

Received: 2004.11.24
Accepted: 2004.12.22
Published: 2004.12.29

Charakterystyka behawioralna i farmakologiczna myszy pozbawionych genu kodującego transporter dopaminowy

Behavioral and pharmacological characteristics of mice lacking the dopamine transporter

Grażyna Biała

Katedra Farmakologii z Farmakodynamiką Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie

Streszczenie

Dopamina jest jednym z neuroprzekaźników biorących udział w regulacji procesów emocjonalnych i ruchowych. Transporter dopaminowy (DAT) jest białkiem uczestniczącym w wychwycie zwrotnym dopaminy ze szczeliny synaptycznej do struktur presynaptycznych. Myszy pozbawione genu kodującego białko DAT (myszy DAT knock-out) wykazują wyraźne zmiany homeostazy dopaminowej, objawiające się m.in. podwyższonym stężeniem pozakomórkowej dopaminy i znaczną hiperlokomocją w nowym otoczeniu.

W pracy przedstawiono krótką charakterystykę behawioralną i farmakologiczną myszy DAT knock-out. Skoro wiadomo, iż DAT jest punktem uchwytu działania środków psychostymulujących, zwrócono również szczególną uwagę na skutki działania tych środków, zwłaszcza na ich działanie nagradzające i stymulujące aktywność lokomotoryczną. Część cytowanych wyników badań wskazuje na udział innych, oprócz dopaminowego, transporterów: serotoninowego i noradrenalinowego w mechanizmie działania środków psychostymulujących. Świadczyć mogą o tym dane opisujące występowanie działań nagradzających (warunkowa preferencja miejsca i samopodawanie) amfetaminy, kokainy i morfiny oraz wzrost uwalniania przez te związki dopaminy w jądrze półleżącym przegrody u myszy DAT knock-out, czyli przy całkowitym braku transportera dopaminowego.

Myszy DAT knock-out stanowią mogą wiarygodny model nasilonej aktywności układu dopaminowego, stosowany celem dokładnego opisanie molekularnych mechanizmów towarzyszących utrzymującemu się podwyższonemu poziomowi pozakomórkowej dopaminy. Model ten pozwala również zrozumieć podłoże wielu schorzeń, związanych z zaburzeniami przekazywania dopaminowego u ludzi, takich jak np. zespół hiperaktywności z upośledzeniem uwagi u dzieci, co umożliwić może zastosowanie właściwej ich farmakoterapii.

Słowa kluczowe:

dopamina • transporter dopaminowy • myszy knock-out • psychostymulanty

Summary

Dopamine exerts an important modulatory influence on behaviors such as emotions and locomotor activity. The dopamine transporter (DAT) reuptakes the released neurotransmitter into presynaptic terminals. Mice lacking the dopamine transporter (DAT knock-out mice) display marked changes in an dopamine homeostasis that result in an elevated dopaminergic level and locomotor hyperactivity. The interaction of psychostimulating drugs with the DAT is thought to be critically important for many of the actions of these drugs, including the reward and locomotor stimu-

lating effects. The goal of the present paper was to compile recent data concerning the behavioral and pharmacological characteristics of DAT knock-out mice, especially the consequences of acute and chronic psychostimulant administration, such as the hypolocomotor response. The reinforcing potency of amphetamines, cocaine, and morphine maintained in the absence of the DAT may suggest that other neurotransmitter systems in addition to dopamine might contribute to the actions of psychostimulants and opioid agonists. In the absence of the DAT, these drugs could be acting on alternative targets, such as the serotonin or noradrenaline transporters.

In summary, mice lacking the dopamine transporter gene may represent an excellent model to elucidate the molecular adaptive changes accompanying the pathological states associated with hyperdopaminergia, such as the attention deficit hyperactivity disorder in humans.

