

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ мРНК ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ И ДОФАМИН-ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА В МЕЗОЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ

© 2019 г. П. К. Анохин¹, *, Е. В. Разумкина¹, И. Ю. Шамакина¹

¹Национальный научный центр наркологии – филиал ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского” Минздрава России, Москва, Россия

Поступила в редакцию 20.03.2018 г.

После доработки 11.05.2018 г.

Принята к публикации 04.06.2018 г.

Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор нет ясного представления о тонких механизмах дисфункции дофаминовой системы мозга при формировании алкогольной зависимости. В настоящей работе изучали экспрессию генов, кодирующих ключевой фермент синтеза дофамина тирозингидроксилазу (*TH*), дофамин-транспортный белок (*DAT*), дофаминовый рецептор второго подтипа (*DRD2*) в среднем мозге и дофаминовые рецепторы первого и второго подтипов (*DRD1* и *DRD2*) в стриатуме крыс, потреблявших алкоголь с 60-го по 120 дни жизни в режиме “свободного выбора”. Наиболее выраженные изменения – снижение экспрессии мРНК *DRD1*, *DRD2* в стриатуме, *DAT* и *TH* в среднем мозге наблюдались у животных с растущим во времени предпочтением алкоголя по сравнению с группой крыс, контролирующей потребление на постоянно низком уровне. У животных с исходно высокими стабильными показателями предпочтения алкоголя обнаружено снижение относительного уровня экспрессии мРНК *DRD1* и *DRD2* в стриатуме на фоне отсутствия различий в экспрессии мРНК *DAT* и *TH* в среднем мозге. Уровень экспрессии мРНК *DRD2* в среднем мозге не различался во всех исследуемых группах. Эти данные позволяют предполагать, что изменения экспрессии мРНК *DRD1* и *DRD2* в стриатуме не зависят от изначального предпочтения алкоголя и определяются уровнем алкогольной интоксикации, в то время как снижение уровня мРНК *TH* и *DAT* в среднем мозге, по-видимому, может представлять один из механизмов нарушения контроля над потреблением.

Ключевые слова: алкоголь, дофамин, средний мозг, стриатум, экспрессия генов, мРНК

DOI: 10.1134/S1027813319010035

ВВЕДЕНИЕ

Одна из ведущих на сегодняшний день гипотез связывает высокий риск злоупотребления алкоголем и формирования алкогольной зависимости с функциональной недостаточностью мезолимбической дофаминовой системы [1, 2]. Однако, несмотря на многочисленные исследования в этой области, механизмы регуляции функций дофаминовой системы алкоголем до сих пор до конца не изучены.

В настоящее время в мозге млекопитающих выделяют четыре дофаминергические системы – нигростриатную, мезолимбическую, мезокортикальную и тубероинфундибулярную. Тела дофаминовых нейронов, образующих нигростриатный путь (A9), локализованы в черной субстанции

среднего мозга, мезолимбический и мезокортикальный (A10) – в вентральной покрышке среднего мозга, тубероинфундибулярный (A12, A14) – в аркуатном ядре гипоталамуса. Эти нейроны вовлечены в обеспечение целого ряда жизненно-важных функций, включая движение, пищевое поведение, сон, аффективное поведение, внимание, обучение и память [3–7]. Нарушение функций дофаминовой мезолимбической системы в настоящее время считают одним из ключевых факторов предрасположенности к формированию зависимости от психоактивных веществ [1, 8].

Многочратно показано, что острое введение алкоголя вызывает освобождение дофамина нейронами вентральной покрышки среднего мозга и активацию постсинаптических дофаминовых рецепторов стриатума [9]. Вместе с тем, изменения дофаминовой нейротрансмиссии в этих структурах при хроническом действии алкоголя и их роль

* Адресат для корреспонденции: 119002 Россия, Москва, М. Могильцевский пер., д. 3; тел.: +7 (499) 241-37-82; e-mail: petranokhin@mail.ru.

в формировании зависимости до сих пор являются предметом активной дискуссии [10, 11]. Доминирующей до сих пор является гипотеза о “гиподофаминовом” состоянии мезолимбической системы, основанная, прежде всего, на данных позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [12, 13] и исследований мозга *post mortem* [14] о снижении связывающей активности дофаминовых рецепторов стриатума больных алкоголизмом. Эти результаты были подтверждены и в экспериментальных исследованиях [15, 16].

Вместе с тем противоречивые данные существуют относительно изменений синтеза дофамина при хроническом действии алкоголя. Применение фторированного аналога L-дигидроксифенилаланина [¹⁸F]DOPA (L-6-[¹⁸F] fluoro-3,4-dihydroxyphenylalnine) – в качестве радиотрейсера при ПЭТ показало усиление синтеза дофамина в мозге больных алкоголизмом *in vivo* [17]. Используя культуру мезэнцефальных нейронов, Kawahata с соавторами (2017) показали, что увеличение экспрессии гена ключевого фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазы (*TH*, tyrosine hydroxylase) наблюдается после 48, но не 168 часов экспозиции с этанолом [18]. Вместе с тем, хроническое потребление крысами алкоголя в течение 1 г. приводило к снижению содержания фермента в мезолимбических нейронах и дофамина в вентральном стриатуме [19]. По-видимому, низкий уровень экспрессии *TH* является результатом действия алкоголя и не отражает врожденных особенностей предпочитающих алкоголь животных. Было показано, что мыши инбредных линий с высоким (C57BL/6J) и низким (DBA/2J) уровнем потребления алкоголя не отличаются фоновыми показателями активности этого фермента и синтеза дофамина [20].

