

На правах рукописи



Анохин Петр Константинович

**Экспрессия генов дофаминовой системы мозга при
экспериментальном алкоголизме и пути ее регуляции агонистом
дофаминовых D2-рецепторов**

03.03.01 – физиология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ФГБНУ ИФАВ РАН)

Научные руководители:

Наталья Николаевна Нинкина - доктор медицинских наук, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Вячеслав Альбертович Дубынин - доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Рита Ушеровна Островская - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»

Александр Зосимович Дроздов - доктор медицинских наук, профессор, заведующий клинико-биохимической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского»

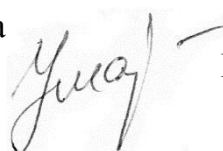
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»)

Защита состоится «27» марта 2017 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.93 при биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д.27) и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «.....»2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Алкогольная зависимость, приводящая к потере трудоспособности, инвалидизации, ранней смертности представляет важную медицинскую и социальную проблему. Несмотря на разнообразные подходы, эффективность лечения этого заболевания на сегодняшний день остается невысокой (Agabio et al., 2016; Sinclair et al., 2016). В связи с этим актуальным является поиск новых фармакологических мишеней для разработки методов патогенетической терапии алкогольной зависимости.

Общепризнана ведущая роль дофаминовой системы мозга в механизмах формирования алкогольной зависимости (Анохина с соавт., 1988; Koob, 2014; Nutt, 2015 и др.). Однако остается целый ряд нерешенных вопросов, не позволяющих понять, какие конкретные механизмы лежат в основе постулируемого «функционального дефицита дофаминовой мезолимбической системы мозга», определяющего высокий уровень потребления алкоголя. Имеющиеся на сегодняшний день данные противоречивы и недостаточны для анализа вызванных алкоголем долговременных нарушений на уровне пре- и постсинаптического звеньев мезолимбической системы, имеющих принципиально различное функциональное значение. Настоящее исследование направлено на 1) выяснение изменений на уровне экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой системы в вентральных областях среднего мозга и его области-мишени - вентральном стриатуме в экспериментальной модели алкогольной зависимости и 2) разработку новых нестандартных лекарственных средств терапии, основанных на активации центральных дофаминовых D2-рецепторов. В основе предположения о потенциальной эффективности этого класса фармакологических соединений для лечения алкогольной зависимости лежат: 1) накопленные в последнее время сведения о нарушении функций мезолимбической дофаминовой системы мозга, как ключевом факторе высокого риска потребления алкоголя (Анохина, 1988, Engel et al., 2014; Ford, 2014; Анохина, 2016) и 2) оригинальная гипотеза о возможности использования в терапии алкогольной зависимости агонистов дофаминовых рецепторов, применяемых в настоящее время в клинической практике при других дофамин-дефицитных состояниях, а именно, болезни Паркинсона и гиперпролактинемии.

Цель исследования:

Целью данного исследования является анализ изменений уровня мРНК ключевых белков дофаминовой мезолимбической системы мозга у хронически алкоголизированных животных с различным уровнем предпочтения алкоголя и выяснение возможности использования агонистов дофаминовых D2-рецепторов для снижения потребления алкоголя и коррекции нарушений на уровне регуляции транскрипции генов дофаминовой системы.

Задачи исследования:

- 1) Изучить изменения экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой системы – тирозингидроксилазы (TH), дофамин-транспортного белка (DAT), дофаминовых D1 и D2-рецепторов, синаптического белка α -синуклеина и везикулярных белков SNARE-комплекса Snap25 и синаптобревина (Vamp2) в вентральных областях среднего мозга и вентральных областях стриатума у хронически алкоголизированных животных с различным уровнем потребления алкоголя.
- 2) Изучить эффект агониста дофаминовых D2-рецепторов каберголина на потребление алкоголя в экспериментальной модели алкогольной зависимости.
- 3) Изучить возможные механизмы действия каберголина:
 - а) оценить влияние каберголина на поведение животных: исследовательскую активность, суточные ритмы двигательной активности, тревожность;
 - б) использовать экспериментальные модели для проверки потенциальной возможности собственного «подкрепляющего» эффекта каберголина;
 - в) исследовать влияние каберголина на уровень мРНК постсинаптических дофаминовых D1- и D2-рецепторов в вентральном стриатуме и D2-ауторецепторов в среднем мозге хронически алкоголизированных животных;
 - г) выяснить, каким образом длительное применение каберголина влияет на уровень экспрессии генов, кодирующих тирозингидроксилазу, дофамин-транспортный белок, белки везикулярного транспорта - Snap25, Vamp2, синаптический белок α -синуклеин, нейротрофический фактор мозга (BDNF) в вентральных областях среднего мозга.

Научная новизна работы. Впервые проведен сравнительный анализ изменений дофаминовых рецепторов D1- и D2-подтипов на уровне экспрессии кодирующих их генов в области локализации тел дофаминовых нейронов (средний мозг) и ключевой

области – мишени (вентральный стриатум) у хронически алкоголизированных животных с различным уровнем потребления алкоголя. Этот подход позволил впервые дифференцировать вызванные алкоголем изменения уровня мРНК пре- и постсинаптических дофаминовых D2-рецепторов, имеющих принципиально различное функциональное значение. В работе впервые исследовано влияние длительного потребления алкоголя на уровни мРНК ключевых белков синтеза (тирозингидроксилаза), обратного захвата дофамина (дофамин-транспортный белок) и везикулярных белков SNARE-комплекса в среднем мозге. Получены новые данные о подавлении экспрессии мРНК α -синуклеина в среднем мозге крыс с высоким уровнем потребления алкоголя, что представляется первым доказательством возможной роли этого синаптического белка в регуляции долговременных адаптивных изменений дофаминовой нейротрансмиссии при действии алкоголя. В работе было впервые установлено достоверное снижение уровня мРНК постсинаптических D1 и D2 – рецепторов вентрального стриатума, что послужило основанием для исследования селективного агониста D2 дофаминовых рецепторов каберголина в качестве потенциального лекарственного средства для снижения потребления алкоголя. В работе впервые проведен анализ влияния каберголина на поведение и экспрессию генов дофаминовой системы у интактных и хронически алкоголизированных животных. Показано, что каберголин при системном введении вызывает стабильное снижение потребления алкоголя на фоне повышения уровня экспрессии гена D2-рецептора в среднем мозге и стриатуме, а также генов, кодирующих белки SNARE-комплекса и BDNF в среднем мозге хронически алкоголизированных животных. Настоящее исследование позволяет по-новому взглянуть на возможную сферу применения каберголина и рассматривать его в качестве перспективного препарата для снижения потребления алкоголя. Полученные новые данные позволили расширить знания о возможных механизмах изменений в структурах мезолимбической системы мозга на уровне регуляции транскрипции генов и предложить D2-рецепторы в качестве мишени для направленной терапии алкогольной зависимости.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенный анализ экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой системы у хронически алкоголизированных животных позволил получить новые знания, необходимые для понимания патогенетических основ формирования алкогольной зависимости. В работе

