<http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2618-8783-2018-3-2-75-82>

УДК 613.81

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА OXR1 В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Севостьянова¹ Н.Н., Айрапетов^{2,3} М.И., Ереско⁴ С.О.

¹ФГБОУ ВО «Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого»,
Великий Новгород, Российская Федерация

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Российская
Федерация

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский
университет», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург,
Российская Федерация

Аннотация. В работе описана роль системы орексина в механизмах алкогольной аддикции, активирующей систему, направленную на поиск алкоголя в период абстиненции.

Для определения возможной дисрегуляции рецепторов орексина поставлена цель определить уровень экспрессии гена OXR1 в условиях длительной алкоголизации и в период абстиненции в структурах мозга: префронтальной коре, гиппокампе и вентральной области покрышки.

В экспериментах с хронической алкоголизацией взрослых крыс подвергали полунасильственной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6 месяцев. Проведена оценка мРНК OXR1 (рецептор орексина) у животных групп абстиненции на первый и седьмой день по сравнению с интактными и хронически алкоголизированными животными.

Установлено, что уровень мРНК OXR1 достоверно снижается в префронтальной коре у групп хронически алкоголизированных крыс и у животных групп абстиненции на первый и седьмой день.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о целесообразности введения антагонистов орексина для лечения алкогольной зависимости.

Ключевые слова: профилактика алкогольной зависимости, орексин, аддиктивные состояния, абстиненция, OXR1.

Введение. Всемирная организация здравоохранения недавно опубликовала рейтинг пьющих стран, в котором Россия занимает 6 место, при этом всё чаще алкогольная зависимость наблюдается у лиц в возрасте до 30 лет. По этой причине приоритетными направлениями в плане оздоровления нации являются профилактика потребления алкоголя, формирование здорового образа жизни и разработка препаратов и добавок, снижающих тягу к алкоголю.

Изучение роли нейропептидов в формировании аддиктивных состояний и возможность использования фармакологических препаратов на их основе в терапии наркотической и алкогольной зависимости является одним из актуальных направлений медико-биологических исследований. Особое внимание привлекают недавно открытые нейропептиды семейства орексинов, участвующие в регуляции различных физиологических функций, в частности пищевого поведения и регуляции цикла сна-бодрствования. Система орексина была открыта в 1998 независимо друг от друга двумя группами ученых из США и Японии. Семейство орексинов включает в себя нейропептиды: орексин А, состоящий из 33 аминокислотных остатков, и орексин В, состоящий из 28 аминокислотных остатков. Продуцируются оба пептида из общего полипептидного предшественника, препроорексина, состоящего из 130 аминокислот, путем протеолиза [3, 4].

По прошествии 12 лет стало известно, что система орексина также участвует в механизмах алкогольной аддикции, способствуя активации систем, направленных на поиск алкоголя в период абстиненции [14, 15, 17]. Впервые об этом сообщил в 2006 году А. Лоуренс и его коллеги из Мельбурнского университета Австралии. Его исследования показали, что орексин не вовлечен в развитие предпочтения к алкоголю, но повторное воздействие сигналов, ранее связанных с наличием алкоголя, является достаточным, чтобы привести к активации нейронов, участвующих в стимуляции поиска алкоголя [2, 3, 4].

Нейроны, экспрессирующие орексин А и орексин В, которых около 3000 в мозге крысы и приблизительно 70 000 в человеческом мозге, локализуются преимущественно в латеральном гипоталамусе (LH) и посылают свои проекции практически ко всем структурам мозга (рис. 1) [3, 4].

Высвобождаясь из нервных волокон, орексины связываются с двумя орексиновыми рецепторами: OXR1 и OXR2. Орексин В обладает одинаковым сродством к обоим типам рецепторов, в то время как у орексина А аффинность к OXR1 в 20-30 раз выше, по сравнению с OXR2 [3, 4].

Рис. 1. Проекция системы орексина из гипоталамуса (А - к холинергическим нейронам, ретикулярной формации и в спинной мозг; В - к таламусу и базальным ганглиям; С- к базальному переднему мозгу; D - к миндалине и дофаминергическим нейронам, включая супрахиазматическое ядро; Е- к локусу coeruleus) [2, 3, 4].