Ключевую роль в работе мезолимбической системы имеет дофамин-транспортный белок (*DAT*, dopamine transporter), осуществляющий обратный захват дофамина и регулирующий экстраклеточное содержание медиатора. Показано снижение доступности *DAT* в стриатуме больных алкоголизмом как в исследованиях *in vivo* [17], так и *post mortem* [11]. Однако этим данным противостоят результаты экспериментальных исследований, показавших увеличение эффективности *DAT* в результате хронического действия алкоголя [21, 22].

Наибольшие разногласия касаются изменений активности дофаминовой системы в период отмены алкоголя. Долгое время гипотеза о дофамин-дефицитном состоянии в период отмены, как ключевом факторе крэвлинга и срыва в период ремиссии была общепринятой [23]. Мета-анализ литературных данных, проведенный Hirth с соавторами (2016), позволил получить более сложную картину изменений: снижение уровня

дофамина в стриатуме зависимых от алкоголя животных на ранних стадиях отмены с его последующим увеличением [11]. Собственные исследования авторов показали, что на 21-й день отмены алкоголя в стриатуме крыс наблюдается снижение количества мест специфического связывания для лигандов *DRD1* (dopamine receptor type 1) и *DAT*, учитывая свойства которых, авторы делают вывод о “гипердофаминовом” состоянии мезолимбической системы в период продолжительной отмены [11]. Гипотеза авторов была подтверждена в экспериментах на крысах с использованием микродиализа *in vivo*, показавших увеличение уровня экстраклеточного дофамина в стриатуме на 21-й день абстинентного периода [11]. Пытаясь объяснить снижение плотности *DRD1* у больных алкоголизмом и алкоголь-зависимых животных в период отмены, авторы предполагают, что хроническая стимуляция *DRD1* дофамином при действии алкоголя приводит к интернализации и последующей деградации рецепторов. Такое предположение основано на известном эффекте хронического введения агонистов дофаминовых рецепторов [24]. Кроме того, экспрессия постсинаптических *DRD1*, как показано, зависит от уровня экспрессии *DAT* и снижена у нокаутных мышей *DAT-KO* и крыс *Slc6a3_N157K* с мутацией гена *DAT* [25]. У крыс линии *Slc6a3_N157K* вследствие точечной мутации в 3-м экзоне гена *DAT* (замена T/G в позиции 471) аминокислота аспарагин в 157 позиции заменена на лизин. Как показали исследования, такой дофамин-транспортный белок теряет свои функции из-за нарушенной способности встраиваться в мембрану клетки [26], что приводит, в свою очередь, к высокому содержанию экстраклеточного дофамина в стриатуме. Поведенческие эксперименты показывают, что у алкоголь-зависимых крыс в период отмены повышена двигательная активность и стресс-реактивность [27], что типично для поведения крыс *Slc6a3_N157K* [26]. Интересно, что для мутантных крыс помимо гиперактивности были характерны состояние ангедонии, неспособность ассоциировать условный сигнал с аверсивным воздействием (“conditioned fear response”), нарушение когнитивных функций и социальных форм поведения, высокие показатели потребления алкоголя [26], т.е. признаки, наблюдающиеся у животных с алкогольной зависимостью. Таким образом, общая картина изменений дофаминовой нейротрансмиссии представляется как динамическая смена “гипердофаминового” состояния в период потребления алкоголя на “гиподофаминовое” в период острой отмены, сменяющееся на “гипердофаминовое” на более поздних сроках абстиненции.

Механизмы, лежащие в основе этих состояний и их смены, до сих пор до конца не изучены. В частности, не ясно, связаны ли описанные нарушения функций дофаминовых рецепторов и до-

фамин-транспортного белка с изменением регуляции экспрессии кодирующих их генов или с изменениями на посттранскрипционном уровне.

К сожалению, в литературе крайне мало работ, посвященных анализу экспрессии мРНК в мозге животных, находящихся в режиме “добровольного” потребления алкоголя. В большинстве работ используются различные экспериментальные модели принудительной алкоголизации животных, включая инъекционный и ингаляционный методы [27, 28]. При этом значительная часть исследований на грызунах посвящена анализу изменений мРНК в корковых отделах мозга [28]. Интересные данные получены при использовании модели “свободный выбор” у мышей для оценки изменений экспрессии кортикотропин-релизинг-фактора и его рецептора в миндалине [29]. Заслуживают безусловного внимания последние работы шведских ученых [30]. Felmann с соавторами (2018) использовали модель “свободный выбор” (20% раствор этанола/вода) в прерывистом (intermittent) режиме для анализа экспрессии *DRD2* в стриатуме крыс и показали снижение уровня мРНК одной из изоформ *DRD2* (*DRD2 long*), по-видимому, не связанное с метилированием промоторного участка гена [30]. Вместе с тем до последнего времени не было проведено сравнительного анализа изменений мРНК ключевых генов дофаминовой системы в среднем мозге и стриатуме животных, различающихся своим аддиктивным поведением в моделях добровольного потребления алкоголя. Однако именно эти области мозга представляют собой центральное звено нейронального контура, вовлеченного в механизмы формирования феномена зависимости [1]. В связи с этим задачей настоящего исследования было выяснение различий в уровне экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой системы в вентральных областях среднего мозга и стриатума крыс, длительно потреблявших алкоголь в режиме “свободного выбора” и отличавшихся по изначальному его предпочтению и динамике потребления во времени. Исследование взаимосвязи уровня экспрессии генов дофаминовой системы и мотивацией к потреблению этанола представляется нам наиболее актуальной и не решенной на сегодняшний день задачей.

