

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

ХРОНИЧЕСКАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ мРНК РЕЦЕПТОРА ОРЕКСИНА ПЕРВОГО ТИПА (OX1R) В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

М.И. Айрапетов^{1,2}, Э.А. Сексте¹, С.О. Ереско³, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, П.Д. Шабанов^{1,3,4}*

¹Институт экспериментальной медицины (ИЭМ),

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

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург,

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург,

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург

Орексин и его рецепторы вовлечены в механизмы патологического влечения к алкоголю. В данной работе показано, что уровень мРНК OX1R достоверно снижается в префронтальной коре у группы хронически алкоголизованных (6 мес) крыс в сравнении с интактной группой контроля, также наблюдается сниженная экспрессия гена OX1R на первый и седьмой дни отмены этанола. В гиппокампе, напротив, наблюдается увеличение уровня мРНК OX1R на первый и седьмой дни абстиненции. В вентральной области покрышки уровень мРНК OX1R на первый и седьмой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся. Это указывает на вовлеченность префронтальной коры и гиппокампа в механизмы, опосредующие хроническую алкогольную интоксикацию.

Ключевые слова: алкоголизм; мозг; нейропептиды; орексин; OX1R

DOI: 10.18097/PBMC20186405451

ВВЕДЕНИЕ

Орексин А (ОХА) и орексин В (ОХВ) – нейропептиды, образующиеся из общего предшественника в нейронах латерального гипоталамуса. ОХА – пептид, состоящий из 33 аминокислотных остатков (а.о.), имеет два внутрицепочечных дисульфидных мостика; его N-концевая последовательность включает полиглутамильный фрагмент, С-конец амидирован. ОХВ – пептид, состоящий из 28 а.о., амидированный с С-конца. Реализация действия орексинов в клетке опосредуется орексиновыми рецепторами OX1R и OX2R. Идентичность первичных структур OX1R и OX2R составляет 64%. Идентичность аминокислотных последовательностей при сравнении человека и крысы для каждого из этих рецепторов составляет 94% для OX1R и 95% для OX2R. OX1R проявляет гораздо большее сродство к ОХА, чем к ОХВ; OX2R – примерно одинаковое сродство для обоих типов орексинов [1, 2].

Орексины были первоначально описаны как модуляторы пищевого поведения в связи с локализацией продуцирующих орексин нейронов в ограниченной области латерального гипоталамуса, известного центра насыщения головного мозга [1]. Дальнейшие исследования показали участие орексинов в регуляции цикла сон-бодрствование [3].

Недавно доказано, что система орексина участвует в механизмах алкогольной аддикции, способствуя активации механизмов, направленных на поиск алкоголя в период абстиненции [4]. Значительное число исследований подтверждает вклад ОХА и ОХВ в развитие патологического влечения к алкоголю, но особая роль каждого подтипа рецептора

к орексинам остаётся спорной [5]. Экспрессия генов, кодирующих ORXR1, так и ORXR2, наблюдается во всех областях мозга и на периферии, хотя и с разной плотностью. При этом точно известно, что OX1R экспрессируется преимущественно в эмоциогенных структурах мозга - префронтальной коре, гиппокампе, вентральной области покрышки [6, 7]. В связи с недостаточной изученностью и иногда противоречивостью экспериментальных данных о дисрегуляции рецепторов орексина при алкоголизме, мы поставили цель определить уровень экспрессии генов OX1R в условиях длительной алкоголизации и в период абстиненции в ряде эмоциогенных структур мозга крыс, включая префронтальную кору, гиппокамп и вентральную область покрышки.