Орексиновый рецептор 1-го типа (OXR1) был изначально идентифицирован в качестве орфанового рецептора, экспрессируемого в головном мозге человека. Позже был обнаружен орексиновый рецептор 2-го типа (OXR2). Оба типа рецептора являются метаботропными, сопряженными с G-белком. На сегодня известно то, что OXR1 и OXR2 могут соединяться с Gq, Gs и Gi белками, запуская каскады внутриклеточных сигнальных путей [2, 3, 4].

Экспрессия генов рецепторов, как OXR1, так и OXR2, наблюдается во всех регионах мозга и на периферии, хотя и с разной плотностью. При этом точно известно, что OXR1 экспрессируется в префронтальной коре, гиппокампе, вентральной области покрышки [15]. В связи с тем, что еще существует много неизученных и противоречивых данных о дисрегуляции рецепторов орексина, мы поставили цель определить уровень экспрессии гена OXR1 в условиях длительной алкоголизации и в период абстиненции в структурах мозга крыс: префронтальная кора, гиппокамп, вентральная область покрышки.

Материалы и методы. В работе были использованы 40 крыс-самцов линии Вистар, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область), с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества №86/609 ЕС), одобренных Этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ». Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой. В экспериментах с хронической алкоголизацией половозрелых крыс (начальный возраст 3-4 месяца) подвергали полунасиловственной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 6 месяцев. Контрольная группа крыс в качестве источника жидкости получала воду. По истечении этого времени крыс декапитировали, выделяя группы животных с 6-месячной алкоголизацией и через одни и 7 суток после отмены алкоголя. Образцы необходимых структур мозга (префронтальная кора, гиппокамп, вентральная область покрышки) немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа. Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol («Ambion», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 25 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, «Promega», США). Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени («Mx3005P», «Stratagene», США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green, ROX («Синтол», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров, подобранных и синтезированных в компании «Beagle» (Россия). Полученные данные нормированы к уровню экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитаны в относительных единицах по отношению к величине экспрессии OXR1 методом $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ GraphPadPrizm v.4; SPSS SigmaStat 3,0 и Minitab 14. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные результаты показали, что уровень мРНК OXR1 достоверно снизился в префронтальной коре у группы хронически

алкоголизированных крыс в сравнении с интактной группой контроля (рис. 1). На 1-ый и 7-ой дни отмены этанола наблюдали дальнейшее достоверное снижение экспрессии гена OXR1.

В гиппокампе получены противоположные результаты, где наблюдали достоверное увеличение уровня мРНК OXR1 на 1-ый и 7-ой дни отмены этанола. В условиях наших опытов в вентральной области покрышки уровень мРНК OXR1 у групп абстиненции на 1-ый и 7-ой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся.

Показано, что важную роль в регуляции функций префронтальной коры играют возбуждающие пептиды – орексины. Орексин А рассматривается как один из возбуждающих пептидных нейромедиаторов в префронтальной коре, действие которого реализуется посредством активации OXR1 [13]. Имеется ряд исследований, показывающих, что OXR1 является единственным рецептором орексина, обнаруженным в префронтальной коре [12].

Рис. 1. Влияние алкоголизации и отмены алкоголя на уровень экспрессии гена OXR1 в структурах мозга крыс.

(По оси ординат – условные единицы. * – $p < 0,05$ по отношению к группе интактных животных; # – $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизированных крыс.)

Прямое возбуждающее действие орексина А на нейроны префронтальной коры может способствовать модуляции ее активности и играть роль в когнитивном возбуждении [14]. Хотя точные клеточные и синаптические механизмы развития алкогольной зависимости еще не определены окончательно, имеются данные, что глутаматергическая сигнализация между префронтальной корой и прилежащим ядром (nucleus accumbens) является

важным фактором, способствующим восстановлению алкогольной зависимости (мотивации), что приводит к высокому проценту рецидивов среди пациентов с синдромом отмены алкоголя. Потребление алкоголя усиливает возбуждающие постсинаптические токи в нейронах префронтальной коры [5]. Известно, что префронтальная кора вовлечена в регуляцию поискового поведения, ассоциированного с большинством наркотических средств, включая кокаин и этанол. Было сделано предположение, что префронтальная кора, вентральная область покрышки и прилежащее ядро вовлечены в дофамин-зависимый путь, модулируя поведенческие ответы для поиска этанола [3].