Key words: dopamine • dopamine transporter • knock-out mice • psychostimulants

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6799.pdf

Word count: 1743

Tables: –

Figures: –

References: 13

Adres autorki: dr Grażyna Biała, Katedra Farmakologii z Farmakodynamiką AM im. prof. F. Skubiszewskiego, ul. Staszica 4, 20-081 Lublin, e-mail: gragab@panaceum.am.lublin.pl

Wykaz skrótów: **ADHD** – zespół hiperaktywności z upośledzeniem uwagi (attention deficit hyperactivity disorder); **DAT** – transporter dopaminowy; **DAT-KO** – myszy DAT knock-out; **MAO-A** – monoaminooksydaza typu A; **NAC** – jądro półleżące przegrody (nucleus accumbens); **NET** – transporter noradrenaliny; **NMDA** – receptory N-metylo-D-asparagianinu; **o.u.n.** – ośrodkowy układ nerwowy; **SERT** – transporter serotoniny; **SNC** – część zbita substancji czarnej (substantia nigra pars compacta); **VTA** – obszar brzuszny nakrywki (ventral tegmental area); **WT** – myszy DAT wild-type

WSTĘP

Dopamina i transporter dopaminowy

Dopamina jest neuroprzekaznikiem zaangażowanym w regulację procesów ruchowych (układ nigro-striatalny), emocjonalnych (układ mezolimbiczny) i hormonalnych (układ guzowo-lejkowy). Zaburzenia w funkcjonowaniu neuronów dopaminowych prowadzić mogą do wystąpienia zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych. Przedłużające się nasilenie aktywności układu dopaminowego leży u podstaw pojawienia się wytwórczych objawów schizofrenii, zespołu nadpobudliwości z upośledzeniem uwagi (zespół ADHD – attention deficit hyperactivity disorder), choroby Gillesa de la Tourette'a lub płasawicy Huntingtona. Nasilenie uwalniania dopaminy w niektórych rejonach ośrodkowego układu nerwowego (o.u.n.), głównie w jądrze półleżącym przegrody (nucleus accumbens – NAC), stanowiącym część układu mezolimbicznego, jest cechą wspólną większości środków uzależniających i warunkuje rozwój uzależnienia lekowego.

Dopamina, jako pierwsza z amin katecholowych w szlaku ich syntezy, spełnia wszystkie cechy klasycznego neuroprzekaznika: jest syntetyzowana w zakończeniach neuronów, magazynowana w ziarnistościach synaptycznych, skąd uwalniana jest pod wpływem impulsu (fali depolaryzacji błony komórkowej) do szczeliny synaptycznej, a następnie łącząc się z receptorami na błonie postsynaptycznej przekazuje pobudzenie na sąsiednią komórkę. Obecnie

rozdziela się dwie grupy receptorów dopaminowych: grupę D₁ (należą do niej receptory D₁ i D₅) oraz grupę D₂ (należą do niej receptory D₂, D₃ i D₄). Receptory D₂ i D₃ mogą być autoreceptorami (rozmieszczonymi na błonie presynaptycznej synapsy) hamującymi uwalnianie dopaminy i aktywność neuronów dopaminowych. Po odłączeniu od receptorów, głównym sposobem unieczynniania dopaminy jest jej wychwyty zwrotny ze szczeliny synaptycznej do zakończenia neuronu, z którego została uwolniona. W procesie tym uczestniczy **transporter dopaminowy (DAT)**, należący do dużej rodziny transporterów zależnych od Na⁺/Cl⁻, wraz z transporterami serotoniny (SERT), noradrenaliny (NET), glicyny, kreatyniny i tauryny. Każdy z tych transporterów jest kodowany przez jeden gen. Białko DAT stanowi również punkt uchwytu działania dla środków psychostymulujących, takich jak amfetamina i kokaina. Hamując aktywność DAT powodują one znaczny wzrost poziomu pozakomórkowej dopaminy w mózgu. Obecność DAT stwierdzono w strukturach dopaminowych mózgu, w których są umiejscowione ciała komórek dopaminowych szlaku pozapiramidowego (substantia nigra pars compacta – SNC) i mezolimbicznego (ventral tegmental area – VTA), a przede wszystkim w najwyższych stężeniach w tych strukturach, w których występują zakończenia neuronów dopaminowych: w prążkowie (striatum) i NAC [7,8].

