

Айрапетов Марат Игоревич

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ДОФАМИНОВОЙ И ГРЕЛИНОВОЙ
СИСТЕМ В ОНТОГЕНЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ
У КРЫС

03.01.04 – биохимия

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

Научные руководители:

кандидат медицинских наук **Бычков Евгений Рудольфович**;
доктор медицинских наук, профессор **Шабанов Петр Дмитриевич**

Официальные оппоненты:

Родичкин Павел Васильевич, доктор медицинских наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», кафедра теории и методики физической культуры, профессор;

Антонов Виктор Георгиевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства Обороны Российской Федерации, кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики, старший преподаватель

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»

Защита состоится « ____ » _____ 2015 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, и на сайте <http://www.iemrams.spb.ru/russian/dissov03.htm>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В головном мозге существует специализированная система нейронов, дофаминергических (ДА-ергических) по своей химической организации, которая опосредует эффекты психостимулирующих средств (Bjorklund, Dunnett, 2007; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Эта система имеет довольно четкую структурно-функциональную организацию и включает передний мозговой пучок, прилежащее ядро, вентральную область покрышки и медиальную префронтальную кору (Missale et al., 1998; Bjorklund, Dunnett, 2007; Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Она описывается как мезокортиколимбическая система мозга. По сути, эта система является жестко детерминированной исполнительной системой, которая в большинстве случаев отвечает на раздражение активацией (введение психостимуляторов) или угнетением (под действием, например, нейролептиков). Возможности изменения активности мезокортиколимбической системы повышаются при действии на нее различных нейромодуляторов, прежде всего, пептидной природы, рецепторы которых ко-локализованы на аксонах ДА-ергической проводящей системы (Шабанов П.Д. и др., 2010). Одной из таких управляющих систем рассматривается грелиновая система (Perello et al., 2010). Первоначально считалось, что грелиновая система ответственна исключительно за контроль потребления пищи (Wren et al., 2000) и регуляцию энергетического баланса (Lall et al., 2001; Tschop et al., 2000). Однако последними исследованиями, выполненными в том числе и в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), показано, что система грелина вовлекается не только в регуляцию аппетита, но и в подкрепляющие эффекты наркотических веществ (Айрапетов М.И. и др., 2013).

Степень разработанности темы

Вопрос, каким образом грелиновая система мозга вовлекается в механизмы естественного (потребление пищи, воды) и искусственного (введение наркотических веществ) подкрепления, остается до настоящего времени не ясным. Известно только, что грелин (или его компоненты – ацилированный грелин, дезацилгрелин и обестатин) активирует холинергическую и ДА-ергическую системы мозга

посредством пре- и/или постсинаптической сигнализации прямо через специфические грелиновые рецепторы (GHSR) в вентральной области покрышки, структуре, в которой локализованы ДА-ергические нейроны, формирующие передний медиальный мозговой пучок, опосредующий подкрепляющие эффекты наркотенов. Этот пучок четко локализован, содержит около 50 тысяч аксонов и дает восходящие проекции в большинство эмоциогенных структур лимбической системы (миндалины, прилежащее ядро, ядра ложа конечной полоски, безымянная субстанция, вплоть до префронтальной коры мозга). Таким образом, значение грелиновой системы в механизмах подкрепления и зависимости от разных наркотенов, включая алкоголь, до сих пор не определено. Более того, онтогенетический аспект этой проблемы вовсе не изучался. Это определило цели, задачи и дизайн настоящей работы.

Цель исследования: Изучить особенности формирования дофаминовой и грелиновой систем в онтогенезе в условиях хронической алкоголизации у крыс.

Задачи исследования:

1. Исследовать уровень дофамина (ДА) и его основного метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в эмоциогенных структурах мозга в онтогенезе у крыс, рожденных от алкоголизированных матерей.
2. Исследовать уровень экспрессии разных подтипов рецепторов дофамина и активность катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) в эмоциогенных структурах мозга в онтогенезе у крыс, рожденных от алкоголизированных матерей.
3. Исследовать экспрессию мРНК грелинового рецептора в структурах мозга у взрослых крыс в условиях полунасильственной хронической алкоголизации и в онтогенезе у крыс, рожденных от алкоголизированных матерей.
4. Исследовать уровень грелина в плазме крови у взрослых крыс в условиях полунасильственной хронической алкоголизации и в онтогенезе у крыс, рожденных от алкоголизированных матерей.

