

© Коллектив авторов

ОТМЕНА ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ КОЛИЧЕСТВА мРНК CRFR2 В ВЕНТРАЛЬНОЙ ТЕГМЕНТАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА У КРЫС

М.И. Айрапетов^{1,2}, С.О. Ереско³, Э.А. Сексте¹, 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

³Университет ИТМО,

197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова,

Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Нейромедиаторные системы мозга подвержены дисрегуляции в период алкогольной абстиненции. Это способствует развитию состояния патологического влечения к алкоголю. Предполагается, что в механизм развития тяги к алкоголю вовлечены рецепторы кортиколиберина второго типа (CRFR2). В данной работе показано, что в период отмены алкоголя уровень мРНК CRFR2 в вентральной тегментальной области мозга на седьмые сутки абстиненции был достоверно увеличен в сравнении с группой контроля, что свидетельствует в пользу возможного участия CRFR2 в модуляции дофаминергических и ГАМК-ергических нейронов в вентральной тегментальной области мозга.

Ключевые слова: длительная алкоголизация; абстиненция; рецепторы кортиколиберина; CRFR2

DOI: 10.18097/PBMC20196505385

ВВЕДЕНИЕ

Работы последних лет показывают вовлечённость гипоталамического нейрого르몬а кортиколиберина (CRF, corticotropin-releasing factor) в регуляцию аддиктивного поведения [1-4]. Уже более 20 лет исследователи занимаются поиском ключевых нейробиологических основ, способствующих развитию патологического влечения к алкоголю [5-7]. Период отмены алкоголя (абстинентный период) характеризуется повышенной раздражительностью, беспокойством, нарушенным сном, агрессивным поведением [1, 8]. В этот период также наблюдается повышенный уровень высвобождения кортиколиберина гипоталамусом [1, 3]. Исследователи полагают, что важную роль в механизмах зависимости от алкоголя может играть кортиколиберин, который высвобождается из нейронов BNST (bed nucleus of the stria terminalis, терминальная полоска) [1, 2, 7, 9-11]. Высвободившийся CRF связывается со своими метаботропными рецепторами – CRFR1 (corticotropin releasing factor receptor 1) и CRFR2 (corticotropin releasing factor receptor 2) [11].

Несмотря на то, что существуют исследования, которые показывают, что CRFR2 вовлечён в механизмы развития патологического влечения к психоактивным веществам [1, 4, 11], уровень экспрессии гена *CRFR2* в ключевых структурах мозга, ассоциированных с развитием симптомов патологического влечения к алкоголю (префронтальная кора, вентральная тегментальная область, гиппокамп), в период абстиненции ранее не был изучен, что и послужило целью данной работы.

МЕТОДИКА

В экспериментах с хронической алкоголизацией взрослых крыс (n=42) подвергали полупринудительной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6-ти месяцев при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Контрольная группа животных (n=14) получала воду. Первую группу из 14 алкоголизированных крыс декапитировали через 6 месяцев алкоголизации, остальных на первые и седьмые сутки абстиненции соответственно. Мозг выделяли на холоду. Образцы необходимых структур мозга (префронтальная кора, гиппокамп, вентральная тегментальная область) немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

Выделение мРНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием TRIzol reagenta (“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); чистоту выделенного препарата оценивали по отношению A260/A280 (в норме ≥1,9). Для последующей работы пробы выравняли по концентрации РНК. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 25 мкл реакционной смеси с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (“Promega”). ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе

Мх3005P ("Stratagene", США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green, ROX ("Syntol", Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров ("Beagle", Россия). Анализ каждой пробы проводили в двух параллелях. Полученные данные нормировали к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) и рассчитывали в процентах по отношению к контрольной группе методом $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. Для статистической обработки полученных количественных данных применяли программное обеспечение Graph Pad Prizm v.4. Для сравнения групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значении $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При отмене этанола у хронически алкоголизованных животных отмечено увеличение уровня мРНК CRFR2 в вентральной тегментальной области среднего мозга (англ. ventral tegmental area, VTA): на 52% на первые сутки и в 2,4 раза на седьмые сутки отмены алкоголя (рисунок). Полученные данные ещё раз подтверждают предположение предыдущих исследователей о том, что активность CRFR2 в данной структуре мозга изменяется [4, 8, 11-13]. При этом уровни мРНК CRFR2 в гиппокампе и префронтальной коре не имели статистически достоверных изменений, как в условиях длительной алкоголизации, так и в период отмены алкоголя на первые и седьмые сутки (рисунок).