Использование модели добровольного потребления алкоголя (“свободный выбор”) в данном исследовании связано с задачей поставить животных в изначально равные условия и, таким образом, максимально приблизить наш эксперимент к картине потребления алкоголя у человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на крысах-самцах Wistar (питомник лабораторных животных “Столбовая”) в соответствии с требованиями

этического комитета ФГБУ “ФМИЦ ПН им. В.П. Сербского”. В период адаптации к условиям вивария животных содержали по 8 крыс в клетке (тип: Т/4В Код: 555/4), в условиях естественной освещенности при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и свободном доступе к пище и воде. В качестве пищевого рациона на всех этапах работы использовался гранулированный корм, произведенный в соответствии с нормативными документами (ГОСТ Р 50258-92).

Для выделения групп животных с различным уровнем и динамикой потребления этанола во времени использовали экспериментальную модель “свободный выбор”. Для этого в возрасте 60 дней (PND60) животные были помещены в индивидуальные клетки ($460 \times 300 \times 160$ мм) в условия “свободного выбора” между 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 и уровня предпочтения в % по отношению к общей массе потребляемой жидкости. Отдельная серия экспериментов была проведена на группе интактных (неалкоголизованных) животных ($n = 10$) для анализа региональной специфичности экспрессии мРНК изучаемых генов. В возрасте 120 дней животных декапитировали. Выделяли вентральные области среднего мозга (далее – средний мозг) и вентральные области стриатума (далее – стриатум). Выделенные структуры мозга хранили при -70°C .

Относительный уровень транскриптов изучаемых генов в мозге 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 с помощью набора “Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas) согласно инструкции производителя. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ75 (BioRad, Германия). Для нормализации данных в качестве референсного был выбран ген β -актина (*ACTB*). При проведении ПЦР в реальном времени использовались опубликованные последовательности олигонуклеотидных праймеров (ДНК-синтез, Россия), табл. 1 [31–34].

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0.4 мкМ и 5 мкл $5\times$ реак-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров

Гены	Праймеры		Ссылка
	прямой	обратный	
<i>TH</i>	5'-tcggaagctgattgcagaga-3'	5'-ttccgctgtgtattccacatg-3'	[31]
<i>DAT</i>	5'-aatgctccgtgggaccaatg-3'	5'-caataacctgaagagcagg-3'	[32]
<i>DRD1</i>	5'-cttcgatgtgtttgtgtgttt-3'	5'-tcttcttcttcaggctcctcag-3'	[33]
<i>DRD2</i>	5'-cttgatagtcagccttctgtg-3'	5'-agggcacgtagaatgagacaat-3'	[33]
<i>ACTB</i>	5'-cactgccgcactcttct-3'	5'-aacgcctcattgccgatagtg-3'	[34]

ционной смеси qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия). В качестве отрицательного контроля служили пробы, содержащие вместо кДНК соответствующий объем воды. Программа для амплификации включала: 95°C – 3 мин; 50 циклов: 95°C, 15 с, 60°C, 15 с, 72°C, 30 с с последующим анализом кривых плавления полученных продуктов ПЦР. Измерения проводили в 3 параллельных образцах. Для наблюдения за ходом реакции и регистрации данных использовали компьютерную программу “Orticon Monitor 3.1”. Расчет относительной экспрессии проводили на основании сравнительной оценки величин C_t (threshold cycle), получаемых после проведения ПЦР реакции. Для сравнения уровней экспрессии интересующих генов в группах использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [35]. В качестве группы сравнения использовалась группа животных с постоянно низким уровнем потребления алоголя. Контроль целостности выделенной РНК и специфичности полученного в результате ОТ-ПЦР продукта осуществляли при помощи электрофореза в 2% агарозном геле на $1 \times$ ТАЕ буфере. Для визуализации результатов использовали трансиллюминатор (UVC Inc., USA) и систему гель-документирования (Gel Imager-2, Helicon, Россия).

В статье представлены усредненные данные по двум независимым экспериментам. 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 \pm ошибка среднего. Для проверки достоверности различий в потреблении этанола был использован дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений с последующим тестом Бонферрони в качестве post hoc анализа. Для оценки различий уровня мРНК между структурами мозга у интактных животных использовали t -тест Стьюдента. Для оценки разли-

чий уровня мРНК между группами животных с разной динамикой потребления алкоголя использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим тестом Бонферрони в качестве post hoc анализа. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 различными начальными показателями предпочтения алкоголя, динамикой потребления этанола во времени и финальными объемами среднесуточного потребления этанола. В табл. 2 представлен средний уровень потребления (г/кг/сут) и предпочтения (%) этанола в каждой группе на первой и последней нед. тестирования. В группе А “контролирующих” потребление животных показатели предпочтения были низкими и стабильными на всем протяжении эксперимента.