предлагается оригинальная идея использования новых лекарственных средств терапии алкогольной зависимости, основанных на активации дофаминовых D2-рецепторов мозга. Так как алкогольная зависимость является длительным рецидивирующим заболеванием, стратегия разработки подходов к лечению должна быть направлена на поиск препаратов, способных долговременно модулировать функции нейромедиаторных систем мозга. Поэтому важным практическим результатом исследования является установление возможности фармакологической регуляции уровня мРНК D2-рецепторов мезолимбической системы мозга. Агонисты дофаминовых рецепторов, в частности, исследуемый в работе каберголин, применяются в клинической практике для лечения болезни Паркинсона и гиперпролактинемии. Полученные в работе результаты являются первым доказательством эффекта каберголина на функции дофаминовой системы на уровне регуляции экспрессии генов, что служит основанием для дальнейших исследований этого класса препаратов как новых перспективных средств лечения болезней зависимости.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие на всех этапах работы: планировании экспериментов, разработке экспериментальной модели, проведении поведенческих и молекулярно-генетических экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании и оформлении статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 1-й Национальной конференции с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике» (Москва, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Междисциплинарный подход к психическим расстройствам и их лечению: миф или реальность?» (Санкт-Петербург, 2014); 12-ой Всероссийской школе молодых психиатров "Суздаль-2015" (Суздаль, 2015); 7-ом Международном Конгрессе по психофармакологии (7th International Congress on Psychopharmacology and the 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology (Turkey, 2015); 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Клязьма, 2015); Российской конференции с международным участием «Биомаркеры в психиатрии: поиск и перспективы» (Томск, 2016); 6-й Конференции молодых ученых ИФАВ РАН

(Черноголовка, 2016); 10-ом Европейском форуме по нейронаукам (10th FENS Forum in Neuroscience, Copenhagen, Denmark, 2016); 29-ом Конгрессе Европейского Колледжа по нейропсихофармакологии (29th ECNP Congress, Vienna, Austria, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в периодических изданиях, соответствующих Перечню ВАК и 7 сообщений в сборниках докладов научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 114 страницах, иллюстрирована 23 рисунками и 3 таблицами. Список цитируемой литературы включает 277 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились на крысах - самцах Wistar (питомник лабораторных животных «Столбовая») в соответствии с требованиями этического комитета ИФАВ РАН. Животных содержали в условиях естественной освещенности при температуре $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и свободном доступе к пище и воде. Общее количество животных, использованных в экспериментах – 138.

Вещества и способы введения. В работе использовали каберголин (Tocris bioscience). Препарат растворяли в смеси дистиллированной воды и этанола (3,3%) в соответствии с рекомендациями производителя и вводили внутривентрикулярно. Налоксон (Sigma Aldrich) растворяли в воде и вводили подкожно. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Экспериментальное моделирование алкогольной зависимости. В исследовании использовали экспериментальную модель «свободный выбор» (Green and Grahame, 2008). В возрасте 60 дней (PND 60) животные были помещены в индивидуальные клетки (460x300x160мм) с двумя поилками, содержащими 10% раствор этанола и воду. Потребление этанола и воды измеряли ежедневно путем взвешивания поилок и расчета уровня потребления в граммах на килограмм (г/кг) массы животного. В возрасте 120 дней животных декапитировали. Выделенные структуры мозга хранили при -70°C . Отбор животных проводили по следующей схеме: после периода адаптации к условиям

вивария 40 крыс-самцов на протяжении трех месяцев получали 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости, после чего они были помещены в индивидуальные клетки и протестированы в течение 14 дней с использованием модели «свободный выбор» (10% раствор этанола/вода). На основании полученных результатов были отобраны животные с высоким уровнем потребления алкоголя (более 6 г/кг/сутки) и сформированы две экспериментальные группы, получавшие в дальнейшем в течение 24-х дней каберголин (0,5 мг/кг один раз в сутки, n=9) или растворитель (n=8). При этом животные находились в индивидуальных клетках в условиях свободного выбора между водой и 10% раствором этанола при ежедневном контроле массы тела и регистрации суточного потребления этанола и воды. Для оценки эффекта каберголина на уровне мРНК в мозге не алкоголизованных (интактных) животных были использованы крысы соответствующего возраста, получавшие в течение 24 дней внутрибрюшинные инъекции каберголина (0,5 мг/кг/сутки, n=10) или растворителя (n=9). Через 24 часа после последней инъекции каберголина животных всех групп декапитировали и выделили структуры мозга для дальнейшего изучения уровня мРНК.

Методы изучения поведения. Для изучения *двигательной активности* в домашних клетках, а также *суточных ритмов двигательной активности* использовали установку «Activiscop», Россия. Клетка располагается на стенде, оснащенном датчиками движения и освещенности. Регистрация активности осуществлялась 24 часа в сутки автоматически. «Темная/светлая камера»: для оценки *двигательной активности и уровня тревожности в новой обстановке* была использована камера, состоящая из стартового отсека, имеющего выходы в отсеки с различным цветом стен и пола, освещенностью (светлый - темный) и тактильно отличающимися материалами пола (TSE, Германия). Тест основан на конфликтной ситуации между стремлением грызунов обследовать новую среду и аверсии по отношению к ярко освещенному пространству и широко применяется для исследования анксиолитических/анксиогенных свойств препаратов (Bourin and Hascoët, 2003). Тест «предпочтение места» для определения возможного «подкрепляющего эффекта» каберголина проводили по стандартному протоколу (Bardo and Bevins, 2000) с использованием установки «темная/светлая камера» (TSE, Германия). Схема эксперимента представлена в разделе «Результаты и обсуждение». Для экспериментального моделирования «*синдрома отмены*» использовали однократную инъекцию налоксона (3 мг/кг, подкожно) с

последующей визуальной оценкой признаков «синдрома отмены» (корчи, судороги, скрежет зубами, отряхивания «мокрой собаки», прыжки, птоз, диарея) и автоматическим мониторингом двигательной активности животных (Activiscop).

Структуры мозга, выбранные для изучения экспрессии мРНК. Для изучения экспрессии мРНК животных декапитировали и выделяли следующие структуры мезолимбической дофаминовой системы мозга: вентральный стриатум (Рис.1А) и вентральную область среднего мозга (Рис.1Б).

