Фишера. Данные представлены как средние значения  $\pm$  ошибка средней.

*Sac*-генотип оказал определяющее влияние на предпочтение алкоголя в тесте краткого доступа (Рис. 1), как это показал 3-х факторный тест ANOVA (эффект генотипа:  $F(2, 113) = 6.08, p<0.001$ ). Межлинейные различия проявились также в зависимости реакций от концентрации ( $F(8, 452) = 4.17, p<0.001$ ) и в эффекте УРВА ( $F(8, 452) = 4.70, p<0.001$ ). Интактные носители тастер-аллели *Sac<sup>b</sup>* (линия Б6) демонстрировали практически одинаковое потребление всех концентраций этанола, которое мало отличалось от потребления нейтрального стимула – воды. Наблюдавшееся у носителей нон-тастер аллели (129) отвергание этанола при росте концентрации подтверждает роль генотипа в целом, однако не является достаточным доказательством влияния локуса *Sac*. Впервые полученные на ген-нокаутных мышах данные о самом низком уровне потребления этанола у *Tas1r3-/-* генотипа (Рис. 1 В) дают необходимое доказательство прямой зависимости хемосенсорного предпочтения этанола от локуса *Sac*. Основной эффект *Sac*-генотипа, вероятно, связан с гедоническими реакциями на этанол, а не с его хемосенсорным различием. Рассмотренные в нашей работе генотипы имели сходную чувствительность к этанолу, что следует из одинакового концентрационно-зависимого отвергания этанола после формирования УРВА (Рис 1). Методология теста краткого доступа предполагает, что изменения латентности подхода животного к поилке могут характеризовать влияние таких факторов, как обоняние и обучение [14]. Подтверждением того, что наблюдавшиеся изменения в латентности подходов зависели от воздействия паров этанола на обоняние, была концентрационная зависимость ( $F(8, 264) = 3.34, p<0.001$ ). Максимальное увеличение латентности, вероятно отражающее запуск обонятельной рецепцией врождённой двигательной реакции избегания, было выявлено у 129 и ген-нокаутных мышей. У последних латентность увеличивалась более чем вдвое в попытках с 5 и 20% растворами.

## Авторская версия

Негативная реакция на запах этанола усиливалась после УРВА, что видно из достоверного увеличения латентности у всех групп ( $F(4, 264) = 7.40$  при  $p < 0.001$ ).

Гедоническая реакция на горькие растворы хинина не зависела от *Sac*-локуса, что подтверждается отсутствием различий между интактными Б6 и *Tas1r3*<sup>-/-</sup> мышами, в равной степени избегавшими хинин, начиная с 0.03 мМ. При этом зависимость в реакции на горькое от генотипа в целом четко проявлялась, т.к. интактные мыши 129 в сравнении с Б6 и *Tas1r3*<sup>-/-</sup> активнее избегали хинин, начиная с 0.03 мМ. Линии Б6 и *Tas1r3*<sup>-/-</sup> достоверно ассоциировали вкусы этанола и хинина, генерализуя УРВА к 10% этанолу на хинин (эффект аверзии:  $F(4, 488) = 2.55$ ,  $p < 0.03$ ). У линии 129 потребление хинина после УРВА достоверно не изменилось, но увеличение латентности подходов к хинину после УРВА ( $p < 0.05$ ) позволяет предположить, что мыши этой линии также дифференцировали горькую составляющую вкуса этанола.

Вполне предсказуемым было то, что предпочтение растворов сахарозы оказалось достоверно связанным с генотипом и, в частности, с локусом *Sac* ( $F(2, 106) = 19.14$  при  $p < 0.001$ ), и характеризовалось концентрационной зависимостью ( $F(10, 530) = 3.18$  при  $p < 0.001$ ). Разница между генотипами сохранялась после УРВА: интактные 129 и в особенности *Tas1r3*<sup>-/-</sup> демонстрировали меньшее потребление 1-8% сахарозы чем Б6 (при  $p < 0.05$  и  $p < 0.01$ , соответственно). В отличие от данных ряда авторов [4] о генерализации линией Б6 УРВА к 10% этанолу на низкую концентрацию (50 мМ) сахарозы, полученных в длительных тестах свободного выбора, ни у одного из генотипов мы не наблюдали генерализации выученного избегания с 10% этанола на сахарозу. Вероятным объяснением этого представляется разница использованных парадигм тестирования, когда в нашем случае не было эффекта новизны стимула (сахарозы), и уже знакомые (до генерации УРВА) со всеми вкусовыми стимулами мыши легко выделяли доминирующий горький компонент вкуса этанола, на который у них преимущественно и формировалась реакция УРВА.

Проведённое сравнительное исследование потребления разными линиями мышей растворов алкоголя, сахарозы и хинина в teste краткого доступа подтвердило, что взаимозависимость предпочтения алкоголя и сладкого в значительной степени связана с генетически детерминированными особенностями хемосенсорного восприятия этих веществ. Предпочтение этанола целиком определялась экспрессией гена *Tas1r3* (локус *Sac*). Наличие только рецессивных нон-тастер аллелей *Sac*<sup>d</sup> у линии 129Р3/Л, а также

## **АВТОРСКАЯ ВЕРСИЯ**

полное отсутствие локуса *Sac* у ген-нокаутных *Tas1r3-/-* мышей предопределили поведенческое отвергание этанола (вероятно за счет избегаемой горькой составляющей его вкуса) и уменьшенное предпочтение сладких растворов. Присутствие определяющей высокую чувствительность к сладкому тастер-аллели *Sac<sup>b</sup>* у мышей линии C57BL/6ByJ, по-видимому, уравновешивало негативное восприятие горького вкуса и отвергаемого запаха этанола, что способствует развитию предпочтения. Показано, что локус *Sac*, не влияет на хемосенсорное различение растворов алкоголя, основанное на выделении его горького вкусового компонента и запаха.