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. 2). 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 [36].

Задачей следующего этапа работы было выяснение различий между исследуемыми группами животных в уровнях экспрессии мРНК *TH*, *DAT*, *DRD1* и *DRD2*. Для обоснования выбора областей мозга для изучения экспрессии изучаемых генов было проведено предварительное изучение региональной специфичности мРНК *TH*, *DAT*, *DRD1*

Таблица 2. Показатели потребления и предпочтения алкоголя крысами в экспериментальной модели “свободный выбор” на первой и последней неделе тестирования

Группа	Потребление алкоголя, г/кг/сутки		Предпочтение алкоголя, %	
	первая неделя (PND 60–67)	последняя неделя (PND 113–120)	первая неделя (PND 60–67)	последняя неделя (PND 113–120)
A (n = 18)	2.8 ± 0.4	3.2 ± 0.55	17.0 ± 2.0	20.0 ± 2.0
B (n = 16)	3.0 ± 0.32	7.8 ± 0.8 **	20.4 ± 3.0	39.0 ± 2.0 **
C (n = 15)	8.5 ± 0.65*#	9.8 ± 0.71*	61.0 ± 6.0 **	69.0 ± 5.0*#

n – Количество животных в группе. * $p < 0.05$ по отношению к животным группы А; # $p < 0.05$ по отношению к животным групп А и В; ^x $p < 0.05$ по отношению к первой неделе тестирования. (ANOVA для повторных измерений).

и *DRD2* в среднем мозге и стриатуме интактных крыс соответствующего возраста (120 дней). Все выборки подчинялись нормальному распределению. Данные представлены на рис. 1. Полученные результаты показывают, что мРНК *TH* и *DAT* определяется в среднем мозге, *DRD1* – в стриатуме, а *DRD2* – в равных пропорциях в обеих структурах мозга (рис. 1). Эти данные, а также данные литературы о региональной специфичности этих белков в мозге [37, 38] послужили основанием для дальнейшего изучения экспрессии мРНК *TH*, *DAT* в среднем мозге, *DRD1* – в стриатуме, а *DRD2* – в обеих областях мозга экспериментальных животных.

Показано, что у животных с выраженной динамикой роста потребления алкоголя в ходе эксперимента (группа В) достоверно снижен уровень мРНК *TH* и *DAT* в среднем мозге по сравнению с животными группы А, контролируемыми потреблением на постоянно низком уровне, и группы С с постоянно высокими показателями предпочтения (*TH*: однофакторный ANOVA $p = 0.031$ $F = 4.115$; тест Бонферрони $p < 0.05$. *DAT*: однофакторный ANOVA $p = 0.018$ $F = 4.902$; тест Бонферрони $p < 0.05$) (рис. 2). При этом уровень мРНК *DRD2* (дофаминовых D2-ауторецепторов) не различался у животных трех групп (однофакторный ANOVA $p = 0.615$ $F = 0.499$).

В работе определяли уровень экспрессии мРНК *TH* и *DAT* в дофамин-синтезирующих нейронах среднего мозга, но не в области-мишени стриатуме. На протяжении десятилетий господствовало представление, что мРНК локализована исключительно в цитоплазме тела нейрона [39]. Однако в последние годы появляется все больше сообщений о возможности аксонального транспорта мРНК и ее локализации в пресинаптическом окончании нейрона [40, 41]. Такие данные получены для белков цитоскелета, рибосомальных белков, факторов трансляции и некоторых ферментов [40]. Возможность аксонального транспорта показана

для мРНК тирозингидроксилазы [42, 43], тогда как информация о возможной локализации мРНК *DAT* и дофаминовых рецепторов в пресинаптических окончаниях нейронов в настоящее время в

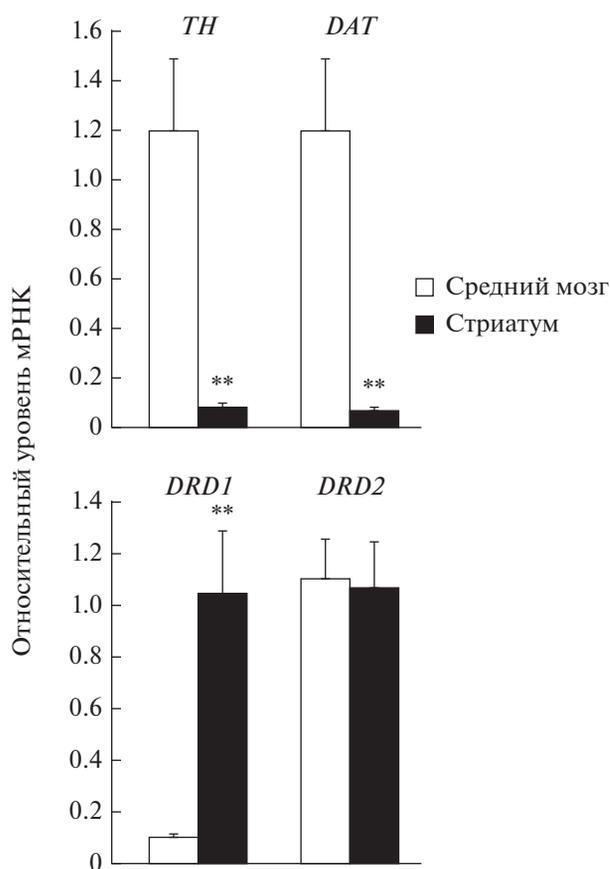


Рис. 1. Относительные показатели экспрессии мРНК *TH*, *DAT*, *DRD1* и *DRD2* в среднем мозге и стриатуме интактных крыс. ** $p < 0.01$ (уровень мРНК в стриатуме относительно уровня мРНК в среднем мозге), *t*-тест Стьюдента.