VTA является начальным отделом мезокортикального и мезолимбического дофаминовых путей [1]. Из VTA дофамин транспортируется посредством аксонального транспорта в различные структуры мозга. VTA состоит из дофаминергических, ГАМК-ергических и глутаматергических нейронов. Примерно 60-65% составляют дофаминергические, 35% ГАМК-ергические, есть небольшое количество глутаматергических нейронов [9, 11].

Хорошо известно, что VTA вовлечена в формирование зависимостей от многих психоактивных веществ, таких как никотин, кокаин, героин, амфетамин [1, 13]. Дисрегуляция активности нейронов в VTA может приводить

к различным аддиктивным расстройствам, таким как страсть к азартным играм, наркотическая и алкогольная зависимость [1]. Некоторые наркотические вещества подавляют активность тормозящих ГАМК-ергических нейронов в VTA. Эти нейроны сдерживают активность дофаминовых нейронов, что является препятствием для развития устойчивых эйфорических состояний [1].

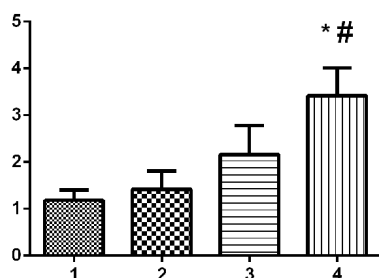
CRF вовлечён в модулирование функциональности нейронов в VTA. Паравентрикулярное ядро гипоталамуса, центральное ядро миндалины, BNST имеют проекции в VTA [7]. Исследователи полагают, что важную роль в механизмах зависимости от алкоголя может играть CRF, который высвобождается из нейронов BNST [1, 2, 7, 9-11]. Показано, что CRFR1 и CRFR2 локализованы в вентральной тегментальной области на ГАМК-ергических и дофаминергических нейронах [9]. Следовательно, CRF способен опосредованно изменять активность как ГАМК-ергических, так и дофаминергических нейронов через свои рецепторы [2, 7, 9, 10].

В нашей работе в период отмены алкоголя уровень мРНК CRFR2 в VTA на седьмые сутки был достоверно увеличен в сравнении с группой контроля. Это ещё раз свидетельствует о том, что CRFR2 подвержен изменению функциональной активности в данной структуре мозга в результате длительной алкоголизации. По-видимому, повышенная экспрессия гена *CRFR2* в данной структуре мозга, вызванная отменой алкоголя, может быть вовлечена в регуляции механизмов, ведущих к изменению активности дофаминергических и ГАМК-ергических нейронов в период абстиненции в VTA, что приводит впоследствии к развитию состояния непреодолимого желания употребить алкогольную продукцию.

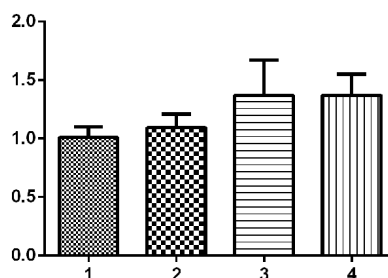
ВЫВОДЫ

Длительная алкоголизация крыс 15% этанолом в течение 6 месяцев приводит к повышению уровня мРНК CRFR2 в период абстиненции на 7-ые сутки в вентральной тегментальной области среднего мозга. В VTA CRFR2 расположены на дофаминергических и ГАМК-ергических нейронах и, следовательно, их дисрегуляция может приводить к изменению функциональной активности нейронов, на которых они локализованы.