W pracy przedstawiono krótką charakterystykę behawioralną i farmakologiczną **myszy genetycznie zmodyfikowa-**

nych, wykazujących brak genu kodującego białko DAT (myszy DAT knock-out, DAT-KO, homozygoty DAT^{-/-}), jako zwierzęcego modelu nasilonej aktywności układu dopaminowego i towarzyszących jej zaburzeń homeostazy dopaminowej. W pracy pominięto szczegóły dotyczące samego sposobu otrzymywania wymienionej linii myszy (za pośrednictwem rekombinacji homologicznej), opisywanych w oryginalnych pracach źródłowych [6].

CHARAKTERYSTYKA BEHAVIORALNA I FARMAKOLOGICZNA MYSZY DAT-KO

Podstawowe typy zachowań

Usunięcie genu kodującego białko DAT prowadzi do wielu zmian fizjologicznych, wynikających głównie z tego, iż myszy DAT-KO wykazują prawie 5-krotny wzrost stężenia pozakomórkowej dopaminy w prążkowie i NAC, utrzymujący się około 100-krotnie dłużej niż w obecności DAT [3,12]. Charakterystyczną cechą jest to, że ich masa ciała wzrasta o wiele wolniej, niż myszy heterozygotycznych (DAT^{+/-}), mających jedną kopię genu i 50% białka DAT, a zwłaszcza w porównaniu z myszami wild-type (WT, DAT^{+/+}), niepozbawionymi genu kodującego DAT. U myszy DAT-KO obserwowano duży odsetek przedwczesnej śmierci, około 68% potomstwa przeżywa pierwsze 10 tygodni, w porównaniu z 98% myszek WT. Wynika to m.in. z zaburzeń przyjmowania pokarmu. Dodatkowo, samice DAT-KO wykazują zaburzenia laktacji (sama dopamina jest zaangażowana w wytwarzanie hormonów przysadki, w tym prolaktyny) i zmniejszoną zdolność do opieki nad potomstwem [6,12,13]. U myszy tych obserwuje się również upośledzenie pamięci przestrzennej i uczenia się. Wskutek wzrostu poziomu pozakomórkowej dopaminy, myszy DAT-KO wykazują znaczną hiperaktywność (horyzontalną i wertykalną) w nowym otoczeniu, która nie podlega habituacji (utrzymuje się nawet po wielokrotnej ekspozycji) i jest znoszona przez antagonistów receptorów dopaminowych (neuroleptyki haloperydol i klozapinę) [13]. Efekt ten jest niemal identyczny do hiperlokomocji obserwowanej po dużych dawkach psychostymulantów u myszy WT.

NASTĘPSTWA DZIAŁANIA ŚRODKÓW PSYCHOSTYMULUJĄCYCH I MORFINY U MYSZY DAT-KO

Wiadomo, iż działania **amfetaminy** są związane z uwalnianiem przez nią amin katecholowych z miejsc ich magazynowania w pęcherzykach synaptycznych do szczeliny synaptycznej i hamowaniem ich wychwytu zwrotnego w wyniku działania hamującego na białko DAT, a przy większych dawkach z hamowaniem ich metabolizmu przez blokowanie monoaminooksydazy typu A (MAO-A). DAT uczestniczy również w transporcie amfetaminy do wnętrza zakończenia nerwowego. Głównym mechanizmem działania **kokainy** jest hamowanie wychwytu zwrotnego katecholamin, również w wyniku jej działania na białka transportujące. Oba związki wykazują podobne powinowactwo do DAT, SERT i NET, jednak uważa się, że ich hiperlokomotoryczne i nagradzające efekty są związane z działaniem na DAT.