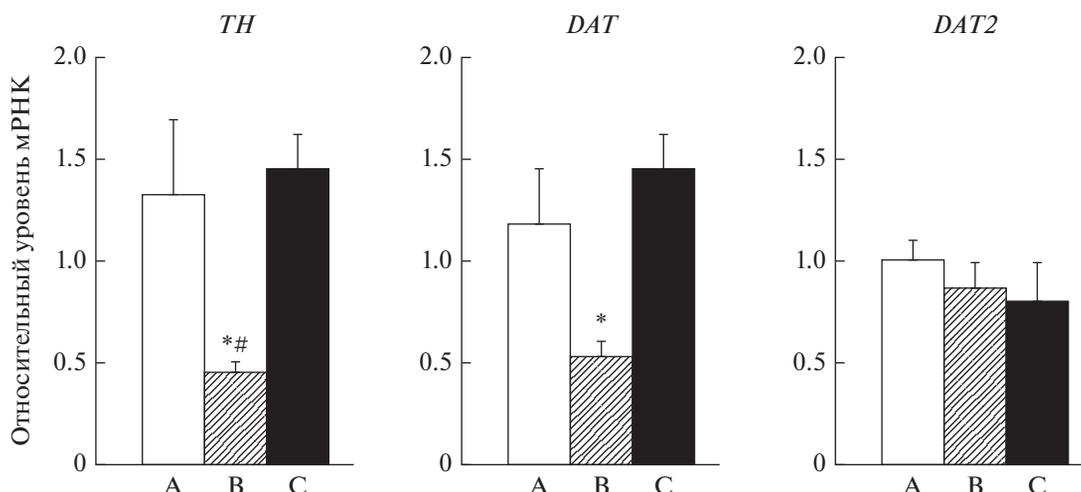


Рис. 2. Относительные показатели экспрессии мРНК *TH*, *DAT* и *DRD2* в среднем мозге крыс с различным уровнем потребления алкоголя. А – животные с постоянно низким уровнем потребления алкоголя ($n = 18$), В – животные, увеличившие потребление ($n = 16$), С – животные с постоянно высоким уровнем потребления ($n = 15$). * $p < 0.05$ (относительно группы А), # $p < 0.05$ (относительно группы С, однофакторный ANOVA с post hoc тестом Бонферрони).

литературе отсутствует. В ряде работ было установлено, что мРНК *TH* обнаруживается в незначительных количествах в областях-мишенях дофамин- и норадреналин-синтезирующих нейронов мозга (коре, стриатуме и мозжечке) [42] и окончаниях аксонов симпатических нейронов [43]. Несмотря на то, что содержание мРНК *TH* в пресинаптических окончаниях на два порядка

ниже, чем в телах нейронов [43], авторы предполагают, что в определенных условиях локальный синтез катехоламинов в пресинаптической терминали может играть важную роль в процессе регуляции активности нейрона [43]. Хотя в настоящей работе были изучены количественные изменения основного пула мРНК *TH*, локализованной в среднем мозге, т.е. в телах дофамин-синтезирующих нейронов, исследование уровня “пресинаптической” мРНК в моделях экспериментальной алкогольной зависимости в перспективе представляется интересной и важной задачей.

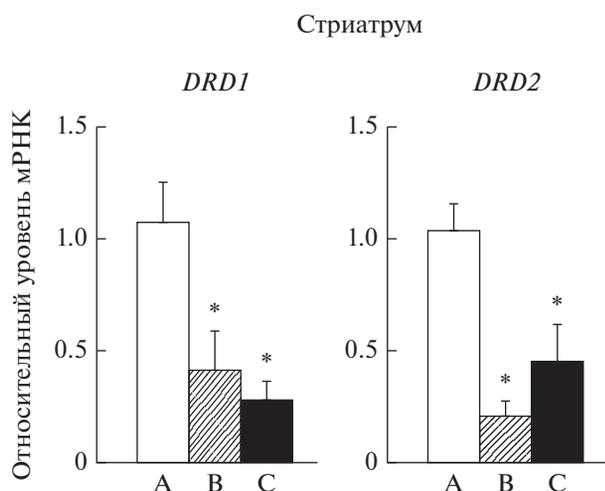


Рис. 3. Относительные показатели экспрессии мРНК *DRD1* и *DRD2* в стриатуме крыс с различным уровнем потребления алкоголя. А – животные с постоянно низким уровнем потребления алкоголя ($n = 18$), В – животные, увеличившие потребление ($n = 16$), С – животные с постоянно высоким уровнем потребления ($n = 15$). * $p < 0.05$ (относительно группы А, однофакторный ANOVA с post hoc тестом Бонферрони).