Научная новизна

В результате проведенных исследований получены новые данные об участии системы грелина в механизмах формирования зависимости от этанола, в том числе на разных этапах пренатального и раннего постнатального развития. В частности, показано, что алкоголизация беременных самок крыс тормозит развитие ДА-ергической системы (снижается содержание ДА, ДОФУК, активность КОМТ, но увеличивается экспрессия Д2-подтипов рецепторов ДА) головного мозга плодов в пре- и ранний постнатальный период развития. Перевод кормящих самок на водный режим (без алкоголя) восстанавливает активность ДА-ергической системы мозга крыс к 17-му дню постнатального развития. Уровень дезацилгрелина (активной формы грелина) в плазме крови половозрелых крыс в условиях полунасильственной хронической алкоголизации снижается, а экспрессия мРНК грелинового рецептора в головном мозге увеличивается. В пренатальный период в головном мозге плодов экспрессия мРНК грелинового рецептора в период алкоголизации матерей не меняется. Однако в постнатальный период у крысят, матери которых оставались на режиме алкоголизации или переводились на водный режим, экспрессия мРНК в головном мозге плодов в головном мозге была повышена. В то же время в плазме крови содержание дезацилгрелина было сниженным. Полученные данные подтверждают участие системы грелина в механизмах формирования зависимости от этанола. В частности, доказано, что эмоциональные расстройства, связанные с алкоголизацией, вовлекают не только ДА-ергическую систему мозга, традиционно рассматриваемую как мишень действия этанола, но и систему грелина. Последняя, имея представительство как на периферии (дезацилгрелин), так и в головном мозге (ацилированный грелин, обестатин) может выполнять модулирующую функцию на ДА-ергическую систему мозга, реализуемую как прямо, через специфические рецепторы грелина, локализованные на ДА-ергических терминалях, так и опосредованно через включение механизмов обратной связи. Это открывает возможности создания антагонистов рецепторов грелина или иных антигрелиновых веществ, которые смогут подавлять

алкогольную мотивацию либо устранять или уменьшать подкрепляющие свойства наркогенов, включая этанол.

Практическая значимость исследования

Научно-теоретическая значимость работы определяется доказательством непосредственного участия системы грелина (ацилированный грелин, дезацилгрелин, рецепторы грелина GHSR) в механизмах ответа организма и головного мозга, в частности, на алкоголизацию. Этот ответ обычно описывают как реакцию DA-ергической системы мозга, опосредующей разнообразные эмоционально-мотивационные реакции. В данном исследовании доказано модулирующее действие грелина на DA-ергические ответы, проявляющееся изменением активности подтипов рецепторов DA и активности ферментов катаболизма катехоламинов в головном мозге. Главным практическим результатом исследования стало выяснение факта, что алкоголизация крыс в период беременности меняет экспрессию мРНК рецепторов грелина GHSR в эмоциогенных структурах мозга, которая способна восстанавливаться в постнатальный период независимо от того, алкоголизировалась ли мать или нет в период вскармливания. То есть, вероятность развития дисфункции эмоциональных реакций, вызванных алкоголизацией в период беременности, в постнатальный период уменьшается. Это подтверждает существующие основополагающие выводы, что эмоциональные расстройства по типу девиантных отклонений связаны, в основном, с воздействиями неблагоприятных факторов среды именно в ранний постнатальный период (у крыс с 4-го по 17-й день жизни), а не в пренатальный период жизни животного (Шабанов П.Д. и др., 2004). Второй практический вывод работы состоит в обосновании возможности создания антагонистов грелина как потенциальных лекарственных средств антиаддиктивной направленности.

Методология и методы исследования

Методология исследования состояла в изучении биохимических последствий пренатального и постнатального воздействия этанола на организм беременных самок крыс Вистар и их потомства в период вскармливания, а также

в процессе хронической алкоголизации взрослых крыс. В качестве основных методов исследования было определено экспрессию мРНК разных подтипов рецепторов ДА, ферментов катаболизма катехоламинов (КОМТ), рецептора грелина GHSR и содержания ДА и его метаболитов (ДОФУК) в головном мозге, а также концентрации дезацилгрелина в плазме крови крыс. Исследования выполнены с соблюдением всех правил доказательной медицины.

Положения, выносимые на защиту:

1. Алкоголизация крыс в период беременности изменяет активность ДА-ергической системы мозга, что проявляется снижением уровня ДА, а также мРНК КОМТ в структурах переднего мозга, а также увеличением содержания мРНК длинного и короткого сплайс-вариантов дофаминового рецептора D2-типа. Параллельно снижается уровень дезацилгрелина в сыворотке крови плодов однако экспрессия мРНК рецептора грелина в мозге компенсаторно увеличивается. Отмена алкоголизации у самок крыс в период вскармливания потомства ведет к частичному восстановлению биохимических изменений в головном мозге крысят в период с 4-го по 17-й день их жизни.

2. Полунасильственная алкоголизация взрослых крыс 15%-ным раствором этанола в течение 6-ти месяцев существенно не меняет уровень экспрессии мРНК грелинового рецептора в эмоциогенных структурах мозга (прилежащее ядро, гипоталамус, гиппокамп, префронтальная кора). Однако отмечается снижение содержания дезацилированного грелина в крови, развивающегося в процессе хронической алкоголизации.

3. В период отмены этанола после его хронического введения в головном мозге крыс развиваются процессы, противоположные зарегистрированным при алкоголизации. В частности, увеличивается экспрессия мРНК грелинового рецептора во фронтальной коре, вентральной тегментальной области и прилежащем ядре с дальнейшей ее нормализацией к 7-му дню абстиненции. В гипоталамусе уровень мРНК грелинового рецептора в указанные сроки не нормализуется. В сыворотке крови в указанные сроки увеличивается концентрация дезацилгрелина, но не достигает нормальных значений.