Przy całkowitym usunięciu genu kodującego białko DAT, czyli przy znacznie podwyższonym stężeniu pozakomórkowej dopaminy, kokaina i amfetamina nie powodują dalsze-

go wzrostu aktywności lokomotorycznej myszy DAT-KO. W przeciwieństwie do myszy WT, u tych myszy obserwuje się wyraźnie **słabszą aktywność motoryczną** po podaniu psychostymulantów, podczas gdy u myszy heterozygotycznych efekt ten jest dwufazowy: hipolokomocja po mniejszej, a hiperlokomocja po większej dawce amfetaminy [11]. Wyniki te wskazują na główną rolę DAT w efektach hiperlokomotorycznych psychostymulantów. Dodać należy, że osłabienie aktywności motorycznej po podaniu amfetaminy obserwowany u myszy KO i heterozygotycznych nie jest związany ze wzrostem poziomu stereotypii. Przeciwnie, zachowania stereotypowe, takie jak np. wspinanie, wspinanie się, czy też czyszczenie są nieznacznie osłabione po podaniu amfetaminy u myszy homo- i heterozygotycznych [11]. Omawiając wpływ psychostymulantów na aktywność lokomotoryczną myszy DAT-KO zwrócić należy również uwagę na osłabianie przez nie objawów towarzyszących zespołowi ADHD u dzieci, głównie pobudzenia aktywności lokomotorycznej.

Interesujące wyniki otrzymano również po przewlekłym podawaniu amfetaminy przy zastosowaniu protokołu sensytyzacji (odwrotnej tolerancji) [11]. Sensytyzacja polega na nasilaniu się efektów działania danego związku w miarę jego podawania i związana jest z wytwarzaniem się długoterminowych zmian neuroadaptacyjnych. W miarę podawania amfetaminy przez 8 kolejnych dni, u myszy WT rozwija się sensytyzacja na jej efekty hiperlokomotoryczne, czyli aktywność lokomotoryczna myszy rośnie w miarę podawania amfetaminy. U myszy heterozygotycznych i DAT-KO, wcześniej opisywane osłabienie aktywności motorycznej po amfetaminie utrzymuje się po jej przewlekłym podawaniu, ale jedynie u heterozygot dochodzi do jego nasilenia w miarę podawania amfetaminy, czyli jedynie u tych myszy, przy obecności 50% białka DAT, rozwija się sensytyzacja na efekty hipolokomotoryczne amfetaminy. Całkowity brak DAT uniemożliwia więc rozwój sensytyzacji lokomotorycznej. Skoro wiadomo, że całkowite usunięcie genu kodującego białko DAT wiąże się z około 10-krotnym wzrostem stężenia pozakomórkowej dopaminy w NAC i prążkowie [12], efekt ten naśladować może działanie amfetaminy i zapobiegać rozwojowi sensytyzacji.

Przy braku DAT rozwijają się pewne mechanizmy kompensacyjne, takie jak zmniejszenie uwalniania dopaminy, spadek aktywności autoreceptorów dopaminowych (presynaptycznych), spadek gęstości receptorów D₁ i D₂ postsynaptycznych (przynajmniej niektórych ich populacji) w VTA i SNC. Istnieniem właśnie tych zmian adaptacyjnych tłumaczy się większość efektów obserwowanych u myszy DAT-KO [6], łącznie z opisanymi wyżej.

Wiele danych literaturowych wskazuje na pewne paradoksalne typy działań środków psychostymulujących u myszy DAT-KO. Jednym z nich jest nasilanie uwalniania dopaminy w NAC przez te związki [2] oraz **utrzymywanie się działań nagradzających** kokainy i amfetaminy (samopodawanie i warunkowa preferencja miejsca) przy całkowitym braku DAT [1,7,8]. W modelu samopodawania, zwierzęta poddawane są najpierw operacyjnemu wprowadzeniu odpowiedniej kaniuli, a następnie uczone są wykonywania reakcji naciskania dźwigni w klatce Skinnera celem podania badanego związku, najczęściej dożylnie lub do określonych struktur o.u.n. Test warunkowej preferen-

cji miejsca opiera się na klasycznym warunkowaniu instrumentalnym (warunkowanie pawłowowskie), w trakcie którego dane środowisko (np. część aparatu o określonym kolorze lub strukturze podłoża), kojarzone z podawaniem badanego związku mającego działanie nagradzające, przejmując jego właściwości motywacyjne. Zwierzęta wyraźnie preferują tę część aparatu, która uprzednio kojarzona była z podawaniem tego związku i spędzają w niej znacznie więcej czasu niż przed treningiem.