МЕТОДИКА

В работе были использованы 40 крыс-самцов линии Вистар, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область), с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества №86/609 ЕС), одобрённых Этическим комитетом ИЭМ. Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой. В экспериментах с хронической алкоголизацией половозрелых крыс (начальный возраст 3-4 месяца) подвергали полупринудительной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6 мес. Контрольная группа крыс в качестве источника жидкости получала воду. По истечении этого времени крыс декапитировали, выделяя группы животных с 6-месячной алкоголизацией и через одни и семь суток после отмены алкоголя. Образцы структур мозга

* - адресат для переписки

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ мРНК РЕЦЕПТОРА ОРЕКСИНА ПРИ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

(префронтальная кора, гиппокамп, вентральная область покрышки) немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа. Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol ("Ambion", США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 25 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, "Promega", США). Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени ("Mx3005P", "Stratagene", США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green, ROX ("Синтол", Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров, подобранных и синтезированных в компании "Beagle" (Россия) (таблица).

Полученные данные нормированы к уровню экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и рассчитаны в относительных единицах по отношению к величине экспрессии OX1R методом $2^{-\Delta(\Delta C(T))}$. Ген домашнего хозяйства (GAPDH) был выбран, исходя из того, что ранее проведенные исследования свидетельствуют о незначительном изменении экспрессии данного гена в условиях алкоголизации [8].

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

Таблица. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры		Длина
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')	
<i>GAPDH</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	20
<i>OX1R</i>	GTGGCAAATTTCCGGGAGCAG	GCTCTGCAAGGACAAGGACT	20

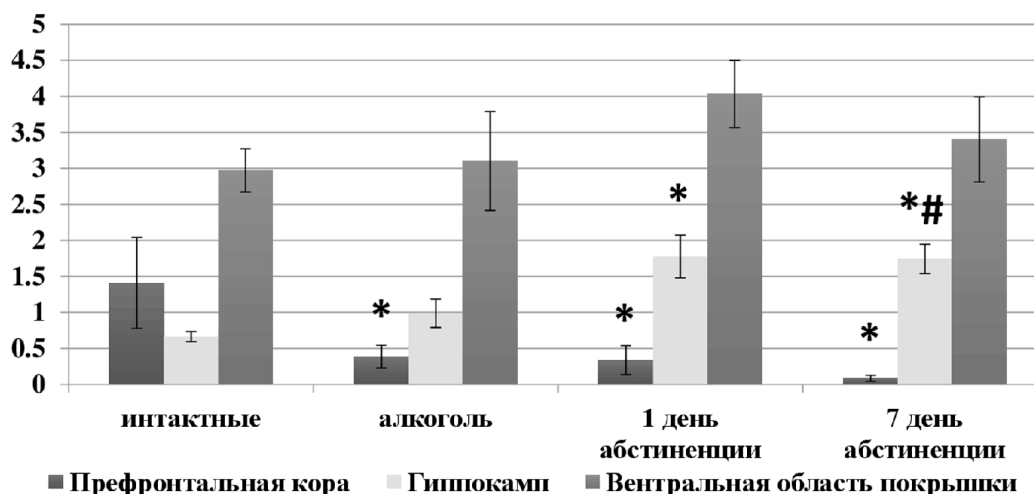


Рисунок. Влияние алкоголизации и отмены алкоголя на уровень экспрессии гена OX1R в структурах мозга крыс. По оси ординат - условные единицы. * - $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; # - $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизованных крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что уровень мРНК OX1R достоверно снизился в префронтальной коре у группы хронически алкоголизованных крыс в сравнении с интактной группой контроля (рисунок). На первый и седьмой дни отмены этанола наблюдали дальнейшее достоверное снижение экспрессии гена OX1R.

В гиппокампе получены противоположные результаты, где наблюдали достоверное увеличение уровня мРНК OX1R на первый и седьмой дни отмены этанола. В условиях наших опытов в вентральной области покрышки уровень мРНК OX1R у групп абстиненции на первый и седьмой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся.

Показано, что важную роль в регуляции функций префронтальной коры играют возбуждающие пептиды – орексины. ОХА рассматривается как один из возбуждающих пептидных нейромедиаторов в префронтальной коре, действие которого реализуется посредством активации OX1R [9]. Имеется ряд исследований, показывающих, что OX1R является единственным рецептором орексина, обнаруженным в префронтальной коре [5].