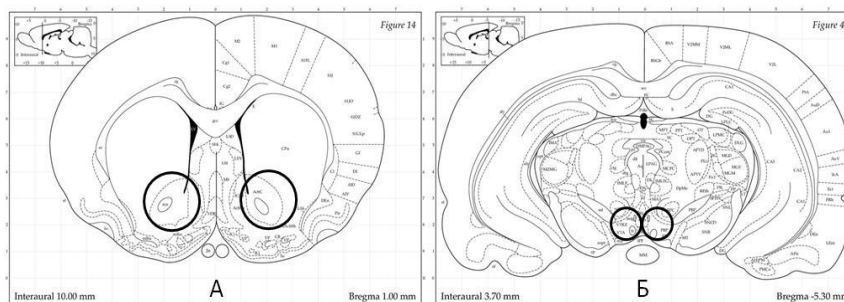


Рис 1. Структуры мозга, выбранные для изучения экспрессии мРНК
А - вентральный стриатум, Б - вентральная область среднего мозга (*Paxinos & Watson, 1986*).

Анализ экспрессии мРНК в мозге. Относительный уровень транскриптов изучаемых генов анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). Для выделения тотальной РНК из мозга животных использовали набор «RNeasy Lipid Tissue Mini Kit» (QIAGEN). Количество выделенной РНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf Bio Photometer, Германия). 1 мкг тотальной РНК использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза кДНК («RevertAid™ First Strand cDNA SynthesisKit», Fermentas). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ7W5 (BioRad, Германия). Для нормализации данных в качестве референсного был выбран ген β -актина. При проведении ПЦР в реальном времени использовались опубликованные последовательности олигонуклеотидных праймеров (ДНК-синтез, Россия). Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ и 5 мкл 5х реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия). Программа для амплификации включала: 95°C – 3 мин; 50 циклов: 95°C, 15 сек, 60°C, 15 сек, 72°C,

30 сек с последующим анализом кривых плавления полученных ПЦР-продуктов. Измерения проводили не менее чем в 3 параллельных образцах для каждого опыта и сравнивали между собой показания, полученные не менее чем для 8 животных. Для наблюдения за ходом реакции и регистрации данных использовали компьютерную программу «Opticon Monitor 3.1». Для сравнения уровней экспрессии интересующих генов в опыте и контроле использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Контроль целостности выделенной РНК и специфичности полученного в результате ОТ-ПЦР продукта осуществляли при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. Для визуализации результатов использовали трансиллюминатор (UVC Inc., USA) и систему гель-документирования (Gel Imager-2, Helicon, Россия).

Статистическая обработка данных. Статистические расчеты производили с помощью программного пакета Statistica 6 («Statsoft», США). Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены в виде значений среднего±ошибка среднего. Для проверки достоверности различий в потреблении этанола был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений с последующим апостериорным (post-hoc) анализом. Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Экспериментальное моделирование аддиктивного поведения крыс в условиях «свободного выбора» между раствором этанола и водой

По результатам тестирования с 60-го по 120 дни жизни в условиях «свободного выбора» между двумя поилками, содержащими 10% раствор этанола и воду, были выделены 3 группы животных с различной динамикой потребления этанола во времени и различными финальными объемами среднесуточного потребления этанола (Табл.1). Животные группы А на всем протяжении эксперимента имели постоянно низкий уровень потребления и предпочтения алкоголя. Животные группы В отличались низким уровнем потребления в начале эксперимента с последующим ростом показателей. Животные группы С имели изначально высокий уровень потребления алкоголя, сохраняя его в течение всего эксперимента (Табл.1). Увеличение показателей

среднесуточного потребления и предпочтения этанола у животных при его длительном употреблении в условиях «свободного выбора» принято рассматривать в качестве доказательства формирования алкогольной мотивации (Green and Grahame, 2008; Gilpin and Koob, 2008).

Таблица 1. Показатели потребления и предпочтения алкоголя крысами в экспериментальной модели «свободный выбор»

Группа	первая неделя тестирования (PND 60-67)		последняя неделя тестирования (PND 113-120)	
	потребление алкоголя (г/кг/сутки)	предпочтение алкоголя (%)	потребление алкоголя (г/кг/сутки)	предпочтение алкоголя (%)
A (n=13)	3,0±0,6	19,0±2,0	3,6±0,45	21,0±3,0
B (n=11)	3,2±0,17	23,4±4,0	7,2±0,94*	37,0±2,0*
C (n=10)	8,2±0,79*#	63,0±5,0*#	10,4±0,79*#	70,0±6,0*#

Предпочтение алкоголя рассчитывалось как соотношение массы потребляемого 10% раствора алкоголя к общей массе потребляемой жидкости * - $p < 0,05$ по отношению к животным группы А; # - $p < 0,05$ по отношению к животным групп А и В.

Задачей следующего этапа работы было выяснение различий между исследуемыми группами животных в уровнях экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой системы в структурах, представляющих центральное звено нейронального контура, вовлеченного в механизмы формирования алкогольной зависимости: вентральных отделах среднего мозга, т.е. области локализации тел дофамин-синтезирующих нейронов, и вентральном стриатуме - одной из основных мишеней дофаминовых нейронов.

2. Экспрессия генов ключевых белков дофаминовой системы в мозге крыс с различными показателями потребления алкоголя

В работе определяли уровень экспрессии мРНК ключевого фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы (ТН); дофамин-транспортного белка (DAT), обеспечивающего обратный захват медиатора; дофаминовых рецепторов D1-подтипа, представленных постсинаптически (в стриатуме); дофаминовых рецепторов D2-подтипа, экспрессирующихся как пре- (ауторецепторы), так и постсинаптически. Мы также исследовали уровень мРНК неспецифических для дофаминовых нейронов

синаптических белков α -синуклеина и белков SNARE-комплекса Snap25 и Vamp2. В дофаминовой системе эти белки не только обеспечивают процесс везикулярного транспорта, но и, согласно данным литературы, принимают участие в механизмах внутриклеточной модуляции различных звеньев дофаминовой нейротрансмиссии (Jones et al., 2001; Corradini et al., 2009; Butler et al., 2016).