Выраженные изменения содержания мРНК у животных с финально высоким предпочтением алкоголя были обнаружены в стриатуме для дофаминовых рецепторов (рис. 3). Уровень мРНК *DRD1* был достоверно снижен в 3.7 раза в группах В и С по сравнению с группой А (однофакторный ANOVA $p = 0.0015$ $F = 9.7$; тест Бонферрони $p < 0.05$), а *DRD2* – в 5.5 раз в группе В и в 2.4 раза в группе С по сравнению с группой А (однофакторный ANOVA $p < 0.001$ $F = 14.5$; тест Бонферрони $p < 0.05$) (рис. 2).

Клиническими и экспериментальными исследованиями показано снижение эффективности дофаминовой нейротрансмиссии в результате длительного приема алкоголя [44]. Было установлено снижение плотности D2-рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом и высказана гипотеза, что именно этот эффект алкоголя лежит в основе дофаминовой дисфункции [45].

Стриатум представляет собой сложную структуру переднего мозга, на нейронах которого происходит конвергенция мотивационных импульсов

[46], и важную роль в обеспечении этих функций играют *DRD1* и *DRD2*. Так как *DRD2* локализованы на телах нейронов стриатума и на пресинаптических окончаниях нейронов среднего мозга [47], при использовании методов изучения характеристик связывания рецепторов в стриатуме сложно выявить нарушения этих двух принципиально различных функционально пулов рецепторов. Поэтому анализ мРНК в среднем мозге и областях-мишенях (в данном случае, стриатуме) позволяет, на наш взгляд, с осторожностью предполагать, что изменения экспрессии мРНК *DRD2* в стриатуме отражают нарушения постсинаптического звена, а уровень мРНК в среднем мозге — D2-ауторецепторов, локализованных как на телах дофамин-синтезирующих нейронов, так и на их пресинаптических окончаниях, проецирующихся в области-мишени.

Полученные в работе данные показывают, что у животных с высоким финальным уровнем потребления алкоголя независимо от показателей их предпочтения в начале эксперимента снижен уровень мРНК *DRD1* и *DRD2* в стриатуме, т.е. на уровне регуляции транскрипции этих генов нарушения затрагивают, в первую очередь, постсинаптическое звено. Эти изменения могут отражать, с одной стороны, снижение подкрепляющего эффекта алкоголя (за счет снижения эффективности D2-рецепторного звена) и, соответственно, рост потребления для достижения эффекта. С другой стороны, снижение уровня экспрессии мРНК *DRD1* может приводить к ослаблению сдерживающего механизма — отрицательной обратной связи стриатум—средний мозг. Известно, что активация *DRD1* приводит к индукции синтеза динорфина в популяции нейронов стриатума, осуществляющих регуляцию активности дофаминовых нейронов и освобождения дофамина [48]. Этот эффект опосредован активацией динорфинном каппа-опиоидных рецепторов, локализованных на телах и пресинаптических окончаниях нейронов вентральной покрышки среднего мозга и проявляется в виде состояния дисфории и ангедонии [49, 50]. Это регуляторное звено представляется крайне важным в осуществлении контроля потребления алкоголя и других психоактивных веществ, а также различных форм поведения, связанных с активацией “системы награды” [50].

Важная и до сих пор не решенная проблема — это выяснение причинно-следственной связи между нарушением дофаминовой нейротрансмиссии и потреблением алкоголя. До сих пор нет ясного понимания — являются ли обнаруживаемые нарушения причиной высокого предпочтения/роста предпочтения алкоголя или его следствием. Результаты настоящего исследования также не могут дать однозначный ответ на этот вопрос. Вместе с тем, сравнение показателей экспрессии мРНК в мозге животных с изначально

низким, но растущим в течение эксперимента (группа В), и изначально и постоянно высоким (группа С) уровнем потребления алкоголя показывает, что наиболее выраженные изменения наблюдаются в группе В. У животных этой группы снижены показатели экспрессии мРНК как постсинаптических дофаминовых рецепторов в стриатуме, так и экспрессии мРНК ключевого фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы и дофамин-транспортного белка в среднем мозге. Полученные данные позволяют с осторожностью предполагать, что изменения на постсинаптическом уровне у этих животных не зависят от начального предпочтения алкоголя или динамики его роста и определяются уровнем алкогольной интоксикации. В то же время снижение уровня мРНК тирозингидроксилазы и DAT, по-видимому, не зависит от финальных объемов потребления алкоголя и может представлять один из механизмов нарушения контроля над потреблением. Однако эти предположения требуют дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-10190).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина И.П., Шамакина И.Ю. // Руководство по наркологии (под редакцией Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой). М.: ГЭОТАР-Медиа. 2016. С. 96–115.
2. Blum K., Thanos P.K., Oscar-Berman M., Febo M., Baron D., Badgaiyan R.D., Gardner E., Demetrovics Z., Fahlke C., Haberstick B.C., Dushaj K., Gold M.S. // J. of Reward Deficiency Syndrome. 2015. V. 1. № 3. P. 95–104.
3. Tye K.M., Mirzabekov J.J., Warden M.R., Ferenczi E.A., Tsai H.C., Finkelstein J., Kim S.Y., Adhikari A., Thompson K.R., Andalman A.S., Gunaydin L.A., Witten I.B., Deisseroth K. // Nature. 2013. V. 493. P. 537–541.
4. Lammel S., Tye K.M., Warden M.R. // Genes, Brain and Behavior. 2014. V. 13. P. 38–51.
5. Ikemoto S., Yang C., Tan A. // Behavioural Brain Research. 2015. V. 290. P. 17–31.
6. Ashok A.H., Marques T.R., Jauhar S., Nour M.M., Goodwin G.M., Young A.H., Howes O.D. // Molecular Psychiatry. 2017. V. 22. № 5. P. 666–679.
7. Belujon P., Grace A.A. // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2017. V. 20. № 12. P. 1036–1046.
8. Blum K., Thanos P.K., Wang G.J., Febo M., Demetrovics Z., Modestino E.J., Braverman E.R., Baron D., Badgaiyan R.D., Gold M.S. // Curr. Pharm. Des. 2018. V. 23. № 39. P. 6050–6061.
9. Most D., Ferguson L., Harris R.A. // Handbook of Clinical Neurology. 2014. V. 125. P. 89–111.