4. Отдельные компоненты грелиновой системы мозга реагируют не одинаково (даже разнонаправлено) на отмену алкоголя. В эмоциогенных структурах, обеспечивающих подкрепляющие эффекты алкоголя (прилежащее ядро, вентральная тегментальная область) экспрессия мРНК грелинового рецептора, как правило, увеличивается, а в структурах, ответственных за регуляцию пищевого поведения и энергетического обмена (гипоталамус), напротив, снижается.

Степень достоверности и апробация материалов исследования

Степень достоверности определяется достаточным числом экспериментальных животных (490 взрослых и новорожденных крыс Вистар), рандомизацией и формированием групп сравнения и активного контроля, адекватными биохимическими, молекулярными, фармакологическими и токсикологическими методами исследования, длительными сроками наблюдения и корректными методами статистической обработки.

Реализация результатов работы

Материалы исследования используются в лекционном курсе кафедр фармакологии и нормальной физиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, кафедры фармакологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета МЗ РФ. Работа выполнена в соответствии с плановыми научно-исследовательскими разработками ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Материал диссертации вошел в грантовые разработки Российского фонда фундаментальных исследований РАН (РФФИ №10-04-00473а).

Апробация результатов. Материалы диссертации доложены на IV Съезде фармакологов России (Казань, 2012); VII Съезде физиологов Сибири (Красноярск, 2012); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); Всероссийской научной конференции «Фармакологическая протекция» (Санкт-Петербург, 2013), на заседаниях отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «ИЭМ» (2011-2015).

Работа рассмотрена и одобрена комитетом по этике ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Публикации. По теме диссертации опубликовано в 11 научных работ, включая 5 журнальных статей (из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ) и 6 тезисов.

Личный вклад автора осуществлялся на всех этапах работы и состоял в планировании экспериментов, их непосредственном выполнении, обработке полученных результатов, обсуждении результатов, написании статей и тезисов, написании диссертации и автореферата.

Объем и структура диссертации. Диссертация оформлена и изложена в соответствии с ГОСТом РФ и состоит из введения, главы обзора литературы, материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа изложена на 131 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами. Библиографический указатель содержит 254 наименований, в том числе 10 отечественных и 244 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Экспериментальные животные. В работе использовали 490 крыс Вистар, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного света 8.00-20.00 при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Все опыты проведены в осенне-зимний период и в соответствии с приказом министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Процедура хронической алкоголизации. В 1-й серии опытов 18 самок крыс подвергали полунасиленной хронической алкоголизации 15%-ным раствором

этанола в качестве единственного источника жидкости при свободном доступе к брикетированному сухому корму, начиная с 1-го дня беременности до ее окончания (21-22-й день). Половину животных после рождения ими детенышей переводили на водный режим, вторую половину крыс продолжали алкоголизовать до 17-го дня постнатального развития крысят. Контролем служили 17 самок крыс, содержащихся на обычном водном режиме. Детеныши, рожденные от них, служили контролем крыс, матери которых были подвергнуты алкоголизации.

В экспериментах с хронической алкоголизацией 40 взрослых крыс подвергали полунасильственной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6-ти месяцев при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Контрольная группа из 10-ти крыс в качестве источника жидкости получала воду.

Взятие материала. Беременных крыс на 13-й и 17-й дни гестации декапитировали, извлекали плоды, у них выделяли мозг на холоду, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения анализа. Аналогично выделяли мозг у крысят в возрасте 4-х, 10-ти и 17-ти дней жизни. У крысят так же тотально собирали вытекшую кровь.

Крыс декапитировали через 6 месяцев после хронической алкоголизации и на 1-й и 7-й дни после отмены алкоголя. Мозг выделяли на холоду, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа. Также после декапитации тотально собирали вытекшую кровь, инкубировали в течение 30 мин при $+4^{\circ}\text{C}$ и далее центрифугировали при 3000 об/мин и температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин на центрифуге. Полученные образцы сыворотки крови замораживали и хранили при -80°C до проведения иммуноферментного анализа.

Молекулярно-генетические методы. Суммарную РНК выделяли с использованием гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформного метода экстракции (Hillary, 2000) или с использованием реагента TRIzol («Ambion», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб ДНКазой проводили

с использованием ДНКазы («Promega», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. После обработки ДНКазой концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре «Implen NanoPhotometer P330» («Implen», Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата. Для последующей работы пробы выравнивали по концентрации РНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием M-MuLV обратной транскриптазы («Promega», США). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием Taq-полимеразы («Медиген», Россия) и специфических праймеров (табл. 1).

Таблица 1

Структура праймеров и зондов, используемых для оценки уровня экспрессии генов рецепторов дофамина, КОМТ и бета-актина

Ген	Праймеры		Длина ампликона
	Прямой	Обратный	
Д1	5' CAGTCCATGCCAAGAATTGC 3'	5' AATCGATGCAGAATGGCTGG 3'	225
Д2	5' ACTGTGACACAAGGTTGAGC 3'	5' TACAGTCCTTGGAGATGGAG 3'	Д2L -404 Д2S -317
Д4	5' СТАТCAGGGTCCCCTCTTC 3'	5' GATCTTGGCGCCTCTCTTTC 3'	189
Д5	5' AGTCGTGGAGCSTATGAACC 3'	5' GCGTCGTTGGAGAGATTTGA 3'	517
КОМТ	5' TGCGCTACGTGCAGCAGA 3'	5' ACTGTCCCCTTGC GCAGC 3'	466
β -актин	5' GAAGATCCTGACCGAGCGTG 3'	5' AGCACTGTGTTGGCATAGAG 3'	327

Детекцию ДНК-продуктов после ОТ-ПЦР проводили в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Гели проявляли трансиллюминатором «UVT-1» («Биоком», Россия) при длине волны 312 нм и фотографировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей «DNA Analyser» («Лаборант», Россия), а оптическую плотность специфических бендов измеряли в программе ScanImage. Для статистической обработки плотность специфических бендов рецепторов ДА и КОМТ соотносили с плотностью бенда β -актина в качестве нормировочного гена.

Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили методом Taq-Man с использованием Taq-полимеразы («Медиген», Россия) и специфических праймеров (табл. 2).

Таблица 2

Структура праймеров и зондов для оценки уровня экспрессии генов рецептора грелина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Ген	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность
Рецептор грелина	прямой	5'-CCTGGTGTCSSTTTGTCSTCTCTAC-3'
	обратный	5'-GTTCTGCCTCCTCCCAAGTCCC-3'
	зонд	JOE 5'-CTCCGCCATCGCTCATTGCTCTACACCC-3' BHQ-1
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	прямой	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
	обратный	5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'
	зонд	FAM 5'-ATCACGCCACAGCTTTCCAGAGGG-3' BHQ-1

Расчет относительной экспрессии грелинового рецептора проводили по методу дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$), используя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу в качестве нормировочного гена. Относительный уровень экспрессии гена грелинового рецептора рассчитывали по индуктивной формуле $R = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Определение ДА и ДОФУК проводили методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией (Krasnova et al., 2000) на хроматографической системе «Beckman» и электрохимического детектора LC-4B «BAS» с использованием аналитической колонки «Zorbax C18» («Agilent Technologies», США).

Иммунологические методы. Концентрации дезацилгрелина в образцах сывороток крови определяли путем твердофазного иммуноферментного анализа с использованием готовой тест-системы «Rat unacylated ghrelin enzyme immunoassay kit» («SPI-BIO», Франция) в полном соответствии с инструкцией производителя.

Статистические методы анализа. Выборка для каждой группы животных составила не менее 10-12 крыс. Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ Graph Pad Prizm v.4; SPSS Sigma Stat 3,0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерии попарных сравнений групп Стьюдента-Ньюмена-Кейлса и Данна, критерий Краскела – Уоллиса). Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова – Смирнова. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние алкоголизации матерей на дофаминовую систему мозга плодов в пренатальный и в ранний постнатальный периоды

Алкоголизация крыс в период беременности вызывает снижение активности ДА-ергической системы мозга. Отмечали снижение уровня ДА с $0,0187 \pm 0,0077$ нг/мг ткани мозга в контроле до $0,0131 \pm 0,0027$ нг/мг ткани у алкоголизованных плодов, а также мРНК фермента метаболизма катехоламинов КОМТ с $84,85 \pm 1,04$ у.е. в контроле до $80,65 \pm 1,05$ у.е. у алкоголизованных плодов ($p < 0,05$) в структурах переднего мозга на 17-й день пренатального развития (табл. 3). На 13-й день пренатального периода достоверных отличий в этих показателях не отмечали. В ответ на снижение активности пресинаптического отдела системы ДА отмечали развитие компенсаторной реакции со стороны рецепторного аппарата, что выражалось достоверным увеличением содержания мРНК длинного (с $58,23 \pm 0,26$ у.е. в контроле до $65,40 \pm 0,67$ у.е. у алкоголизованных плодов) и короткого (с $57,48 \pm 0,33$ у.е. в контроле до $64,48 \pm 0,65$ у.е. у алкоголизованных плодов) сплайс-вариантов дофаминового рецептора D2-типа. Как и в случае с содержанием ДА, на 13-й день пренатального периода достоверных отличий этих показателей у алкоголизованных и не алкоголизованных плодов не

наблюдали. Это, по-видимому, позволяет сохранять активность системы ДА мозга плода на физиологическом уровне.

В постнатальный период отмечали дальнейшее снижение активности системы ДА, в частности, уменьшение содержания ДОФУК и отношения ДОФУК/ДА в группе крысят, матери которых потребляли алкоголь во время беременности, но были переведены на потребление воды после рождения потомства (группа «отмена алкоголизации»), в сравнении с контрольной группой на 10-й день постнатального периода, и снижением содержания ДОФУК и отношения ДОФУК/ДА в группе продолжающихся алкоголизироваться крыс (группа «алкоголизация») на 17-й день постнатального периода.