Работа поддержана грантом Национальных институтов здоровья США № R03TW007429.

Автор для связи с редакцией: Муровец Владимир Олегович mourovets@mail.ru

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Bachmanov A.A., Kiefer S.W., Tordoff M.G. et al.* // *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 2003. V. 27. P. 220 – 231.
2. *Bachmanov A.A., Reed D.R., Tordoff M.G. et al.* // *Behav. Genet.* 1996. V. 26. № 6. P. 563 – 573.
3. *Blednov Y.A., Walker D., Martinez M. et al.* // *Genes, Brain Behav.* 2008. V. 7. P. 1 – 13.
4. *Blizard D.A.* // *Behav. Genet.* 2007. V. 37. P. 146 – 159.
5. *Kampov-Polevoy A.B. et al.* // *Alcohol and Alcoholism.* 2001. V. 36. P. 165 – 170.
6. *Fuller J.L.* // *J. Heredity.* 1974. V. 65. P. 33 – 36.
7. *Nelson G., Hoon M.A., Chandrashekar J. et al.* // *Cell.* 2001. V. 106. P. 381 – 390.
8. *Bachmanov A.A., Li X., Reed D.R. et al.* // *Chem. Senses.* 2001. V. 26. P. 925 – 933.
9. *Zhao G.Q., Zhang Y., Hoon M.A. et al.* // *Cell.* 2003. V. 115. P. 255 – 266.
10. *Xu H., Staszewski L., Tang H. et al.* // *PNAS.* 2004. V. 101. № 39. P. 14258 – 14263.
11. *Chandrashekar J., Hoon M.A., Ryba N.J.P. et al.* // *Nature.* 2006. V. 444. № 16. P. 288 – 294.
12. *Beauchamp G.K., Bachmanov A.A.* // *Phys. Genomics.* 2007. V. 32. P. 82 – 94.
13. *Damak S., Rong M., Yasumatsu K. et al.* // *Science.* 2003. V. 301. P. 850 – 853.
14. *Glendinning J.I., Gresack J., Spector A.C.* // *Chem. Senses.* 2002. V. 27. P. 461 – 474.

**АВТОРСКАЯ ВЕРСИЯ**

15. Boughter J.D. (Jr.), Baird J.-P., Bryant J. et al. // Genes, Brain and Behav. 2007. V. 6. P. 619 – 627.

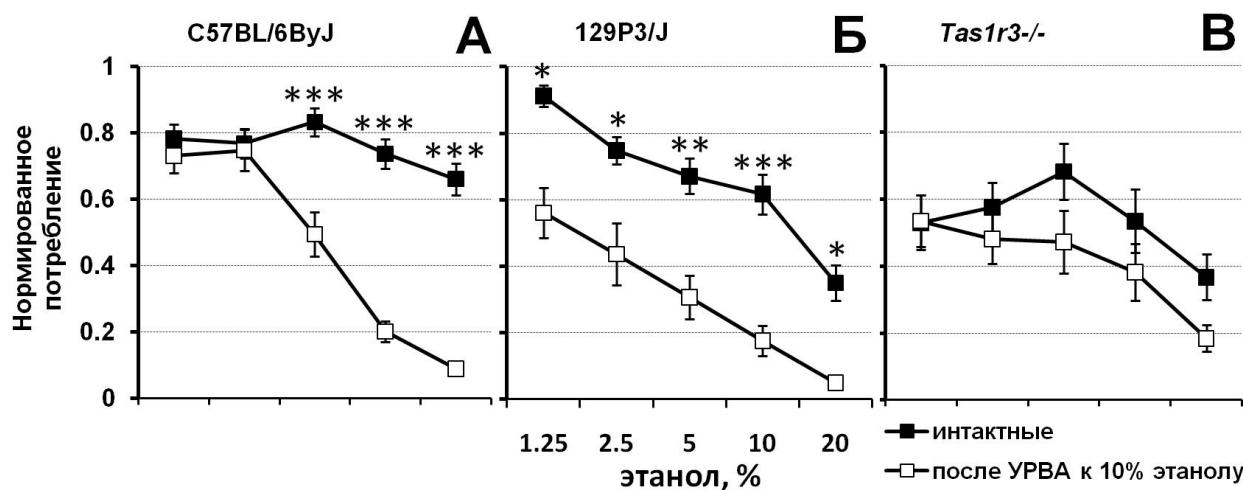


Рис. 1. Потребление растворов этанола в тесте краткого доступа у инбредных линий мышей C57BL/6ByJ (А), 129P3/J (Б) и *Tas1r3-/-* -ген-нокаутных (В). Влияние условно-рефлекторной вкусовой аверзии (УРВА) к 10% этанолу на потребление. Нормированное потребление вычислялось как отношение среднего числа лаканий за попытку к расчетной максимальной скорости лакания воды (подробности в тексте). Затемнённые точки – реакция интактных животных, светлые – реакция после УРВА. Статистические сравнения проведены с помощью дисперсионного анализа, тест Фридмана: \*\*\*–  $p < 0.001$ ; \*\*–  $p < 0.01$ ; \*–  $p < 0.05$ .