

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

ЭТАНОЛ СПОСОБСТВУЕТ УВЕЛИЧЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ мРНК ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ-2 В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА У КРЫС

М.И. Айрапетов^{1,2}, С.О. Ереско³, А.А. Лебедев¹, Е.Р. Бычков¹, П.Д. Шабанов^{1,4}*

¹Институт экспериментальной медицины,
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12; *эл. почта: interleukin1b@gmail.com

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

³Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Изучено влияние острой, подострой и хронической алкоголизации на содержание мРНК фактора роста фибробластов 2 (FGF2) в мозге у крыс. Известно, что FGF2 участвует в функционировании дофаминергических нейронов среднего мозга. В нашем эксперименте под воздействием этанола уровень мРНК FGF2 был увеличен в эмоциогенных структурах мозга крыс. Этот эффект блокировался предварительным введением антагониста D2-подобных рецепторов хлорпромазина. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что FGF2 вовлечён в механизмы формирования алкогольной зависимости и может рассматриваться как возможная диагностическая и терапевтическая мишень при алкоголизме.

Ключевые слова: этанол; алкоголизм; FGF2; D2R; мозг; крысы

DOI: 10.18097/PBMC20206605419

ВВЕДЕНИЕ

Алкоголизм — это хроническое и рецидивирующее психическое расстройство, поражающее 6-10% населения; оно характеризуется чрезмерным неконтролируемым употреблением алкоголя и появлением синдрома отмены во время воздержания от алкоголя [1, 2]. Потребление алкоголя влияет на подкрепляющую систему мозга (мезокортиколимбическая дофаминергическая система), которая проецируется из вентральной области покрышки в прилежащее ядро, гиппокамп, миндалину и префронтальную кору. Считается, что при алкоголизме происходит активация системы вознаграждения [3, 4].

Известно, что мезокортиколимбическая дофаминергическая система играет ключевую роль в формировании алкоголизма. Исследования на грызунах показали, что этанол приводит к изменению содержания мРНК генов различных сигнальных путей в мезокортиколимбической системе, что в конечном итоге приводит к появлению тяги к употреблению этанола [3, 5].

Фактор роста фибробластов 2 (Fibroblast Growth Factor 2, FGF2) входит в семейство FGF, состоящее из 22 представителей, и участвует в развитии мозга, нейрогенезе у взрослых и нейропластичности. В частности, FGF2 участвует в функционировании дофаминергических нейронов среднего мозга [6].

Было показано, что психостимуляторы кокаин и амфетамин повышают уровень FGF2 в мозге: кокаин увеличивает уровень мРНК FGF2 в стриатуме,

префронтальной коре и гиппокампе [7], а амфетамин приводит к увеличению иммунореактивности FGF2 в вентральной области покрышки (VTA) и чёрной субстанции [8]. Содержание FGF2 положительно коррелирует со степенью индуцированной психостимуляторами двигательной активности [8]. Кроме того, амфетамин приводит к FGF2-опосредованному увеличению дендритного роста дофаминергических нейронов VTA [9]. Эти данные указывают на то, что FGF2 участвует в молекулярных механизмах, связанных с зависимостью от наркотических веществ.

В настоящем исследовании мы проверили, влияет ли этанол на уровень содержания мРНК FGF2 в эмоциогенных структурах мозга крыс и, если да, то посредством каких механизмов.

МЕТОДИКА

В работе были использованы 80 половозрелых крыс самцов линии Вистар (“Рапполово”, Россия).

В экспериментах с хронической алкоголизацией половозрелых крыс (n=24, по 8 животных в каждой экспериментальной группе) подвергали полупринудительной алкоголизации 15%-м раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6-ти мес. Контрольная группа крыс (8 животных) в качестве источника жидкости получала воду. Крыс декапитировали и извлекали структуры мозга для оценки содержания мРНК FGF2 в последний день (день окончания) хронической алкоголизации и через 24 ч после отмены этанола.

ЭТАНОЛ УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ мРНК FGF2 В МОЗГЕ У КРЫС

Для моделирования острой алкогольной интоксикации 24 половозрелым крысам однократно вводили внутрибрюшинно 20% (об/об) этанола в дозировке 2,75 г/кг (всего 16 животных), либо эквивалентный объём физиологического раствора контрольной группе крыс (8 животных). Через 4 ч и 24 ч после однократного введения этанола или физиологического раствора крыс декапитировали и извлекали структуры мозга.