Tłumacząc zjawisko utrzymywania się działań nagradzających kokainy i amfetaminy u myszy DAT-KO autorzy sugerują, iż przy braku DAT, psychostymulanty działają (hamująco) na inne, alternatywne punkty uchwytu, np. NET, który to transporter również uczestniczy w wychwycie zwrotnym dopaminy. Potwierdzeniem tej sugestii są wyniki otrzymane po zastosowaniu reboksetyny, selektywnego blokera NET, która również nasilała uwalnianie dopaminy w NAC u myszy DAT-KO, pozostając bez wpływu na poziom dopaminy u myszy WT [2]. Jednak, opierając się na innych doniesieniach, wskazać można również na przypuszczalną rolę transportera SERT w tych paradoksalnych efektach psychostymulantów u myszy DAT-KO, skoro związki, które nasilają przekazywanie serotoniny (fluoksetyna, L-tryptofan) także obniżają hiperlokomocję w tych myszy [5,11]. Przy całkowitym braku DAT, psychostymulanty działają mogą więc na inne, alternatywne punkty uchwytu, jak właśnie NET lub SERT.

W przypadku **morfiny** również obserwowano różnice w efektach behawioralnych u myszy DAT-KO i WT. I tak, warunkowa preferencja miejsca indukowana morfiną była silniej zaznaczona, a morfinowe objawy odstawienne indukowane naloksonem osłabione u myszy DAT-KO w porównaniu z WT [12]. W pierwszym z użytych testów badania przeprowadzono z użyciem klatek złożonych z dwóch części różniących się kolorem ścian i strukturą podłoża. Po podaniu morfiny, zwierzęta umieszczane były na 20 minut w jednej z tych części, natomiast druga część kojarzona była z podawaniem soli fizjologicznej. Trening taki trwał 8 dni, a następnie przeprowadzono test, w trakcie którego mierzono czas przebywania myszy w obu częściach klatki. Wykazano, iż zwierzęta wyraźnie preferowały tę część aparatu, która uprzednio kojarzona była z podawaniem morfiny i spędzały tam znacznie więcej czasu niż przed treningiem, co świadczy o silnym działaniu nagradzającym morfiny. W drugim z użytych testów, zależność fizyczną

wywoływano podając myszom morfinę (we wzrastających dawkach), dootrzewnowo, dwa razy dziennie. Objawy odstawienne indukowane pojedynczą dawką antagonisty opioidowego naloksonu, 2 godziny po ostatniej iniekcji morfiny. Objawy odstawienne, takie jak: otrzępywania, skoki, drżenia przednich łap i węszenie obserwowano i liczone w ciągu 30 minut po iniekcji naloksonu.

Podobnie jak psychostymulanty, także morfina nasilała aktywność mezo limbicznych neuronów dopaminowych u myszy DAT-KO. Jednocześnie wykazano, iż morfina nie wywoływała zmian aktywności lokomotorycznej u tych myszy i na tej podstawie autorzy sugerują istnienie dysocjacji między nagradzającymi właściwościami morfiny a jej wpływem na lokomocję, podobnie jak w przypadku środków psychostymulujących. Odrębne mechanizmy neuronalne warunkować mogą rozwój obu typów działań tych związków.