Вентральная тегментальная область



Гиппокамп



Префронтальная кора

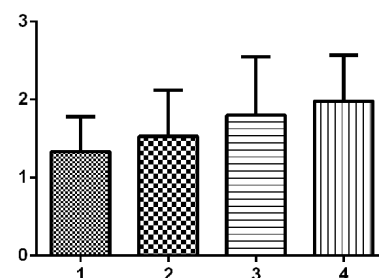


Рисунок. Количество мРНК CRFR2 в условиях длительной алкоголизации (2), на первый (3) и седьмой (4) день абстиненции по отношению к группе контроля (1). * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе контроля; # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе длительной алкоголизации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все используемые методы были одобрены Этическим комитетом по уходу и использованию животных Института экспериментальной медицины (протокол заседания №21/15 от 26.02.2015).

ЛИТЕРАТУРА

1. 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) Hormonal mechanisms of reinforcement, Elby-SPb, SPb.]
2. Koob G.F. (2009) Neuropharmacology, **56**, 18-31.
3. Rinker J.A., Marshall S.A., Mazzone C.M., Lowery-Gionta E.G., Gulati V., Pleil K.E., Thiele T.E. (2017) Biological Psychiatry, **81**(11), 930-940.
4. Tunstall B.J., Carmack S.A. (2016) J. Neurosci., **36**(34), 8780-8782.
5. Айрапетов М.И., Сексте Э.А., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2018) Биомед. химия, **64**(5), 451-454. [Airapetov M.I., Sexte E.A., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2018) Biomed. Khimiya, **64**(5), 451-454.]
6. Шабанов П.Д. (2015) Наркология, ГЭОТАР-Медиа, Москва. [Shabanov P.D. (2015) Narcology, GEOTAR-Media, Moscow]
7. Rivier C., Imaki T., Vale W. (1990) Brain Res., **520**(1-2), 1-5.
8. Albrechet-Souza L., Hwa L.S., Han X., Zhang E.Y., DeBold J.F., Miczek K.A. (2015) Alcoholism: Clin. Exper. Res., **39**(9), 1609-1618.
9. Nair-Roberts R.G., Chatelain-Badie S.D., Benson E., White-Cooper H., Bolam J.P., Ungless M.A. (2008) Neuroscience, **152**(4), 1024-1031.
10. Silberman Y., Matthews R.T., Winder D.G. (2013) J. Neurosci., **33**(3), 950-960.
11. Holly E.N., De Bold J.F., Miczek K.A. (2015) Psychopharmacology, **232**(24), 4469-4479.
12. Albrechet-Souza L., Viola T.W., Grassi-Oliveira R., Miczek K.A., Almeida R.M.M. (2017) Frontiers Pharmacol., **8**, 762.
13. Slater P.G., Noches V., Gysling K. (2015) Eur. J. Neurosci., **43**(2), 220-229.

Поступила в редакцию: 31. 03. 2019.
После доработки: 22. 04. 2019.
Принята к печати: 23. 04. 2019.

ETHANOL WITHDRAWAL LEADS TO AN INCREASE IN THE CRFR2 mRNA LEVEL IN THE VENTRICULAR TEGMENTAL REGION OF THE RAT BRAIN

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

¹Institute of Experimental Medicine,

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

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

³University ITMO, 49 Kronverkskiy pr., St. Petersburg, 197101 Russia

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

The neurotransmitter systems of the brain are exposed to dysregulation during alcohol withdrawal. This contributes to the development of the pathological craving for alcohol in which corticotropin-releasing hormone receptors are may be involved. During the period of alcohol withdrawal, the level of CRFR2 mRNA in the ventral tegmental area of the brain on the seventh day of abstinence was significantly increased in comparison with the control group. This supports existing concepts on possible participation in the modulation of dopaminergic and GABA-neural neurons in the ventral tegmental area the brain.

Key words: prolonged alcoholism; alcohol withdrawal; receptors of corticoliberin; CRFR2

Received: 31.03.2019, revised: 22.04.2019, accepted: 23.04.2019.