Для изучения того, как дофаминовые D2-подобные рецепторы (Dopamine receptor D2, D2R) опосредуют вызванное этанолом увеличение содержания мРНК FGF2, 16 крысам предварительно вводили внутрибрюшинно антагонист D2R хлорпромазин ("Valenta Pharm", Россия) в дозировке 1 мг/кг, а другим 16 крысам эквивалентный объём физиологического раствора, и через 1 ч вводили внутрибрюшинно 20% этанол (8 животных) в дозировке 2,75 г/кг или эквивалентный объём физиологического раствора (8 животных) один раз в день в течение 7 дней. Через 4 ч и 24 ч после последней инъекции этанола или физиологического раствора крыс декапитировали и извлекали структуры мозга.

Структуры мозга (префронтальная кора, стриатум, прилежащее ядро и гиппокамп) выделяли на холоде, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C для последующего исследования уровня содержания в них мРНК.

Выделение мРНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием TRIzol реагента ("Ambion", США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб ДНКазой ("Promega", США) проводили в полном соответствии с инструкцией производителя. После обработки ДНКазой концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре "Implen NanoPhotometer P 330" ("Implen", Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата. Для последующей работы пробы выравнивали по концентрации РНК. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ)

в 25 мкл реакционной смеси с использованием обратной транскриптазы M-MuLV ("Promega").

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе Mx3005P ("Stratagene", США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green, ROX ("Syntol", Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров ("Beagle", Россия, табл. 1). Анализ каждой пробы проводили в двух параллелях. Полученные данные нормировали к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитывали в процентах по отношению к контрольной группе методом $2^{-\Delta\Delta C(T)}$.

Для статистической обработки полученных количественных данных применяли пакеты программ GraphPadPrizm v.6; SPSS SigmaStat 3,0 и Minitab 14. Для сравнения групп использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вначале мы проверили, влияет ли однократное введение этанола на содержание мРНК FGF2 в эмоциогенных области мозга, которые вовлечены в формирование тяги к этанолу. Однократное введение этанола приводило к повышению содержания мРНК FGF2 в исследуемых структурах мозга (табл. 2). Содержание мРНК FGF2 в стриатуме было увеличено через 4 ч после введения этанола и возвращалось к контрольному уровню через 24 ч. Кроме того, этанол увеличивал содержание мРНК FGF2 в прилежащем ядре через 4 ч и через 24 ч после инъекции этанола, а также в гиппокампе через 24 ч после инъекции.

Затем мы изучили влияние хронической алкоголизации на содержание мРНК FGF2 в структурах мозга. Данные таблицы 3 показывают, что в последний день хронической алкоголизации содержание мРНК FGF2 в стриатуме было увеличено, а через сутки уменьшалось до контрольных значений. Никаких достоверных изменений

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
FGF2	5'-TCAAGGATCCCAAGCGGCTCTACT-3'	5'-CACTCCCTTGATGGACACAAC-3'
GAPDH	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'

Таблица 2. Влияние однократного введения этанола на содержание мРНК FGF2 в структурах мозга крыс

	Кора	Стриатум	Прилежащее ядро	Гиппокамп
Физраствор, контроль (n=8)	100,0±9,7	100,0±9,5	100,0±10,1	100,0±11,0
Этанол, через 4 ч (n=8)	97,7±8,8	155,6±11,4*	143,4±12,9*	103,8±8,8
Этанол, через 24 часа (n=8)	105,5±9,5	109,7±12,3	128,8±12,5*	131,2±13,6*

Примечание. Здесь и в таблице 3 * — $p < 0,05$ по отношению к группе физраствор. Результаты представлены в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%.

Таблица 3. Влияние хронической полупринудительной алкоголизации на содержание мРНК FGF2 в структурах мозга крыс

	Кора	Стриатум	Прилежащее ядро	Гиппокамп
Физраствор, контроль (n=8)	100,0±10,3	100,0±8,3	100,0±11,0	100,0±9,5
Этанол, день отмены (n=8)	96,9±9,7	152,2±14,7*	107,0±9,9	103,8±11,2
Этанол, через 24 ч после отмены (n=8)	105,5±11,2	94,8±8,5	98,8±10,8	100,8±10,0

содержания мРНК FGF2 в других структурах мозга обнаружено не было.