Таблица 3

Влияние пре- и постнатальной алкогольной нагрузки на содержание ДА, ДОФУК и отношение ДОФУК/ДА в структурах переднего мозга крыс

	ДА, нг/мг ткани	ДОФУК, нг/мг ткани	ДОФУК/ДА
13-й день пренатального периода			
Контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Этанол	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
17-й день пренатального периода			
Контроль	0,0187±0,0077	0,0±0,0	0,0±0,0
Этанол	0,0131±0,0027*	0,0±0,0	0,0±0,0
4-й день постнатального периода			
Контроль	0,0945±0,0033	0,0067±0,0002	0,0711±0,0043
Этанол	0,0789±0,0105	0,0082±0,0017	0,1048±0,0197
Этанол/вода	0,0982±0,0075	0,0062±0,0008	0,0632±0,0041
10-й день постнатального периода			
Контроль	0,3243±0,0364	0,0332±0,0021	0,1071±0,0113
Этанол	0,2900±0,0331	0,0362±0,0016	0,1293±0,0131
Этанол/вода	0,2340±0,0152	0,0185±0,0025* [#]	0,0780±0,0073* [#]
17-й день постнатального периода			
Контроль	0,4378±0,0208	0,0302±0,0007	0,0698±0,0028
Этанол	0,3080±0,0932	0,0165±0,0054*	0,0527±0,0046*
Этанол/вода	0,4955±0,0205	0,0342±0,0027 [#]	0,0689±0,0052

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе, # $p < 0,05$ – к группе этанола.

Несмотря на снижение активности пресинаптического отдела ДА системы мозга в постнатальный период, компенсаторной реакции со стороны

рецепторного аппарата системы ДА на этих сроках не наблюдали. В тоже время прекращение приема алкоголя кормящими самками способствовало восстановлению уровня ДОФУК до нормальных значений на 17-й день постнатального развития, что свидетельствует о возможной нормализации активности системы ДА после прекращения алкоголизации.

Таблица 4

Влияния пре- и постнатальной алкогольной нагрузки на мРНК ДА рецепторов и катехол-О-метилтрансферазы в структурах переднего мозга крыс

Группы	мРНК Д1	мРНК Д2дл	мРНК Д2кор	мРНК Д4	мРНК Д5	мРНК КОМТ
13-й день пренатального периода						
Контроль	14,25±0,10	65,28±0,36	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	82,60±0,33
Этанол	14,50±0,20	65,23±0,24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	82,88±0,27
17-й день пренатального периода						
Контроль	24,48±0,13	58,23±0,26	57,48±0,33	0,0±0,0	0,0±0,0	84,85±1,04
Этанол	24,65±0,23	65,40±0,67 *	64,48±0,65 *	0,0±0,0	0,0±0,0	80,65±1,05*
4-й день постнатального периода						
Контроль	42,08±0,13	75,52±0,29	59,88±0,29	81,15±0,28	98,73±0,84	97,20±0,16
Этанол	44,18±0,95	75,08±0,52	59,55±0,36	80,43±0,37	98,23±0,60	96,08±0,55
Этанол/ вода	44,33±1,01	75,83±0,40	60,28±0,34	81,95±1,24	99,15±0,18	97,63±0,92
10-й день постнатального периода						
Контроль	53,55±2,15	110,8±0,83	73,93±0,91	84,05±0,52	109,4±0,47	107,6±1,65
Этанол	52,88±2,31	111,2±1,06	74,10±1,14	85,35±0,43	110,2±1,21	108,0±1,74
Этанол/ вода	53,43±1,37	111,1±1,41	74,28±1,68	85,00±1,08	108,2±0,99	107,8±1,39
17-й день постнатального периода						
Контроль	53,75±2,23	125,2±0,97	83,53±0,69	89,25±1,11	109,2±1,91	103,7±2,66
Этанол	50,80±3,63	124,8±1,05	83,83±0,70	87,98±0,91	107,1±1,64	89,25±0,78*
Этанол/ вода	48,68±1,75	125,9±1,09	83,98±0,98	88,70±0,59	107,3±1,84	104,2±2,80

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе. Данные нормализованы по отношению к β -актину и выражены в условных единицах.

Влияние алкоголизации матерей крыс на формирование грелиновой системы в пренатальный и ранний постнатальный периоды

Онтогенез грелиновой системы изучен недостаточно, а влияние алкоголя на ее развитие вообще не освещено в литературе. У грызунов грелин и мРНК рецептора грелина обнаруживаются в эмбрионах уже на стадии морулы и продолжают быть выраженными в процессе внутриутробного развития (Kawamura et al., 2003). У крыс высокий уровень экспрессии мРНК грелина обнаруживается на 12-й день гестации, а на 17-й день плод содержит уже значительные уровни ацилированного и деацилированного грелина в крови (Torsello et al., 2003; Nakahara et al., 2006).

В пренатальный период концентрацию дезацилгрелина определить не удалось в связи с недостаточным количеством крови у плодов для постановки пробы. В наших экспериментах показано, что в раннем постнатальном развитии в физиологических условиях отмечается рост концентрации сывороточного дезацилгрелина (табл. 7).

Таблица 7

Влияние алкоголизации матерей на содержание дезацилгрелина в сыворотке крови рожденных от них крысят в ранний постнатальный период (нг/мл)

	4-й день жизни	10-й день жизни	17-й день жизни
Контроль (потребляли воду)	5,49±0,09	5,77±0,33	9,50±2,29
Алкоголизация во время беременности и кормления	5,41±0,06	5,41±0,06	5,36±0,05*
Отмена алкоголя после рождения детенышей	5,44±0,04	5,50±0,13	5,69±0,19*

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Так, на 4-й день после рождения в контрольной группе содержание дезацилгрелина в сыворотке составляет 5,49±0,09 нг/мл и на 17-й день достигает 9,50±2,29 нг/мл. В группе плодов крыс, рожденных от матерей, употребляющих алкоголь на 17-й день после рождения выявлялось достоверное снижение уровня сывороточного грелина по сравнению с контролем соответственно до 5,36±0,05

нг/мг при алкоголизации во время беременности и кормления и $5,69 \pm 0,19$ нг/мг при отмене алкоголя после рождения детенышей.