Прямое возбуждающее действие ОХА на нейроны префронтальной коры может способствовать модуляции её активности и играть роль в когнитивном возбуждении [10]. Хотя точные клеточные и синаптические механизмы развития алкогольной зависимости ещё не определены окончательно, имеются данные, что глутаматергическая

сигнализация между префронтальной корой и прилежащим ядром (nucleus accumbens) является важным фактором, способствующим восстановлению алкогольной зависимости (мотивации), что приводит к высокому проценту рецидивов среди пациентов с синдромом отмены алкоголя. Потребление алкоголя усиливает возбуждающие постсинаптические токи в нейронах префронтальной коры [11]. Известно, что префронтальная кора вовлечена в регуляцию поискового поведения, ассоциированного с большинством наркотических средств, включая кокаин и этанол. Предполагается, что модулируя поведенческие ответы для поиска этанола префронтальная кора, вентральная область покрышки и прилежащее ядро вовлечены в дофамин-зависимый путь [12].

В литературе имеются краткие сведения о функциях и дисрегуляции рецепторов орексина в гиппокампе, однако известно, что оба типа рецепторов здесь присутствуют, хотя и с разной плотностью [6, 13]. Исследования показывают, что введение антагонистов орексина SB334867 (OX1R) и TCSOX229 (OX2R) в CA1 поле гиппокампа ослабляет развитие условного предпочтения места, вызванного химической стимуляцией латерального гипоталамуса. Однако это снижение было более значительным при использовании антагониста OX1R в сравнении с животными, которым вводили антагонист OX2R [7]. В нашем эксперименте наблюдалось достоверное увеличение уровня мРНК OX1R на первый и седьмой дни абстиненции.

Важно отметить, что в моделях хронической алкогольной зависимости были исследованы более 20 генов, в результате получены данные об изменении их активности при алкоголизме [14]. В связи с этим интерес в изучении функциональной активности генов, в том числе орексинов, растёт [14, 15]. Исследования показывают, что вентральная тегментальная область среднего мозга принимает участие в модуляции сигнальных путей, связанных с патологическим влечением к алкоголю и к другим психоактивным веществам [16], однако в наших исследованиях уровень мРНК рецепторов орексина не изменялся, как в группе хронически алкоголизированных животных, так и в группах первого и седьмого дня отмены алкоголя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многочисленные исследования механизмов, вовлечённых в развитие алкоголизма, всё ещё остаётся много неясных и противоречивых вопросов. Известно, что орексин и его рецепторы вовлечены в механизмы патологического влечения к алкоголю, однако сведения об экспрессии гена OX1R в гиппокампе крыс противоречивы. В проведенных нами исследованиях было показано, что уровень мРНК OX1R достоверно снижается в префронтальной коре у группы хронически алкоголизированных крыс в сравнении с интактной группой контроля, также наблюдается сниженная экспрессия гена OX1R на первый и седьмой дни отмены этанола. В гиппокампе, напротив, наблюдается увеличение

уровня мРНК OX1R на первый и седьмой дни абстиненции. В вентральной области покрышки в нашем эксперименте уровень мРНК OX1R у групп абстиненции на первый и седьмой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся. Это указывает на вовлечённость прежде всего префронтальной коры и гиппокампа в механизмы, опосредующие хроническую алкогольную интоксикацию. Изменение уровня мРНК рецептора в структурах-мишенях при хронической алкоголизации может быть связано с изменением экспрессии мРНК самого эндогенного лиганда орексина.