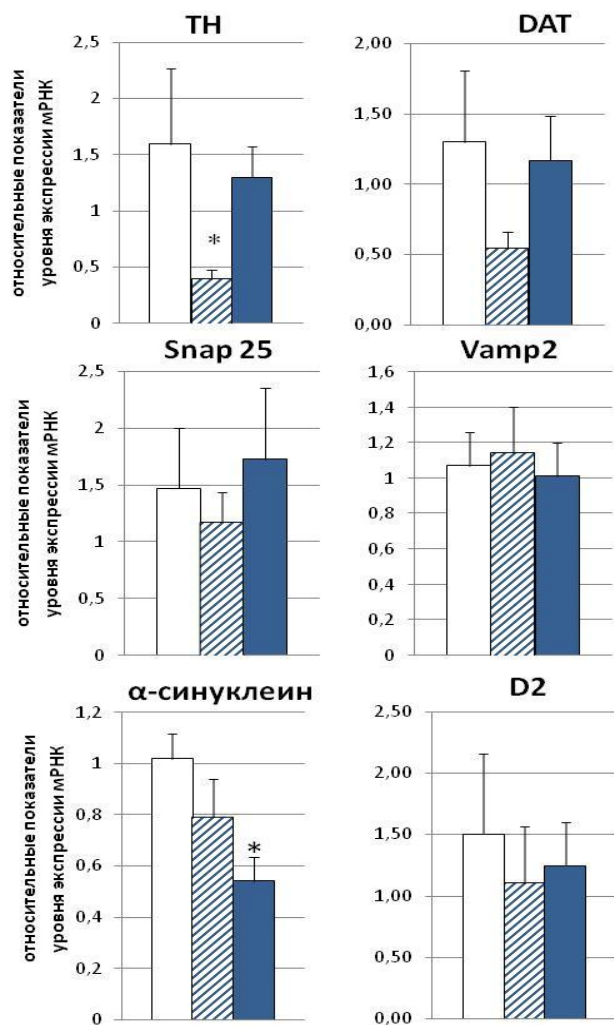


Рис. 2. Показатели экспрессии мРНК TH, DAT, Snap25, Vamp2, α -синуклеина и пресинаптических D2-рецепторов в среднем мозге крыс с различным уровнем потребления алкоголя.

□ А – животные с постоянно низким уровнем потребления алкоголя (n=13)
 ▨ В – животные, увеличившие потребление (n=11)
 ■ С - животные с постоянно высоким уровнем потребления (n=10)

* - $P < 0,05$ (относительно группы А, t-критерий Стьюдента)

Полученные результаты показывают, что в вентральных отделах среднего мозга - т.е. в областях, дающих начало основным дофаминергическим путям - мезолимбическому и мезокортикальному (A10) не наблюдается достоверных различий уровня мРНК дофаминовых D2 рецепторов и синаптических белков Snap 25 и Vamp2 у животных с высокими показателями потребления алкоголя (Группы В и С) по сравнению с животными группы А, контролирующими потребление на постоянно низком уровне. Снижение показателей экспрессии мРНК TH и DAT наблюдалось у животных с изначально низким уровнем потребления алкоголя, но с выраженной динамикой роста предпочтения в ходе эксперимента (группа В). Тенденция к снижению

экспрессии мРНК α -синуклеина в группе В и выраженное достоверное снижение в группе С позволяют предполагать наличие обратной связи между уровнем потребления алкоголя и экспрессией гена α -синуклеина в среднем мозге.

Полученные данные, на первый взгляд, противоречат существующей гипотезе о том, что гиперэкспрессия α -синуклеина может быть одним из факторов предрасположенности к алкоголизму (*Bönsch et al., 2004; Walker and Grant, 2006*). Вместе с тем, показано (*Ninkina et al., 2012*), что при определенных условиях, например, при дефиците белка-шаперона CSP α , α -синуклеин может брать на себя функции шаперона, регулирующего образование SNARE-комплекса (*Ungar et al., 2010*), по-видимому, путем его прямого взаимодействия с Vamp2 (*Burré et al., 2010*). Важно, что эта функция α -синуклеина особенно актуальна в условиях чрезмерной активации дофаминовой нейротрансмиссии, например, при действии психоактивных веществ или дисфункции системы при старении (*Burré et al., 2010*). Таким образом, результаты, полученные в настоящем исследовании, говорят в пользу гипотезы о возможной «защитной» роли α -синуклеина в дофамин-синтезирующих структурах мозга у животных с низким уровнем предпочтения алкоголя и способностью «контролировать» потребление на постоянном уровне.

Наиболее выраженные изменения уровня мРНК у животных с высоким предпочтением алкоголя были обнаружены в стриатуме для дофаминовых D1 и D2 рецепторов (Рис.3). Уровень мРНК D1-рецептора был достоверно снижен в 3,7 раза в группах В и С по сравнению с группой А, а D2-рецептора – в 5,5 раз в группе В и в 2,4 раза в группе С по сравнению с группой А (Рис.3). При этом различия показателей экспрессии мРНК α -синуклеина, Snap25 и Vamp2 в стриатуме у исследуемых групп животных обнаружены не были. Клиническими и экспериментальными исследованиями показано снижение эффективности дофаминовой нейротрансмиссии при алкогольной зависимости (*Nutt, 2015*). Было установлено снижение плотности дофаминовых D2-рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом (*Volkow et al., 1996*) и высказана гипотеза, что именно этот эффект алкоголя лежит в основе дофаминовой дисфункции. Стриатум представляет собой сложную структуру переднего мозга, на нейронах которого происходит конвергенция мотивационных импульсов (*Beck et al., 2009*), и важную роль в обеспечении этих функций играют дофаминовые D2-рецепторы, локализованные как пост-, так и пресинаптически (*Beaulieu, Gainetdinov, 2011*). До сих

пор не вполне понятно, какой из двух типов D2-рецепторов в большей мере подвержен действию алкоголя. Анализ мРНК в среднем мозге и стриатуме позволил дифференцировать эффект алкоголя на пре- и постсинаптическом уровнях. Экспрессия мРНК D2-рецептора в стриатуме отражает состояние постсинаптического звена, а уровень мРНК в среднем мозге - состояние пресинаптических D2-ауторецепторов, локализованных на окончаниях нейронов, проецирующихся в структуры-мишени (Gerfen and Surmeier, 2011).

Полученные в работе данные показывают, что у животных с высоким уровнем потребления алкоголя независимо от динамики роста потребления снижен уровень мРНК D1- и D2-рецепторов в стриатуме, т.е. на уровне регуляции транскрипции этих генов нарушения зарагивают, в первую очередь, постсинаптическое звено.

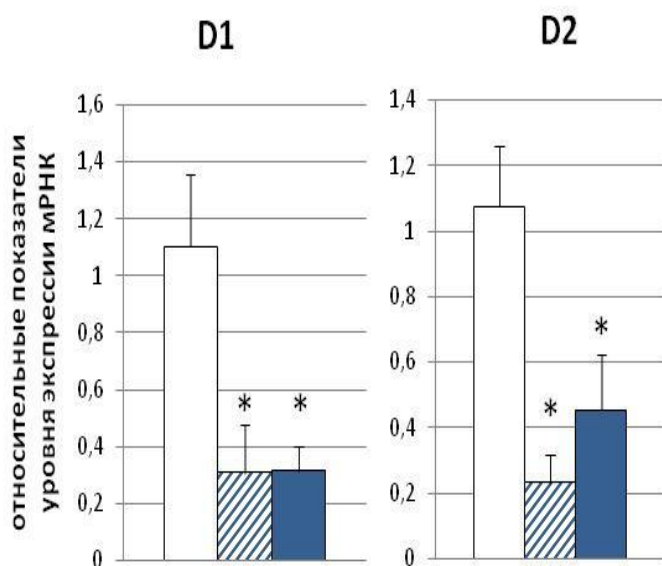


Рис. 3. Показатели экспрессии мРНК D1- и D2-рецепторов в стриатуме крыс с различным уровнем потребления алкоголя. По оси ординат – относительные показатели экспрессии.
 □ А – животные с постоянно низким уровнем потребления алкоголя (n=13)
 ▨ В – животные, увеличившие потребление (n=11)
 ■ С - животные с постоянно высоким уровнем потребления (n=10) *- P<0,05 (относительно группы А, t-критерий Стьюдента)