Известно, что этанол повышает уровень дофамина в мезокортиколимбической системе [1, 3], а в наших экспериментах этанол приводил к увеличению содержания мРНК FGF2 в стриатуме. Кроме того, агонисты D2R способны увеличивать содержание мРНК FGF2 в мозге, тогда как агонисты рецепторов D1 или D3 не оказывают такого эффекта [6].

В наших экспериментах семидневное введение этанола приводило к увеличению содержания мРНК FGF2 в стриатуме (табл. 4), а предварительное введение антагониста D2R хлорпромазина блокировало действие этанола и нормализовало содержание мРНК FGF2. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что вызванное этанолом увеличение содержания мРНК FGF2 в стриатуме, по-видимому, опосредовано D2R.

Таблица 4. Влияние антагониста D2R хлорпромазина на содержание мРНК FGF2 в стриатуме крыс

	Физраствор	Хлорпромазин
Физраствор	100,0±11,9 (n=8)	90,8±9,5 (n=8)
Этанол	155,7±14,8* (n=8)	101,5±10,0# (n=8)

Примечание: * — $p < 0,05$ по отношению к группе физраствор+физраствор; # — $p < 0,05$ по отношению к группе физраствор+этанол. Стриатум извлекали через 4 ч после последней инъекции. Результаты представлены в процентах по отношению к контролю, принятому за 100%.

Результаты наших экспериментов показывают, что алкоголизация крыс приводит к увеличению уровня мРНК FGF2 в эмоциогенных структурах мозга. Мы предполагаем, что это может способствовать формированию патологической тяги к этанолу.

В наших экспериментах однократное введение этанола приводило к повышению уровня мРНК FGF2 в прилежащем ядре, стриатуме и гиппокампе. Хроническая алкоголизация способствовала более специфичному повышению содержания мРНК FGF2 только в стриатуме.

Кроме того, нами показано, что повышение содержания мРНК FGF2 в мозге после повторных введений этанола блокируется введением антагониста D2R хлорпромазина. Это позволяет предположить, что повышение содержания FGF2 опосредовано активацией D2R. Учитывая, что этанол увеличивает уровень дофамина в стриатуме [3, 10], вполне вероятно, что этанол повышает уровень мРНК FGF2 в стриатуме за счёт повышения уровня дофамина, который активирует D2R. Кроме того, отмена длительной алкоголизации приводит к снижению уровня дофамина в мозге [3, 11]. Известно, что хлорпромазин имеет низкое сродство и к другим типам рецепторов (например, адренорецептор-1 α , мускариновые рецепторы) [12], поэтому мы не можем исключить участие других видов рецепторов во влиянии этанола на содержание мРНК FGF2 в мозге. Следовательно, нельзя исключить участия и других механизмов, модулирующих содержание мРНК FGF2 в мозге при хронической алкоголизации [13, 14].

Важно отметить, что повышение уровня мРНК FGF2 в стриатуме, префронтальной коре и гиппокампе, вызванное никотином [15] или агонистом D2R хинпиролом [6], сопровождается увеличением уровня белка FGF2. Таким образом, вполне вероятно, что увеличение содержания мРНК FGF2, которое мы наблюдали, приводит к увеличению количества белка FGF2 в мозге.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Наши результаты показывают, что этанол увеличивает содержание мРНК FGF2 в эмоциогенных структурах мозга у крыс опосредованно преимущественно через D2R. Таким образом, FGF2 вовлечён в механизмы формирования алкогольной зависимости и может рассматриваться как возможная диагностическая и терапевтическая мишень при алкоголизме, что, однако требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят старшего научного сотрудника Института экспериментальной медицины (ИЭМ) Трофимова А.Н. за помощь в проведении эксперимента, а также доцента Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (СПбГПМУ) Балашова Л.Д. за предоставленных экспериментальных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт средств ИЭМ в рамках государственного задания по теме “Фармакологический анализ действия нейротропных средств, изучение внутриклеточных мишеней и создание систем направленной доставки”, шифр 0557-2019-0004, а также за счёт средств СПбГПМУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все используемые методы были одобрены этическим комитетом по уходу и использованию животных ИЭМ (протокол № 2/15 от 26.02.2015 г).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П.Д. (2015) Наркология, ГЭОТАР-Медиа, Москва. [Shabanov P.D. (2015) Narkologiya, GEOTAR-Media, Moscow.]
2. Spanagel R. (2009) *Physiol. Rev.*, **89**, 649-705.
3. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. (2008) Гормональные механизмы подкрепления, Элби-СПб, СПб. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Streltsov V.F. (2008) Gormonalnyye mekhanizmy podkrepleniya, Elbi-SPb, SPb.]