В литературе имеются краткие сведения о функциях и дисрегуляции рецепторов орексина в гиппокампе, однако известно, что оба типа рецепторов здесь присутствуют, хотя и разной плотностью [7, 8]. Исследования показывают, что введение антагонистов орексина SB334867 (OXR1) и TCSOX229 (OXR2) в CA1 поле гиппокампа ослабляет развитие условного предпочтения места, вызванного химической стимуляцией латерального гипоталамуса. Однако это снижение было более значительным при использовании антагониста OXR1 в сравнении с животными, которым вводили антагонист OXR2 [11]. В нашем эксперименте наблюдалось достоверное увеличение уровня мРНК OXR1 на первый и седьмой дни абстиненции.

Важно отметить, что более 20 генов были исследованы в моделях хронической алкогольной зависимости, в результате получены данные об изменении их активности при алкоголизме [9]. В связи с этим интерес в изучении функциональной активности генов, в том числе орексинов, растет [1, 9]. Исследования показывают, что вентральная теменная область среднего мозга принимает участие в модуляции сигнальных путей, связанных с патологическим влечением к алкоголю и к другим психогенным веществам [10], однако в наших исследованиях уровень мРНК рецепторов орексина не изменялся, как в группе хронически алкоголизированных животных, так и в группах первого и седьмого дня отмены алкоголя.

Заключение. Несмотря на многочисленные исследования механизмов, вовлеченных в развитие алкоголизма, все еще остается много неясных и противоречивых вопросов. Известно, что орексин и его рецепторы вовлечены в механизмы патологического влечения к алкоголю, однако сведения об экспрессии гена OXR1 в гиппокампе крыс противоречивы. В проведенных нами исследованиях было показано, что уровень мРНК OXR1 достоверно снижается в префронтальной коре у группы хронически алкоголизированных крыс в сравнении с интактной группой контроля, также наблюдается сниженная экспрессия гена OXR1 на 1-ый и 7-ой дни отмены этанола. В гиппокампе, напротив, наблюдается увеличение уровня мРНК OXR1 на 1-ый и 7-ой дни абстиненции. В вентральной области покрышки в нашем эксперименте уровень мРНК OXR1 у групп абстиненции на 1-ый и 7-ой дни по отношению к группе хронической алкоголизации и к группе интактных животных не изменялся. Это указывает на вовлеченность, прежде всего, префронтальной коры и гиппокампа в механизмы, опосредующие хроническую алкогольную интоксикацию. Изменение уровня мРНК рецептора в структурах-мишенях при хронической алкоголизации может быть связано с изменением экспрессии мРНК самого эндогенного лиганда орексина.