Полученные данные позволили предположить, что стратегия активации дофаминовых рецепторов с помощью их агонистов, используемая при других дофамин-дефицитных состояниях, в частности, в терапии болезни Паркинсона, может оказаться эффективной для снижения потребления алкоголя. Проверке этой гипотезы был посвящен следующий раздел экспериментального исследования. Выбранный для изучения каберголин относится к эрголиновым агонистам дофаминовых рецепторов и обладает целым рядом преимуществ по сравнению с другими представителями этой группы: высокой аффинностью к D2- ($K_i=0.61$) и низкой - к D1-рецепторам ($K_i=214$),

меньшими побочными эффектами и длительным периодом полувыведения (*Kverno et al., 2006*).

3. Агонист дофаминовых D2-рецепторов каберголин снижает алкогольную мотивацию у длительно алкоголизованных животных

Для исследования свойств каберголина мы использовали животных с высоким стабильным уровнем потребления алкоголя, среднесуточные показатели потребления этанола которых составляли $6,8 \pm 0,7$ г/кг ($n=9$) и $7,2 \pm 0,6$ г/кг ($n=8$). В дальнейшем животные первой группы в течение 24-х дней получали инъекции каберголина (0,5 мг/кг/сутки, в/б), второй группы - инъекции растворителя. Доза каберголина была выбрана с учетом диапазона доз, применяемых при лечении болезни Паркинсона, и коэффициента пересчета 6,2 для лабораторных крыс (*Nair and Jacob, 2016*).

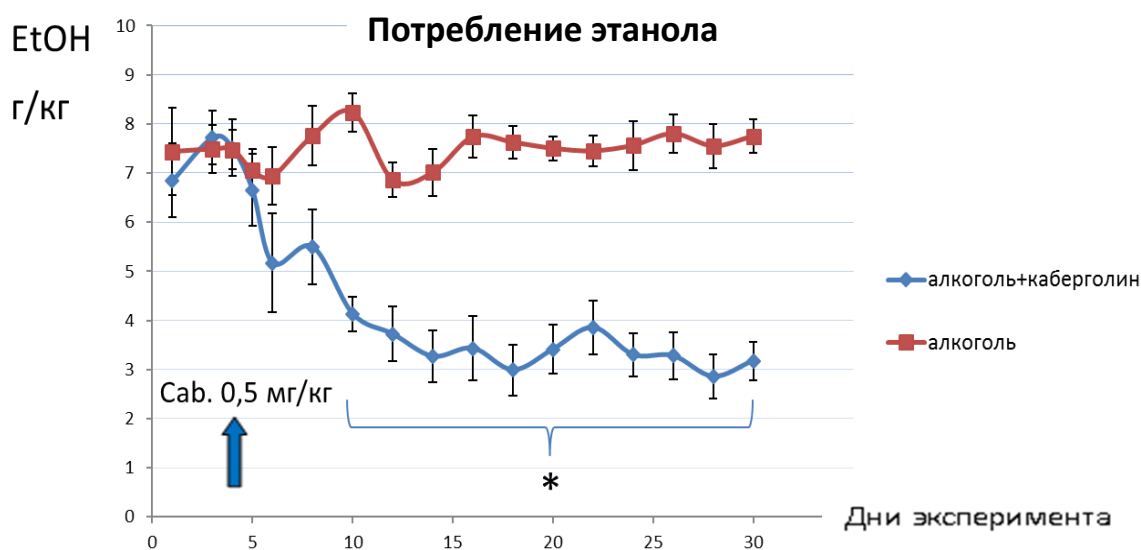


Рис.4 . Показатели среднесуточного потребления алкоголя при введении каберголина «алкоголь+каберголин» - хронически алкоголизованные крысы, получавшие каберголин (0,5 мг/кг, в/б, $n=9$), «алкоголь» - хронически алкоголизованные крысы, получавшие инъекции растворителя ($n=8$). Результаты представлены в виде значений среднего±ошибка среднего. Достоверность различий между группами * $p<0.05$ (two-way ANOVA для повторных измерений с последующим post-hoc анализом).

Потребление этанола снижалось уже после двух инъекций каберголина и достигало максимума после восьмой инъекции (Рис.4). Двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений показал, что потребление алкоголя в группе животных, получавших каберголин было значимо ниже (фактор «препарат»:

$F(1,15)=59,29$; $p<0,0001$; фактор «день введения»: $F(12,180)=1,92$; $p<0,05$; взаимодействие факторов «препарат»*«день введения»: $F(12,180)=2,21$; $P<0,05$). Важно, что общий объем потребляемой жидкости и показатели массы крыс не различались между группами в течение всего эксперимента. Таким образом, каберголин при введении в дозе 0,5 мг/кг один раз в сутки снижает потребление алкоголя у длительно алкоголизованных животных с высоким уровнем потребления этанола и может рассматриваться в качестве препарата, подавляющего алкогольную мотивацию.

4. Анализ влияния каберголина на поведение крыс

Задачей данного этапа исследования было выяснение: 1) возможного анксиолитического/анксиогенного эффекта каберголина и 2) наличия у него собственного «подкрепляющего» эффекта. Схема эксперимента представлена на Рис. 5А.