10. *Morganstern I., Tejani-Butt S.* // Neurochemical research. 2010. V. 35. № 11. P. 1708–1715.
11. *Hirth N., Meinhardt M.W., Noori H.R., Salgado H., Torres-Ramirez J., Uhrig S., Broccoli L., Vengeliene V., Roßmanith M., Perreau-Lenz S., Köhr G., Sommer W.H., Spanagel R., Hansson A.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 11. P. 3024–3029.
12. *Koob G.F., Volkow N.D.* // Neuropsychopharmacology. 2010. V. 35. № 1. P. 217–238.
13. *Diana M.* // Front. Psychiatry. 2011. V. 2. P. 64.
14. *Tupala E., Tiihonen J.* // Brain Res. 2005. V. 1031. № 1. P. 20–29.
15. *Bice P.J., Liang T., Zhang L., Strother W.N., Carr L.G.* // Mamm. Genome. 2008. V. 19. P. 69–76.
16. *Spiga S., Talani G., Mulas G., Licheri V., Fois G.R., Muggironi G., Masala N., Cannizzaro C., Biggio G., Sanna E., Diana M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 35. P. E3745–E3754.
17. *Tiihonen J., Vilkmann H., Räsänen P., Ryyänen O.P., Hakko H., Bergman J., Hämäläinen T., Laakso A., Haaparanta-Solin M., Solin O., Kuoppamäki M., Syvälahti E., Hietala J.* // Mol. Psychiatry. 1998. V. 3. № 2. P. 156–161.
18. *Kawahata I., Evelyn G.R., Huinan X., Ohtaku S., Tomioka Y., Yamakuni T.* // Neuro. Endocrinol. Lett. 2017. V. 38. № 1. P. 43–49.
19. *Rothblatt D.S., Rubin E., Schneider J.S.* // Neurosci. Lett. 2001. V. 300. № 2. P. 63–66.
20. *Siciliano C.A., Locke J.L., Mathews T.A., Lopez M.F., Becker H.C., Jones S.R.* // Alcohol. 2017. V. 58. P. 25–32.
21. *Carroll M.R., Rodd Z.A., Murphy J.M., Simon J.R.* // Alcohol. 2006. V. 40. № 2. P. 103–109.
22. *Jiao X., Paré W.P., Tejani-Butt S.M.* // Brain Res. 2006. V. 1073–1074. P. 175–182.
23. *Weiss F., Parsons L.H., Schulteis G., Hyttiä P., Lorang M.T., Bloom F.E., Koob G.F.* // J. Neurosci. 1996. V. 16. № 10. P. 3474–3485.
24. *Cooper J., Bloom F., Roth R.* The Biochemical Basis of Neuropharmacology (Oxford Univ. Press, Oxford, UK), 2003. 8th Ed.
25. *Dumartin B., Jaber M., Gonon F., Caron M.G., Giros B., Bloch B.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 4. P. 1879–1884.
26. *Vengeliene V., Bernalov A., Roßmanith M., Horschitz S., Berger S., Relo A.L., Noori H.R., Schneider P., Enkel T., Bartsch D., Schneider M., Behl B., Hansson A.C., Schloss P., Spanagel R.* // Disease Models & Mechanisms. 2017. V. 10. № 4. P. 451–461.
27. *Tapocik J.D., Solomon M., Flanigan M., Meinhardt M., Barbier E., Schank J.R., Schwandt M., Sommer W.H., Heilig M.* // The Pharmacogenomics j. 2013. V. 13. № 3. P. 286–296.
28. *Heilig M., Barbier E., Johnstone A.L., Tapocik, J., Meinhardt, M.W., Pfarr, S., Wahlestedt, C., Sommer, W.H.* // Genes, Brain, and Behavior. 2017. V. 16. № 1. P. 86–100.
29. *Sommer W.H., Rimondini R., Hansson A.C., Hipskind P.A., Gehlert D.R., Barr C.S., Heilig M.A.* // Biol. Psychiatry. 2008. V. 63. № 2. P. 139–145.
30. *Feltman K., Borroto-Escuela D.O., Ruegg J., Pinton L., de Oliveira Sergio T., Narvaez M., Jimenez-Beristain A., Ekstr T.J., Fuxe K., Steensland P.* // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2018. V. 42. № 2. P. 338–351.
31. *Chen X., Xu L., Radcliffe P., Sun B., Tank A.W.* // Molecular Pharmacology. 2008. V. 73. № 6. P. 1816–1828.
32. *Galleuillos D., Fuentealba J.A., Gomez L.M., Saver M., Gomez A., Nash K., Burger C., Gysling K., Andreas M.A.J.* // J. Neurochem. 2010. V. 114. P. 1158–1167.
33. *Zhang Y., Zhu X., Bai M., Zhang L., Xue L., Yi J.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 7. P. e69934.
34. *Olszewski P.K., Grace M.K., Fard S.S., Le Grevès M., Klockars A., Massi M., Schiöth H.B., Levine A.S.* // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2010. V. 299. P. R655–R663.
35. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
36. *Green A.S., Grahame N.J.* // Alcohol (Fayetteville, NY). 2008. V. 42. № 1. P. 1–11.
37. *Björklund A., Dunnett S.B.* // Trends Neurosci. 2007. V. 30. № 5. P. 194–202.
38. *Smith Y., Villalba R.* // Mov Disord. 2008. Suppl 3. P. S534–S547.
39. *Scott S.S., Gervasi N.M., Kaplan B.B.* // Trends Cell. Mol. Biol. 2015. V. 10. P. 1–36.
40. *Holt C.E., Schuman E.M.* // Neuron. 2013. V. 80. № 3. P. 648–657.
41. *Crispino M., Chun J.T., Cefalillo C., Perrone Capano C., Giuditta A.* // Dev. Neurobiol. 2014. V. 74. № 3. P. 279–291.
42. *Melia K.R., Trembleau A., Oddi R., Sanna P.P., Bloom F.E.* // Exp. Neurol. 1994. V. 130. № 2. P. 394–406.
43. *Gervasi N.M., Scott S.S., Aschrafi A., Gale J., Vohra S.N., MacGibeny M.A., Kaplan B.B.* // RNA. 2016. V. 22. № 6. P. 883–895.
44. *Nutt D.J., Lingford-Hughes A., Erritzoe D., Stokes P.R.* // Nat. Rev. Neurosci. 2015. V. 16. № 5. P. 305–312.
45. *Volkow N.D., Wang G.J., Telang F., Fowler J.S., Logan J., Jayne M., Ma Y., Pradhan K., Wong C.* // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 46. P. 12700–12706.
46. *Beck A., Schlagenhaut F., Wüstenberg T., Hein J., Kienast T., Kahnt T., Schmack K., Hägele C., Knutson B., Heinz A., Wrase J.* // Biol. Psychiatry. 2009. V. 66. № 8. P. 734–742.
47. *Beaulieu J.-M. and Gainetdinov R.R.* // Pharmacological Reviews. 2011. V. 63. № 1. P. 182–217.
48. *Chefer V.I., Bäckman C.M., Gigante E.D., Shippenberg T.S.* // Neuropsychopharmacology. 2013. V. 38. № 13. P. 2623–2631.
49. *Lalanne L., Ayranci G., Kieffer B.L., Lutz P.-E.* // Frontiers in Psychiatry. 2014. V. 5. P. 170.
50. *Шагуахметов Ф.Ш., Проскуракова Т.В., Шамакина И.Ю.* // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 4. С. 285–294.