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Айрапетов М.И., Хохлов П.П., Бычков Е.Р., Сексте Э.А., Якушина Н.Д., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Влияние алкоголизации матерей на активность грелиновой системы в пренатальный и ранний постнатальный периоды развития у потомства крыс // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2015. – Т. 13, Прил.1. – С. 10-13.
2. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Сексте Э.А., Айрапетов М.И., Ереско С.О., Хохлов С.О., Бычков Е.Р. Экспрессия гена орексинового рецептора OXR1 в мозге крыс при хронической алкоголизации и отмене этанола // *Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова*. – Воронеж: Издательство «Истоки», 2017. – С. 2527-2529.
3. Baimel C., Bartlett S.E., Chiou L.C., Lawrence A.J., Muschamp J.W., Patkar O., Tung L.W., Borgland S.L. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions // *J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172(2). – P.334-348. –doi: 10.1111/bph.12639.
4. Díaz F.B., López R.M. Orexin receptors as therapeutic targets for addiction and anxiety disorders. – Barcelona: Universitat Pompeu Fabra, 2016. – 428 p.
5. Klenowski P.M. Emerging role for the medial prefrontal cortex in alcohol-seeking behaviors // *Addict. Behav.* – 2018. – Vol. 77. – P.102-106. – doi: 10.1016/j.addbeh.2017.09.024.
6. Lawrence A.J., Michael S.C., Hong-Ju Y., Feng C., Brian O. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats // *Brit. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 148(6). – P.752–759. – doi: 10.1038/sj.bjp.0706789.
7. Lu X.Y., Bagnol D., Burke S. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting // *Horm. Behav.* – 2000. – Vol.37. – P.1529–1533. – doi: 10.1006/hbeh.2000.1584.
8. Marcus J.N., Aschkenasi C.G., Lee C.E. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – Vol. 435. – P.6–25. – doi.org/10.1002/cne.1190.
9. Matsumoto I. Proteomics approach in the study of the pathophysiology of alcohol-related brain damage // *Alcohol Alcohol.* – 2009. – №44. – P.171-176. – doi: 10.1093/alcalc/agn104.
10. Olney J.J., Navarro M., Thiele T.E. The role of orexin signaling in the ventral tegmental area and central amygdala in modulating binge-like ethanol drinking behavior // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2017. – Vol. 41(3). – P.551-561. – doi: 10.1111/acer.13336.
11. Rashidy-Pour A., Moradi M., Fatahi Z., Haghparast A., Haghparast A. Role of intra-hippocampal orexin 1 and orexin 2 receptors in conditioned place preference induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus // *Behav. Brain Res.* – 2015. – Vol. 15. – P.106-111. – doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.051.
12. Sharf R., Sarhan M., DiLeone R.J. Role of orexin/hypocretin in dependence and addiction // *Brain Res.* – 2010. – Vol.1314. – P. 130. – doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.028.
13. Xia J., Chen X., Song C., Ye J., Yu Z., Hu Z. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin A through the inhibition of potassium currents // *J. Neurosci. Res.* – 2005. –Vol.82. – P.729–736. – doi.org/10.1002/jnr.20667.
14. Yan J., He C.J.X., Zhang D., Hu Z.A. Orexin-A excites pyramidal neurons in layer 2/3 of the rat prefrontal cortex // *Neurosci. Lett.* – 2012. – Vol. 520(1). – P. 92-97. – doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.038.
15. Triverdi P. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain / P. Triverdi, H. Yu, D.J. MacNeil et al. // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol.438. – P.71–75.

EXPRESSION OF THE OXR1 GENE IN EMOTIOGENIC STRUCTURES OF THE BRAIN OF RATS IN CONDITIONS OF PROLONGED ALCOHOL ABUSE

Sevostyanova¹ N.N., Airapetov^{2,3} M.I., Eresko⁴ S.O.

¹Yaroslav-the-Wise Novgorod state university, Veliky Novgorod, Russian Federation

²Institute of experimental medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

³Saint-Petersburg state pediatric medical university, Saint Petersburg, Russian Federation

⁴Saint-Petersburg state university, Saint Petersburg, Russian Federation

Annotation. Orexin and its receptors were shown to involve into mechanisms of pathological craving to alcohol. This paper demonstrates that orexin receptor of the first type (OXR1) mRNA level was significantly decreased in the prefrontal cortex of rats chronically (during 6 months) consuming ethanol compared with intact control. The same data were observed on the 1st and 7th days of alcohol withdrawal after chronic alcoholization. On the contrary, in the hippocampus, the OXR1 mRNA level was increased on the 1st and 7th days of alcohol abstinence. In the ventral tegmental area, the OXR1 mRNA level did not change on the 1st and 7th days of alcohol abstinence compared with the groups of chronic alcoholization and intact control. These findings point out an involvement of the prefrontal cortex and hippocampus first of all in mechanisms mediating chronic alcohol intoxication. The ventral tegmental area is described as a typical dopaminergic structure providing the executive mechanism of emotion reactions connected with alcohol abuse in particular. Perhaps, the modulating action of orexins on dopaminergic neurons in this structure does not provide a significant effect on control of emotion reactions in alcoholism.