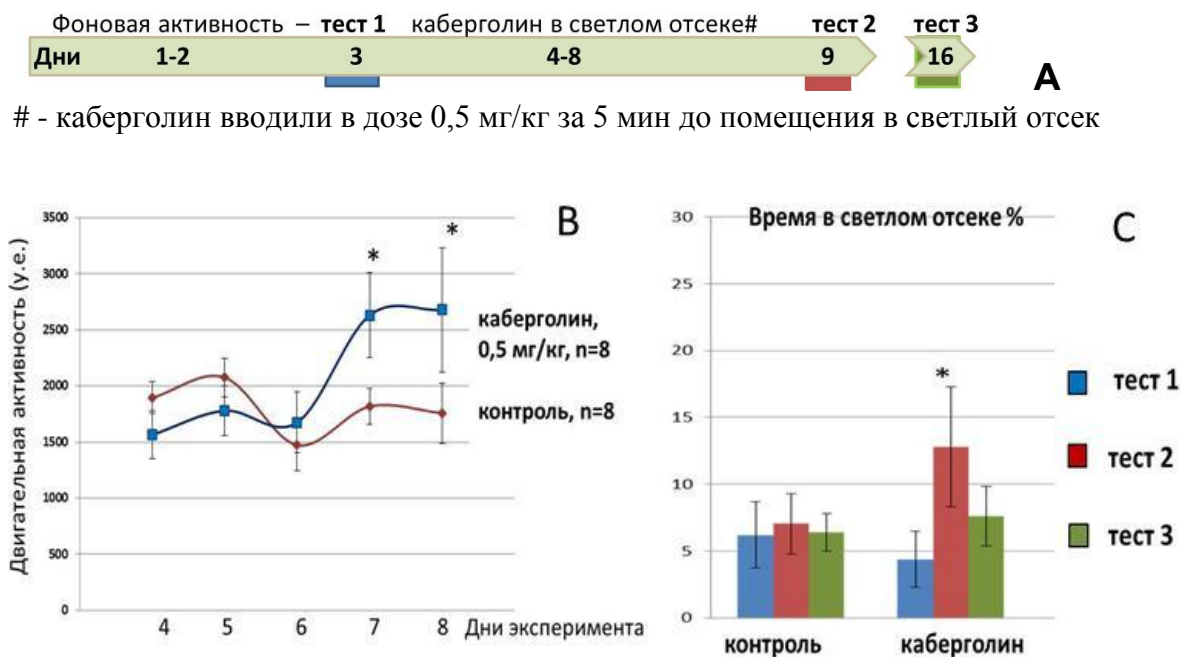


Рис. 5. Влияние каберголина на поведение крыс в тесте «темная/светлая камера».

А – схема эксперимента: фоновую двигательную активность животных и время, проведенное в темном и светлом отсеках камеры, регистрировали в течение 30 мин (1-й-3-й дни эксперимента). С 4-го по 8-й дни крысы получали инъекцию каберголина и помещались на 30 мин в избегаемый (светлый) отсек камеры. Двигательную активность в светлом отсеке регистрировали автоматически (**В**). 9-й и 16-й дни эксперимента - тест на «предпочтение» темного/светлого отсеков. **С** – время, проведенное в светлом отсеке камеры на 3-й (фон), 9-й и 16-й дни эксперимента (в % к общему времени теста). Достоверность различий между группами: $*p<0,05$ (two-way ANOVA для повторных измерений с последующим post-hoc анализом).

Показателями анксиолитического эффекта каберголина являются увеличение времени пребывания животного в аверсивном (ярко освещенном) отсеке камеры и увеличение двигательной активности в этом отсеке (Рис. 5В). Тестирование «предпочтения» на 9-й день эксперимента показало достоверное увеличение времени пребывания в светлом отсеке у животных, получавших каберголин. Эти данные подтверждают вывод об анксиолитических свойствах каберголина, но также могут свидетельствовать о наличии собственного «подкрепляющего» эффекта (*Prus et al., 2009*), т.е. формирования условно-рефлекторной реакции на обстановку, ассоциированную с действием данного препарата. Однако в нашем исследовании каберголин вызывал увеличение времени пребывания животных в светлом отсеке камеры, но не инверсию предпочтения, т.е. темный отсек по-прежнему оставался предпочитаемым. Кроме того, эффект не сохранялся при повторном тестировании через неделю (тест 3), что не позволяет делать вывод о наличии у каберголина «подкрепляющего» эффекта. Для проверки гипотезы о наличии у каберголина собственного наркогенного потенциала мы использовали группу интактных крыс-самцов (n=10), которым в течение 14 дней вводили один раз в сутки каберголин в дозе 0,5 мг/кг, в/б. Через 24 часа после последней инъекции каберголина крысы получали инъекцию налоксона (3 мг/кг, п/к) и помещались в индивидуальные домашние клетки с постоянным мониторингом двигательной активности (Activiscop). Визуальная оценка в течение первых 2-х часов после инъекции налоксона не выявила признаков «синдрома отмены» (корчи, судороги, скрежет зубами, отряхивания «мокрой собаки», прыжки, птоз, диарея). Не наблюдалось изменений двигательной активности и потери массы тела в течение 24 часов после инъекции, что типично для налоксон-провоцируемого синдрома отмены в случае различных видов зависимости (*Becker et al., 2010; Avena et al., 2008*).

5. Влияние каберголина на экспрессию генов дофаминовой системы в мозге интактных и хронически алкоголизированных животных

Задачей данного этапа исследований было выяснение влияния хронического введения каберголина на экспрессию мРНК TH, DAT, D2-ауторецептора, и синаптических белков – α -синуклеина, Snap25 и Vamp2 в среднем мозге и

среднем мозге был достоверно снижен по сравнению с группой интактных животных, получавших плацебо (Рис.8).

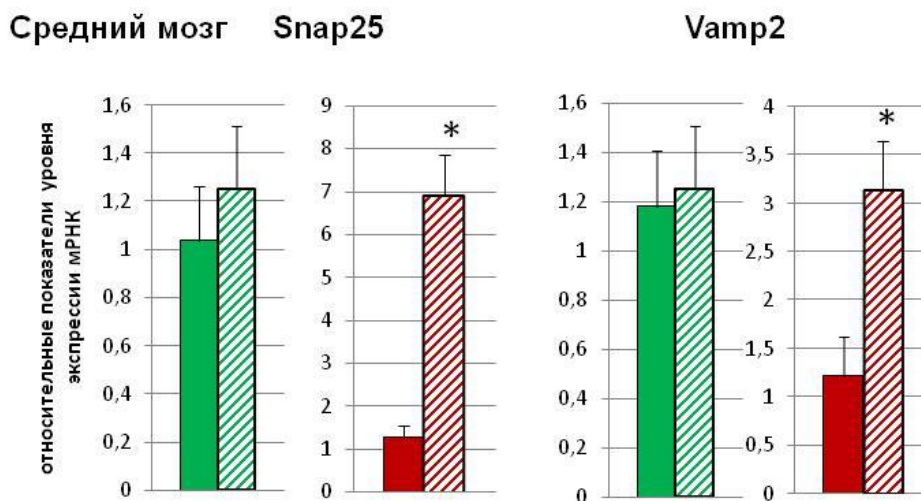


Рис.7. Влияние каберголина на экспрессию мРНК Snap 25 и Vamp2 в среднем мозге интактных и хронически алкоголизованных животных. Обозначения как на Рис.6.