Таблица 8

Влияние алкоголизации крыс в период беременности на экспрессию мРНК рецептора грелина в структурах переднего мозга крысят в пренатальный и ранний постнатальный периоды (у.е.)

Пренатальный период			
	13-й день	17-й день	
Контроль (потребляли воду)	$1,03 \pm 0,09$	$0,99 \pm 0,09$	
Алкоголизация во время беременности	$1,32 \pm 0,20$	$1,12 \pm 0,19$	
Постнатальный период			
	4-й день жизни	10-й день жизни	17-й день жизни
Контроль (потребляли воду)	$1,18 \pm 0,22$	$1,01 \pm 0,09$	$1,32 \pm 0,10$
Алкоголизация во время беременности и кормления	$1,14 \pm 0,09$	$1,36 \pm 0,19$	$1,97 \pm 0,25^*$
Отмена алкоголя после рождения детенышей	$1,32 \pm 0,40$	$1,18 \pm 0,22$	$2,16 \pm 0,32^*$

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе.

Алкоголизация матерей приводит к снижению уровня дезацилгрелина в сыворотке крови в ранний постнатальный период у плодов. Однако экспрессия мРНК грелина в мозге компенсаторно увеличивается только на 17-й день после рождения (табл. 8). Это свидетельствует о нарушении формирования грелиновой системы и ее дисрегуляции. Видно, что в группе плодов, матери которых продолжали потреблять алкоголь после рождения детенышей, изменения были сильнее, чем в группе плодов, матери которых перешли на потребление воды после рождения детенышей (хотя и не достоверно).

Таким образом, в раннем постнатальном периоде при алкоголизации происходит дисрегуляция формирования грелиновой системы, что

характеризуется снижением уровня грелина сыворотки и увеличением экспрессии мРНК рецептора в структурах мозга.

Влияние длительной алкоголизации и отмены алкоголя на грелиновую систему у взрослых крыс

Грелиновая система принимает участие в ряде физиологических функций, в частности, в регуляции пищевого поведения и веса тела, перистальтики желудка и кишечника, эндокринной функции (стимуляция секреции гормона роста), регуляции метаболизма липидов и глюкозы, а так же вовлечена в формирование лекарственной, наркотической и алкогольной зависимости (Lall et al., 2001). В состав грелиновой системы включают три пептида (грелин, дезацилгрелин и обестатин), биосинтез которых контролируется одним геном. Кроме того, к сигнальной системе грелинов относят грелиновые рецепторы.

В настоящей работе изучали влияние алкоголизации в течение 6 мес и отмены алкоголя на уровень экспрессии грелинового рецептора в структурах мозга взрослых крыс.

Таблица 5

Влияние алкоголизации и отмены алкоголя на уровень экспрессии грелинового рецептора в структурах мозга взрослых крыс (у.е.)

	Интактные	Алкоголизация 6 мес	1-й день абстиненции	7-й день абстиненции
Фронтальная кора	1,33±0,45	1,53±0,59	5,80±1,05* [#] ^	1,98±0,59
Прилежащее ядро	1,01±0,09	1,36±0,19	1,22±0,28	1,97±0,25*
Гипоталамус	1,32±0,40	1,99±0,23	1,53±0,25	0,64±0,33 [#]
Миндалина	1,02±0,09	0,76±0,10	0,87±0,18	0,70±0,13
Гиппокамп	1,01±0,09	1,18±0,22	1,37±0,30	1,37±0,18
Вентральная теgmentальная область	1,18±0,219	1,42±0,39	2,16±0,62	3,42±0,59* [#]

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; [#] $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизированных крыс; ^ $p < 0,05$ по отношению к группе животных с отменой алкоголя в течение 7-ми дней.

Через сутки после отмены алкоголя отмечали увеличение экспрессии мРНК во фронтальной коре, как по отношению к интактным, так и алкоголизированным животным. К 7-му дню абстиненции уровень мРНК грелинового рецептора во фронтальной коре нормализовался, однако было отмечено его увеличение в вентральной тегментальной области и прилежащем ядре. Эти структуры мозга тесно связаны с дофаминергической нейротрансмиссией и формированием психического компонента алкогольной зависимости. Показано, что введение грелина в вентральную тегментальную область увеличивает выделения дофамина в прилежащем ядре и локомоторную активность у крыс (Jerlhag et al., 2006, 2007). Таким образом, увеличение уровня экспрессии мРНК грелинового рецептора в первые сутки после отмены алкоголя во фронтальной коре и на 7-е сутки в вентральной тегментальной области и прилежащем ядре может быть направлено на активацию ДА-ергических механизмов и свидетельствовать о поддержании поискового поведения у животных направленного на возобновления потребления алкоголя. В тоже время уровень мРНК грелинового рецептора в гипоталамусе был достоверно снижен в сравнение с ее экспрессией у хронически алкоголизированных животных. Это возможно связано с нормализацией уровня грелина в крови после отмены алкоголя и развитием компенсационных процессов в грелиновой системе (Leggio, 2009).