Nowsze doniesienia literaturowe wyraźnie wskazują również na udział aminokwasów pobudzających, czyli układu glutaminergicznego i receptorów N-metylo-D-asparagianinu (NMDA) w hiperlokomocji i innych efektach behawioralnych obserwowanych u myszy DAT-KO [4]. Wykazano, iż hiperaktywność myszy DAT-KO jest nasilana przy osłabieniu przekazywania glutaminergicznego w wyniku zastosowania antagonistów receptora NMDA. Dodatkowo, blokada tych receptorów zapobiegała występowaniu osłabienia aktywności motorycznej u tych myszy, wywołanej podaniem psychostymulantów lub leków nasilających przekazywanie serotoniny. Sugeruje to pośredni udział neuronów glutaminergicznym we wzajemnych interakcjach między dopaminą a serotoniną, również przy współistniejącym nasileniu aktywności układu dopaminowego.

PODSUMOWANIE

Na zakończenie podkreślić należy, iż myszy DAT-KO stanowią atrakcyjny i wiarygodny model nasilenia przekazywania dopaminowego, stosowany w badaniach behawioralnych i elektrofizjologicznych, celem dokładnego opisu molekularnych mechanizmów, towarzyszących utrzymującemu się podwyższonemu poziomowi pozakomórkowej dopaminy. Model ten pozwala również zrozumieć podłoże wielu schorzeń, związanych z zaburzeniami przekazywania dopaminowego u ludzi, co umożliwiłoby może zastosowanie właściwej farmakoterapii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Budygin E.A., Brodie M.S., Sotnikova T.D., Mateo Y., John C.E., Cyr M., Gainetdinov R.R., Jones S.R.: Dissociation of rewarding and dopamine transporter-mediated properties of amphetamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 7781–7786
- [2] Carboni E., Spilewoy C., Vacca C., Nosten-Bertrand M., Giros B., Di Chiara G.: Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *J. Neurosci.*, 2001; 21: 1–4
- [3] Gainetdinov R.R., Jones S.R., Caron M.G.: Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol. Psychiatry*, 1999; 46: 303–311
- [4] Gainetdinov R.R., Mohn A.R., Bohn L.M., Caron M.G.: Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11047–11054
- [5] Gainetdinov R.R., Wetsel W.C., Jones S.R., Levin E.D., Jaber M., Caron M.G.: Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*, 1999; 283: 397–401
- [6] Giros B., Jaber M., Jones S.R., Wightman R.M., Caron M.: Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 1996; 379: 606–612
- [7] Ishiwata K., Koyanagi Y., Abe K., Kawamura K., Taguchi K., Saitoh T., Toda J., Sano T.: No reduction of dopamine transporter binding sites in mice following treatment with the TIQ analogue 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *Brain Res.*, 2003; 960: 282–285
- [8] Lorenc-Koci E., Antkiewicz-Michaluk L., Wardas J., Zapala M., Wieronska J.: Effect of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline administration under conditions of CYP2D inhibition on dopamine metabolism, level of tyrosine hydroxylase protein and the binding of [3H]GBR 12,935 to dopamine transporter in the rat nigrostriatal, dopaminergic system. *Brain Res.*, 2004; 1009: 67–81

- [9] Rocha B.A.: Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 479: 107–115
- [10] Sora I., Wickems C., Takahashi N., Li X.F., Zeng Z., Revay R., Lesch K.P., Murphy D.L., Uhl G.R.: Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 7699–7704
- [11] Spielewoy C., Biala G., Roubert C., Hamon M., Betancur C., Giros B.: Hypolocomotor effects of acute and daily d-amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Psychopharmacology*, 2001; 159: 2–9
- [12] Spielewoy C., Gonon F., Roubert C., Fauchay V., Jaber M., Caron M., Roques B.P., Hamon M., Betancur C., Maldonado R., Giros B.: Increased rewarding properties of morphine in dopamine transporter knockout mice. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 1827–1837
- [13] Spielewoy C., Roubert C., Hamon M., Nosten-Bertrand M., Betancur C., Giros B.: Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav. Pharmacol.*, 2000; 11: 279–290