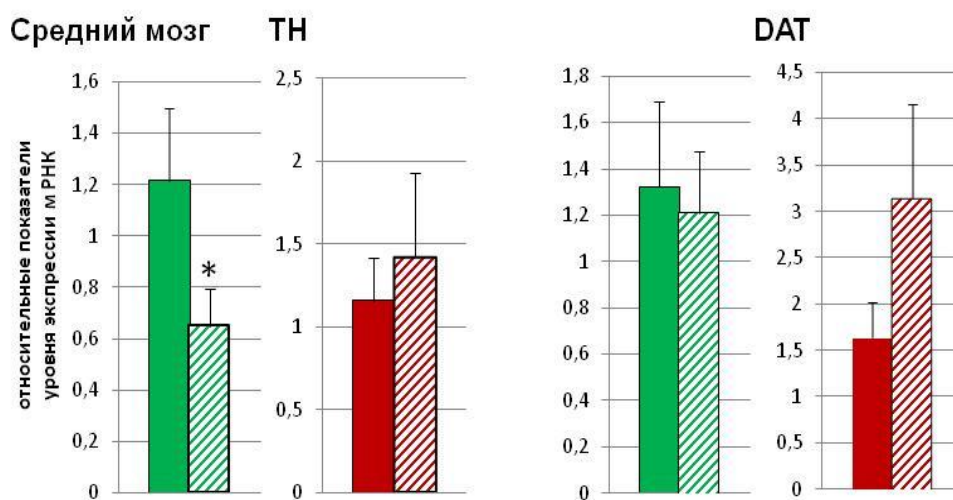


Рис.8. Влияние каберголина на экспрессию мРНК TH и DAT в среднем мозге интактных и хронически алкоголизованных животных. Обозначения как на Рис.6.

Полученные данные позволяют предполагать, что эффект каберголина направлен на активацию как D2-ауторецепторного (пресинаптического), так и D2-постсинаптического звеньев дофаминовой мезолимбической системы мозга. Важным преимуществом каберголина является его низкая аффинность по отношению к дофаминовым D1-рецепторам. Эффект агонистов D1-рецепторов на экспрессию мРНК в стриатуме достаточно хорошо изучен и охватывает широкий круг генов

транскрипционных факторов (c-fos, fosB, fra2, c-jun, junB, nur77, zif268 и др.), а также предшественников пептидов (динорфина, энкефалина, нейропептида Y, нейротензина, соматостатина и субстанции P) (Cadet et al., 2010). Таким образом, низкая аффинность каберголина к D1-репторам позволяет избежать целого ряда нежелательных побочных явлений, в том числе, состояния дисфории, связанной с D1-зависимой активацией каппа-динорфиновой системы, собственных наркогенных свойств и нейротоксических эффектов (Chen, 2003).

В последнее время в литературе активно обсуждается возможная роль нейротрофических факторов в нормализации функций дофаминовой системы с помощью агонистов D2-рецепторов. В частности, предполагают, что эффект каберголина может быть связан с активацией экспрессии глиального фактора роста нервов (GDNF) в вентральной покрышке среднего мозга (Carnicella et al., 2009). В настоящей работе мы проверили гипотезу о влиянии каберголина на уровень мРНК мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в среднем мозге и стриатуме хронически алкоголизованных и интактных животных (Рис.9).

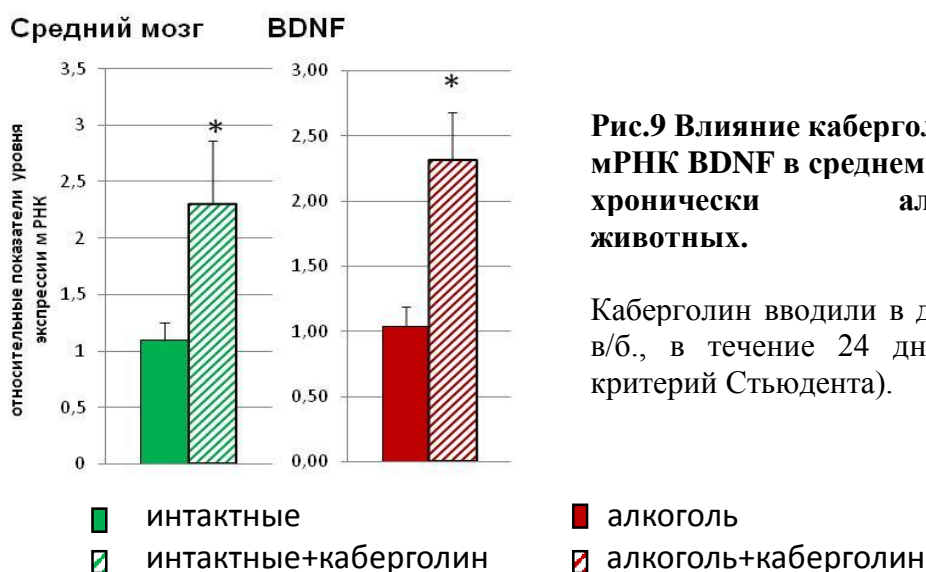


Рис.9 Влияние каберголина на экспрессию мРНК BDNF в среднем мозге интактных и хронически алкоголизованных животных.

Каберголин вводили в дозе 0,5 мг/кг/сут, в/б., в течение 24 дней. * $p < 0.05$ (t-критерий Стьюдента).

Показано, что как у интактных, так и у хронически алкоголизованных животных каберголин более чем в 2 раза увеличивает уровень мРНК BDNF в среднем мозге. Ранее нейропротекторные свойства каберголина были показаны в экспериментальных моделях нейродегенерации как *in vivo* (Yoshioka et al., 2002; Odaka et al., 2014), так и *in vitro* в культуре мезенцефальных нейронов (Meinel et al., 2015). Авторы предполагают, что в основе терапевтических эффектов препарата при нейродегенерации лежит синтез белков, обладающих антиоксидантным действием, и, как следствие, стимуляция

аутоτροφической функции нейронов. В нашей работе впервые показано, что при длительном применении каберголин вызывает активацию экспрессии мРНК BDNF в среднем мозге, причем выраженность эффекта не различается у интактных и хронически алкоголизованных животных, что позволяет предполагать независимые пути регуляции каберголином экспрессии генов дофаминовой системы и BDNF в структурах мезолимбической системы мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые осуществлен сравнительный анализ изменений экспрессии генов дофаминовых рецепторов D1- и D2-подтипов в области локализации тел дофаминовых нейронов (средний мозг) и их ключевой области–мишени (вентральный стриатум) у хронически алкоголизованных животных с различным уровнем потребления алкоголя. Использованный подход позволил дифференцировать вызванные алкоголем изменения уровня мРНК пре- и постсинаптических дофаминовых D2-рецепторов, имеющих принципиально различное функциональное значение. Полученные результаты показывают, что в вентральных отделах среднего мозга не наблюдается достоверных различий уровня мРНК D2-рецептора у животных с высокими показателями потребления алкоголя по сравнению с животными, поддерживающими потребление алкоголя на постоянно низком уровне. Вместе с тем, у животных с высоким уровнем предпочтения алкоголя независимо от динамики роста потребления достоверно снижена экспрессия мРНК D1- и D2-рецепторов в вентральном стриатуме. Это указывает на то, что на уровне транскрипции соответствующих генов нарушения затрагивают, в первую очередь, постсинаптическое звено дофаминовой системы. Полученные данные позволили предположить, что стратегия активации дофаминовых рецепторов с помощью их агонистов, используемая при ряде дофамин-дефицитных состояний, в частности, в терапии болезни Паркинсона, может оказаться эффективной для снижения потребления алкоголя.