Key words: alcoholism, neuropeptides, orexin, OXR1.

REFERENCES

1. Ayrapetov M.I., Khokhlov P.P., Bychkov E.R., Sexte E.A., Yakushin N.D., Lebedev A.A., Shabanov P.D. the Effect of alcoholization of mothers on the activity Greenway system in the prenatal and early postnatal periods of development in offspring of rats // Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. - 2015. - Vol. 13, ADJ.1. - P. 10-13.
2. Shabanov P.D., Lebedev A., Sekste E.A., Airapetov M.I., Eresko S.O., Khokhlov P.P., Bychkov E.R. Expression of the OXR1 gene of the oxr1 receptor in the chronic alcoholism of the brain of the rats with the abolition of the 22nd Congress of the Pavlov Physiological society. - Voronezh: Publishing House «Istoki», 2017. - P. 2527-2529.
3. Baimel C., Bartlett S.E., Chiou L.C., Lawrence A.J., Muschamp J.W., Patkar O., Tung L.W., Borgland S.L. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions // J. Pharmacol. - 2015. - Vol. 172(2). - P.334-348. -doi: 10.1111/bph.12639.
4. Díaz F.B., López R.M. Orexin receptors as therapeutic targets for addiction and anxiety disorders. - Barcelona: Universitat Pompeu Fabra, 2016. - 428 p.
5. Klenowski P.M. Emerging role for the medial prefrontal cortex in alcohol-seeking behaviors // Addict. Behav. - 2018. - Vol. 77. - P.102-106. - doi: 10.1016/j.addbeh.2017.09.024.
6. Lawrence A.J., Michael S.C., Hong-Ju Y., Feng C., Brian O. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats // Brit. J. Pharmacol. - 2006. - Vol. 148(6). - P.752-759. - doi: 10.1038/sj.bjp.0706789.
7. Lu X.Y., Bagnol D., Burke S. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting // Horm. Behav. - 2000. - Vol.37. - P.1529-1533. - doi: 10.1006/hbeh.2000.1584.
8. Marcus J.N., Aschkenasi C.G., Lee C.E. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain // J. Comp. Neurol. - 2001. - Vol. 435. - P.6-25. - doi.org/10.1002/cne.1190.
9. Matsumoto I. Proteomics approach in the study of the pathophysiology of alcohol-related brain damage // Alcohol Alcohol. - 2009. - №44. - P.171-176. - doi: 10.1093/alcalc/agn104.

10. Olney J.J., Navarro M., Thiele T.E. The role of orexin signaling in the ventral tegmental area and central amygdala in modulating binge-like ethanol drinking behavior // *Alcohol Clin. Exp Res.* – 2017. – Vol. 41(3). – P.551-561. – doi: 10.1111/acer.13336.
11. Rashidy-Pour A., Moradi M., Fatahi Z., Haghparast A., Haghparast A. Role of intra-hippocampal orexin 1 and orexin 2 receptors in conditioned place preference induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus // *Behav. Brain Res.* – 2015. – Vol. 15. – P.106-111. – doi: 10.1016/j.bbr.2014.10.051.
12. Sharf R., Sarhan M., DiLeone R.J. Role of orexin/hypocretin in dependence and addiction // *Brain Res.* – 2010. – Vol.1314. – P. 130. – doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.028.
13. Xia J., Chen X., Song C., Ye J., Yu Z., Hu Z. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin A through the inhibition of potassium currents // *J. Neurosci. Res.* – 2005. –Vol.82. – P.729–736. – doi.org/10.1002/jnr.20667.
14. Yan J., He C.J.X., Zhang D., Hu Z.A. Orexin-A excites pyramidal neurons in layer 2/3 of the rat prefrontal cortex // *Neurosci. Lett.* – 2012. – Vol. 520(1). – P. 92-97. – doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.038.
15. Triverdi P. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain / P. Triverdi, H. Yu, D.J. MacNeil et al. // *FEBS Lett.* – 1998. – Vol.438. – P.71–75.