ЭТАНОЛ УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ мРНК FGF2 В МОЗГЕ У КРЫС

4. Wise R.A. (2009) Trends Neurosci., **32**, 517-524.
5. Айрапетов М.И., Сексте Э.А., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2018) Биомедицинская химия, **64**(5), 451-454. [Ayrapetov M.I., Sekste E.A., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2018) Biomeditsinskaya Khimiya, **64**(5), 451-454.]
6. Fumagalli F., Bedogni F., Maragnoli M.E., Gennarelli M., Perez J., Racagni G., Riva M.A. (2003) J. Neurosci. Res., **74**, 74-80.
7. Fumagalli F., Pasquale L., Racagni G., Riva M.A. (2006) J. Neurochem., **96**, 996-1004.
8. Flores C., Stewart J. (2000) Psychopharmacology, **151**, 152-165.
9. Mueller D., Chapman C.A., Stewart J. (2006) Neuroscience, **137**(3), 727-735.
10. di Chiara G., Imperato A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 5274-5278.
11. Weiss F., Parsons L.H., Schulteis G., Hyytia P., Lorang M.T., Bloom F.E., Koob G.F. (1996) J. Neurosci., **16**, 3474-3485.
12. Stahl S.M. (2008) Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications, Cambridge University Press, New York.
13. Gomez-Pinilla F., Dao L., Choi J., Ryba E.A. (2000) Brain Res. Bull., **53**, 283-289.
14. Riva M.A., Donati E., Tascadda F., Zolli M., Racagni G. (1994) Neuroscience, **59**, 55-65.
15. Roceri M., Molteni R., Fumagalli F., Racagni G., Gennarelli M., Corsini G., Maggio R. (2001) J. Neurochem., **76**, 990-997.

Поступила в редакцию: 24. 03. 2020.
После доработки: 25. 09. 2020.
Принята к печати: 25. 09. 2020.

ETHANOL INDUCED INCREASE OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 mRNA CONTENT IN EMOTIOGENIC BRAIN STRUCTURES OF RATS

M.I. Airapetov^{1,2}, S.O. Eresko³, A.A. Lebedev¹, E.R. Bychkov¹, P.D. Shabanov^{1,4}*

¹Institute of Experimental Medicine,

12 Acad. Pavlov str., St. Petersburg, 197367 Russia; *e-mail: interleukin1b@gmail.com

²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., St. Petersburg, 194100 Russia

³Saint-Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya emb., St. Petersburg, 199034 Russia

⁴Kirov Military Medical Academy, 6 Acad. Lebedev str., St. Petersburg, 194044 Russia

We studied the effects of acute, subacute, and chronic alcohol treatment of rats on the content of fibroblast growth factor 2 (FGF2) mRNA in various brain structures. Results suggest a possible role of FGF2 in the functioning of dopaminergic neurons in the midbrain. In our experiment, ethanol treatment of rats was accompanied by an increase in the FGF2 mRNA level in the emotiogenic structures of the brain. This effect was blocked by pretreatment of animals with chlorpromazine. This suggests FGF2 involvement in the mechanisms of alcohol dependence and can be considered as a possible diagnostic and therapeutic target in alcoholism.

Key words: ethanol; alcoholism; FGF2; D2R; brain; rats

Funding. The study was financed from the budget of Institute of Experimental Medicine and Saint-Petersburg State Pediatric Medical University.

Received: 24.03.2020; revised: 25.09.2020; accepted 25.09.2020.