В работе впервые проведен всесторонний анализ действия агониста D2-рецепторов каберголина на поведение и экспрессию генов дофаминовой системы у интактных и хронически алкоголизованных животных. Показано, что каберголин при системном введении в дозе 0,5 мг/кг вызывает стабильное снижение потребления алкоголя, а также проявляет анксиолитические свойства. У хронически алкоголизованных животных

введение каберголина вызывало достоверное повышение уровня мРНК D2-рецептора как в среднем мозге, так и в вентральном стриатуме. Каберголин также увеличивал уровень экспрессии мРНК синаптических белков *Snap25* и *Vamp2* и нейротрофического фактора BDNF в среднем мозге хронически алкоголизированных животных, что может лежать в основе его анксиолитического и нейропротективного эффектов. Настоящее исследование позволяет по-новому взглянуть на возможную сферу применения D2-агонистов и, прежде всего, каберголина, и рассматривать их в роли перспективных препаратов для снижения потребления алкоголя. Полученные новые данные существенно расширяют знания о возможных механизмах изменений в структурах мезолимбической системы мозга на уровне регуляции транскрипции генов и позволяют предложить D2-рецепторы в качестве мишени для направленной терапии алкогольной зависимости.

ВЫВОДЫ

1. Формирование алкогольной мотивации у крыс в экспериментальной модели добровольного потребления этанола сопровождалось изменением транскрипции генов, контролирующей функции мезолимбической дофаминовой системы мозга, что может лежать в основе индивидуальной предрасположенности к развитию алкогольной зависимости.
2. У крыс с изначально низким уровнем потребления алкоголя но выраженным ростом его предпочтения уровень экспрессии мРНК тирозингидроксилазы и дофамин-транспортного белка в среднем мозге был ниже по сравнению с животными, поддерживавшими потребление алкоголя на постоянном уровне, что может свидетельствовать о нарушении процессов синтеза и обратного захвата дофамина у животных с растущей алкогольной мотивацией.
3. Экспрессия мРНК синаптического белка α -синуклеина в среднем мозге у крыс, поддерживающих потребление алкоголя на постоянно низком уровне, была выше, чем у животных с высоким уровнем потребления, что позволяет предполагать возможную защитную роль α -синуклеина в структурах мезолимбической дофаминовой системы при действии алкоголя.
4. В вентральном стриатуме хронически алкоголизированных животных с высоким уровнем потребления алкоголя была достоверно снижена экспрессия мРНК

дофаминовых D2-рецепторов, что послужило основанием для дальнейшего исследования D2-агониста каберголина в качестве потенциального средства, снижающего потребление алкоголя.

5. Каберголин при системном введении снижал потребление алкоголя у крыс с высокими показателями предпочтения этанола.

6. Снижение мотивации потребления алкоголя при введении каберголина хронически алкоголизированным крысам сопровождалось повышением экспрессии мРНК D2-рецептора как на пресинаптическом (в среднем мозге), так и на постсинаптическом (в вентральном стриатуме) уровнях.

7. Каберголин повышал уровень экспрессии мРНК синаптических белков Snap25 и Vamp2 и нейротрофического фактора BDNF в среднем мозге хронически алкоголизированных животных, что может лежать в основе его анксиолитического и нейропротективного эффектов.

8. Полученные данные позволяют предложить агонист дофаминовых D2-рецепторов каберголин для дальнейших исследований в качестве перспективного препарата направленного на терапию алкогольной зависимости.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анохин П.К., Шагиахметов Ф.Ш., Проскурякова Т.В., Шамакина И.Ю. Алкогольная интоксикация в подростковом периоде: экспериментальное исследование. Вопросы наркологии. 2016. №3, С. 40-54.
2. Анохин П.К., Т.В. Проскурякова Т.В., Шамакина И.Ю., Устюгов А.А., Бачурин С.О. Сравнительный анализ экспрессии мРНК α -синуклеина в мозге крыс с различным уровнем потребления алкоголя. Нейрохимия, 2016, №4, С.1-7.
3. Anokhin P., Proskuryakova T., Ulyanova E., Shokhonova V., Anokhina I., Shamakina I. Cabergoline regulates alcohol consumption and expression of dopamine related genes in the midbrain of rats with chronic alcohol intoxication. *European Neuropsychopharmacology*, Vol. 26., S668-S669.
4. Анохин П.К., Шамакина И.Ю., Проскурякова Т.В., Шоханова В.А., Ульянова Е.В., Тарабарко И.Е., Анохина И.П. Селективный агонист дофаминовых D2-рецепторов каберголин снижает потребление алкоголя и повышает и экспрессию гена DRD2 в мозге у крыс с хронической алкогольной интоксикацией. Нейрохимия, 2017, Т.34, №1, С. 1-8.

Тезисы докладов:

1. Анохин П.К., Шамакина И.Ю., Томилин В.А., Шагиахметов Ф.Ш. «Отдаленные эффекты ранней алкогольной интоксикации на алкогольную мотивацию и экспрессию генов в мозге: экспериментальное исследование». Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Междисциплинарный подход к психическим расстройствам и их лечению: миф или реальность?», 2014 г., Санкт-Петербург.

2. Шагиахметов Ф., Анохин П., Ульянова Е. Ранняя алкогольная интоксикация: влияние на алкогольную мотивацию и экспрессию гена CRF в мозге взрослых животных// XII Всероссийская школа молодых психиатров "Суздаль-2015".
3. Anokhin P., Shagiakhmetov F., Ustyugov A., Bachurin S.O., Shamakina I. Yu. α -Synuclein mRNA is up-regulated in the striatum of rats experienced alcohol-intoxication during adolescence // The 7th International Congress on Psychopharmacology and the 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, 2015, Turkey.
4. Лыткина О.А., Тарасова Т.В., Анохин П.К., Кухарский М.С., Устюгов А.А. Сравнительный анализ функции альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах. I Национальная конференция с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике», 2014, Москва.
5. Шамакина И.Ю., Анохин П.К., Шагиахметов Ф.Ш., Проскурякова Т.В., Шохорова В.А., Ульянова Е.В. Экспериментальные модели алкогольной зависимости: сравнительный анализ экспрессии генов, контролирующей функциональное состояние дофаминовой системы мозга. 6-я Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 2015, Клязьма, Россия.
6. Anokhin P., Shagiakhmetov F., Ustyugov A., Shamakina I. C138 - Alcohol during adolescence influences alcohol-related behavior and expression of genes responsible for dopamine synaptic availability but not dopamine synthesis. FENS Forum of Neuroscience, 2016, Copenhagen, Denmark.
7. Анохин П.К., Шагиахметов Ф.Ш., Шамакина И.Ю. Экспрессия генов α - и γ -синуклеинов в мозге крыс: эффект алкогольной интоксикации в период полового созревания. «Биомаркеры в психиатрии: поиск и перспективы», 2016, Томск.