A Comparison of mRNA Expression of Dopamine Receptors, Tyrosine Hydroxylase, and Dopamine Transporter in the Mesolimbic System of Rats with Different Level of Alcohol Consumption

P. K. Anokhin^a, E. V. Razumkina^a, and I. Yu. Shamakina^a

^aNational Research Center of Narcology, Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Ministry of Health, Moscow, Russia

Received March 20, 2018;

Revised May 11, 2018;

Accepted June 4, 2018

Despite numerous studies, there is still no clear idea on the fine mechanisms of dysfunction of the brain dopamine system during the formation of alcohol dependence. In this work, we studied the expression of genes that encode tyrosine hydroxylase (TH), a key enzyme of dopamine synthesis, dopamine transporter (DAT), dopamine receptors of the second subtype (DRD2) in the midbrain, and dopamine receptors of the first and second subtypes (DRD1 and DRD2) in the striatum of rats who consumed alcohol from the 60th to 120th days of life in "free choice" paradigm. The most pronounced changes, a decrease in mRNA expression of DRD1 and DRD2 in the striatum, DAT, and TH in the midbrain were observed in animals with a growing preference for alcohol compared to a group of rats that controlled consumption at a constantly low level. In animals with initially stable high levels of alcohol preference, a decrease in the relative expression level of DRD1 and DRD2 mRNA in the striatum was found, while there was no difference in the expression of DAT and TH mRNA in the midbrain. The expression level of DRD2 mRNA in the midbrain did not differ in all the groups studied. These data suggest that changes in the expression of mRNA DRD1 and DRD2 in the striatum do not depend on the initial alcohol preference and are determined by the level of alcohol intoxication, while the decrease in the level of TH and DAT mRNA in the midbrain, apparently, may be one of the mechanisms of loss of control over consumption.

Keywords: alcohol, dopamine, midbrain, striatum, gene expression, mRNA.