Таблица 6

Влияние хронической алкоголизации и отмены алкоголя на содержание дезацилгрелина в сыворотке крови взрослых крыс (нг/мл)

Интактные	Алкоголизация	1-й день абстиненции	7-й день абстиненции
0,956±0,108	0,476±0,0734*	0,552±0,0695* ^{#^}	0,669±0,0777* [#]

Примечание. * $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; [#] $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизированных крыс; [^] $p < 0,05$ по отношению к группе животных с отменой алкоголя в течение 7-ми дней.

Интересно отметить, что отдельные компоненты грелиновой системы мозга реагируют разнонаправлено на отмену алкоголя. Экспрессия мРНК грелинового

рецептора увеличивается в прилежащем ядре и вентральной тегментальной области, ответственной за подкрепляющие эффекты алкоголя и снижается в гипоталамусе, ответственном за регуляцию пищевого поведения и энергетического обмена. Полученные данные указывают на сложность организации грелиновой системы в мозге и ее важную роль в регуляции различных функций организма.

Параллельно с определением экспрессии мРНК грелинового рецептора измеряли содержание дезацилгрелина сыворотки крови после хронической алкоголизации крыс. В табл. 6 показано значимое снижение концентрации пептида в сыворотке крови и последующий его рост в ходе отмены алкоголя (тенденция к восстановлению нормальных значений).

Таким образом, грелин и его рецептор могут участвовать в регуляции потребления этанола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе представлены результаты экспериментальных исследований, доказывающие, что пренатальное действие алкоголя негативно влияет на созревание ГА-ергической и грелиновой систем мозга, а так же вовлечение грелиновой системы в механизмы алкогольной зависимости. Наблюдается угнетение ГА-ергической системы (уменьшение содержания ГА и ДОФУК, снижение экспрессии мРНК КОМТ, но увеличение экспрессии Д2 длинной и короткой изоформ ГА-рецепторов) и дисбаланс грелиновой системы. Алкоголизация матерей приводит к снижению уровня дезацилгрелина в сыворотке в ранний постнатальный период у плодов, однако экспрессия мРНК рецептора грелина в мозге компенсаторно увеличивается. Хроническая алкоголизация взрослых крыс также влияет на грелиновую систему. В процессе алкоголизации происходит уменьшение содержания дезацилгрелина в сыворотке крови с компенсаторным увеличением экспрессии грелинового рецептора в мозге. В условиях отмены алкоголя наблюдается увеличение содержания дезацилгрелина (тенденция к нормализации).

ВЫВОДЫ

1. Алкоголизация крыс в период беременности вызывает снижение активности ДА-ергической системы мозга, что проявляется снижением уровня дофамина, а также мРНК КОМТ в структурах переднего мозга на 17-й день пренатального развития у алкоголизированных плодов. В ответ на снижение активности пресинаптического отдела системы дофамина развивается компенсаторная реакция со стороны рецепторного аппарата, что выражается увеличением содержания мРНК длинного и короткого сплайс-вариантов дофаминового рецептора D₂-типа.

2. В постнатальный период отмечается дальнейшее снижение активности системы дофамина, в частности, уменьшение содержания ДОФУК и отношения ДОФУК/ДА в группе крысят, матери которых потребляли алкоголь во время беременности, но были переведены на потребление воды после рождения потомства. В группе продолжающихся алкоголизироваться крыс содержание ДОФУК и отношение ДОФУК/ДА было еще более сниженным.

3. Степень выраженности изменений системы дофамина на разных сроках постнатального развития была различной. Максимальное угнетение активности системы дофамина регистрировали в более поздние сроки, в частности, на 10-й день постнатального периода.

4. Нормализацию функционирования дофаминергической системы мозга (по показателям содержания ДОФУК и мРНК фермента катаболизма катехоламинов КОМТ в структурах переднего мозга) в случае отмены алкоголя в постнатальном периоде отмечали в сроки не ранее 17-го дня постнатального развития.

5. Алкоголизация крыс в период беременности снижает уровень дезацилгрелина в сыворотке в ранний постнатальный период у плодов. При этом экспрессия мРНК рецептора грелина в головном мозге компенсаторно увеличивается.

6. Длительная полунасильственная алкоголизация взрослых крыс в течение 6-ти мес существенно не влияла на уровень экспрессии мРНК грелинового

рецептора в большинстве эмоциогенных структур мозга, за исключением прилежащего ядра и гипоталамуса, где отмечали умеренное увеличение экспрессии мРНК грелинового рецептора, которое можно рассматривать как развитие компенсаторных процессов в этих структурах мозга в ответ на снижение содержания дезацилгрелина в сыворотке крови при хронической алкоголизации.

7. У хронически алкоголизированных крыс через сутки после отмены алкоголя увеличивается экспрессия мРНК грелинового рецептора во фронтальной коре, вентральной тегментальной области и прилежащем ядре с нормализацией к 7-му дню абстиненции только во фронтальной коре. В гипоталамусе экспрессия мРНК грелинового рецептора остается сниженной несмотря на отмену этанола.