Вентральная область покрышки рассматривается как типичная дофаминергическая структура, обеспечивающая механизм исполнения эмоциональных реакций, связанных в том числе и с длительным приёмом этанола. По-видимому, модулирующее действие орексинов на дофаминергические нейроны в этой структуре не обеспечивает значимого влияния на контроль эмоциональных реакций при алкоголизме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sakurai T., Amemiya M. (1998) Cell, **92**, 573-585. PMID: 9491897
2. Kukkonen J.P., Leonard C.S. (2014) Br. J. Pharmacol., **171**, 314-331. DOI: 10.1111/bph.12324
3. De Lecea L. (2012) Prog. Brain Res., **196**, 234-248. DOI: 10.1016/B978-0-444-59489-1.00003-3
4. Lawrence A.J., Michael S.C., Hong-Ju Y., Feng C., Brian O. (2006) Br. J. Pharmacol., **148**(6), 752-759. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706789
5. Sharf R., Sarhan M., Di Leone R.J. (2010) Brain Res., **1314**, 130. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.08.028
6. Lu X.Y., Bagnol D., Burke S. (2000) Horm. Behav., **37**, 1529-1533. DOI: 10.1006/hbeh.2000.1584
7. Rashidy-Pour A., Moradi M., Fatahi Z., Haghparast A., Haghparast A. (2015) Behav. Brain Res., **15**, 106-111. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.10.051
8. Wang S., Wang J., Lv X. (2018) Int. J. Molec. Med., **41**, 3527-3536. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3527
9. Xia J., Chen X., Song C., Ye J., Yu Z., Hu Z. (2005) J. Neurosci. Res., **82**, 729-736. DOI: 10.1002/jnr.20667
10. Yan J., He C.J.X., Zhang D., Hu Z.A. (2012) Neurosci. Lett., **520**, 92-97. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.05.038
11. Klenowski P.M. (2018) Addict. Behav., **77**, 102-106. DOI: 10.1016/j.addbeh.2017.09.024.5
12. Baimel C., Bartlett S.E., Chiou L.C., Lawrence A.J., Muschamp J.W., Patkar O., Tung L.W., Borgland S.L. (2015) J. Pharmacol., **172**, 334-348. DOI: 10.1111/bph.12639
13. Marcus J.N., Aschkenasi C.G., Lee C.E. (2001) J. Comp. Neurol., **435**, 6-25. DOI: 10.1002/cne.1190
14. Matsumoto I. (2009) Alcohol Alcohol., **44**, 171-176. DOI: 10.1093/alcac/agn104
15. Айрапетов М.И., Хохлов П.П., Бычков Е.Р., Сексте Э.А., Якушина Н.Д., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2015) Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, **13**, 10-13.
16. Olney J.J., Navarro M., Thiele T.E. (2017) Alcohol Clin. Exp. Res., **41**(3), 551-561. DOI: 10.1111/acer.13336

Поступила: 14. 09. 2018.
Принята к печати: 25. 10. 2018.

CHRONIC ALCOHOLISM INFLUENCES THE mRNA LEVEL OF THE OREXIN RECEPTOR TYPE 1 (OX1R) IN EMOTIOGENIC STRUCTURES OF THE RAT BRAIN

M.I. Airapetov^{1,2}, E.A. Sekste¹, S.O. Eresko³, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, P.D. Shabanov^{1,3,4}*

¹Institute of Experimental Medicine,
12 Acad. Pavlov str., St. Petersburg 197376 Russia; *e-mail: interleukin1b@gmail.com

²St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, 199034 Russia

³St. Petersburg State University, St. Petersburg, 194044 Russia

⁴Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194100 Russia

Orexin and its receptors were shown to be involved into mechanisms of pathological craving to alcohol. This paper demonstrates that the orexin receptor type 1 (OX1R) mRNA level significantly decreased in the prefrontal cortex of rats chronically (during 6 months) consuming ethanol compared with intact control. The same results were observed on day 1 and day 7 of alcohol withdrawal after chronic alcoholization. On the contrary, in the hippocampus, the OX1R mRNA level increased on day 1 and day 7 of alcohol withdrawal. In the ventral tegmental area, the OX1R mRNA level did not change on the day 1 and day 7 of alcohol withdrawal compared with the groups of chronic alcoholization and intact control. These findings point out involvement of the prefrontal cortex and hippocampus first of all in mechanisms mediating chronic alcohol intoxication. The ventral tegmental area is described as a typical dopaminergic structure providing the executive mechanism of emotion reactions connected with alcohol abuse in particular. It is possible, that the modulating action of orexins on dopaminergic neurons in this structure does not provide a significant effect on control of emotion reactions in alcoholism.

Key words: alcoholism; neuropeptides; orexin; OX1R