8. Отдельные компоненты грелиновой системы мозга реагируют разнонаправлено на отмену алкоголя после его хронического потребления в течение 6-ти месяцев. Экспрессия мРНК грелинового рецептора, как правило, увеличивается в структурах, ответственных за подкрепляющие эффекты алкоголя (прилежащее ядро и вентральная тегментальная область) и снижается в структурах, ответственных за регуляцию пищевого поведения и энергетического обмена (гипоталамус).

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные расширяют существующие представления о механизмах алкогольной зависимости, в частности во взаимодействии дофаминовой и грелиновой систем, что может быть использовано в соответствующих учебных программах.

2. Участие грелиновой системы в механизмах алкогольной зависимости открывает возможность создания антагонистов рецепторов грелина или иных антигрелиновых агентов для коррекции (подавления) алкогольной мотивации либо уменьшения подкрепляющих свойств наркогенов, включая этанол.

3. В качестве дополнительного биохимического маркера зависимости от алкоголя возможно использование тестов на экспрессию мРНК рецептора грелина и концентрацию дезацилгрелина в сыворотке крови, что повышает доказательность лабораторных наркологических исследований.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Шабанов, П.Д. Потребление алкоголя во время беременности изменяет активность рецепторов дофамина и обмен моноаминов в мозге плодов и новорожденных крысят / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, **М.И. Айрапетов** // Наркология. – 2011. – №8 (116). – С.51-56.

2. **Айрапетов, М.И.** Влияние хронической алкоголизации и отмены этанола на уровень экспрессии мРНК грелинового рецептора в мозге крыс / **М.И. Айрапетов**, Э.А. Сексте, П.П. Хохлов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, Р.О. Роик, П.Д. Шабанов // Наркология. – 2013. – №9 (141). – С.61-65.

3. Хохлов, П.П. Динамика содержания нейроактивных пептидов в периферической крови у крыс при экспериментальной хронической алкоголизации (на модели грелин — орексин — кортиколиберин) / П.П. Хохлов, Е.Р. Бычков, Э.А. Сексте, **М.И. Айрапетов**, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2013. – Т.11. Спецвып. – С.146-148.

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации:

1. Бычков, Е.Р. Влияние внутриутробного действия этанола на формирование моноаминергических систем в развивающемся мозге крыс / Е.Р. Бычков, **М.И. Айрапетов**, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // Мед. акад. журн. – 2011. – Т.11. Спецвып. – С.14.

2. Бычков, Е.Р. Внутриутробное действие этанола на созревание моноаминергических систем в развивающемся мозге крыс / Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, **М.И. Айрапетов**, Р.О. Роик, П.Д. Шабанов // Мед. акад. журн. – 2012. – Т.12. №2. – С.77-83.

3. Бычков, Е.Р. Внутриутробное действие этанола на созревание моноаминергических систем мозга крыс в пре- и раннем постнатальном периоде онтогенеза / Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, **М.И. Айрапетов**, Э.А. Сексте, П.Д. Шабанов // Матер. IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». Казань. – 2012. – С. 31.

4. Шабанов, П.Д. Влияние этанола на созревание моноаминергических систем в мозге крысят в период беременности и кормления / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, **М.И. Айрапетов**, Э.А. Сексте // VII Съезд физиологов Сибири. Матер. Съезда под ред. Л.И. Афтанаса, В.А. Труфакина, В.Т. Манчука, И.П. Артюхова. Красноярск, 2012. – С.596-597.

5. **Айрапетов, М.И.** Хроническая алкоголизация и уровень экспрессии мРНК грелинового рецептора в мозге крыс / **М.И. Айрапетов**, Э.А. Сексте, Е.Р. Бычков, П.П. Хохлов, А.А. Лебедев, Р.О. Роик, А.А. Байрамов, П.Д. Шабанов // Бюл. ФЦСКЭ им. В.А.Алмазова. – 2013. – №3 (20). – С.85-90.

6. **Айрапетов, М.И.** Отмена алкоголя у хронически алкоголизированных крыс увеличивает экспрессию мРНК грелинового рецептора в структурах мозга, отвечающих за положительное подкрепление / **М.И. Айрапетов**, Э.А. Сексте, П.П. Хохлов, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2013. – Т.11, Спецвып. – С.9.

7. Shabanov, P.D. Monoaminergic systems mature in rat offspring brain in pre- and early postnatal period after maternal alcoholisation / P.D. Shabanov, E.R. Bychkov, **M.I. Airapetov**, E.A. Sekste, R.O. Roik, A.A. Lebedev // Eur. Neuropsychopharmacology. – 2013. – Vol. 23, Suppl. 2. – P. S245.

8. Shabanov, P.D. Serum unacylated ghrelin concentrations and expression of GHSR mRNA in the rat brain structures after chronic alcoholization and ethanol withdrawal / P.D. Shabanov, **M.I. Airapetov**, E.A. Sekste, P.P. Khokhlov, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov, P.M. Vinogradov, R.O. Roik, V.P. Pavlenko // Eur. Neuropsychopharmacology. – 2014. – Vol.14. Suppl.2. – P. S653.