

# НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

## ЭКСПРЕССИЯ мРНК КОРТИКОЛИБЕРИНА И ВАЗОПРЕССИНА В ГИПОТАЛАМУСЕ И МИНДАЛИНЕ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев<sup>1</sup>

Крысы-самцы линии Вистар в течение 4 дней подряд внутрибрюшинно получали в возрастающих дозах: 1) физиологический раствор (контроль; 0,1–0,2–0,4–0,8 мл/крысу), 2) фенамин (0,5–1–2–4 мг/кг); 3) фентанил (0,00625–0,0125–0,025–0,05 мг/кг), 4) этанол (0,5–1–2–4 г/кг), 5) этаминал-натрий (2,5–5–10–20 мг/кг) или 6) дексаметазон (0,5–1–2–4 мг/кг). Форсированный режим введения препаратов обеспечивает градуальную нагрузку организма препаратом и препятствует развитию толерантности. Данный способ применяется для формирования зависимости (или отдельных ее признаков) от ряда наркотических веществ. Наибольшие значения в экспрессии мРНК кортиколиберина в миндалине регистрировали после введения дексаметазона (0,46 усл. ед. в сравнении с  $\beta$ -актином) и существенно более низкие — после введения этаминал-натрия (0,07) и фентанила (0,037). В гипоталамусе повышенную экспрессию мРНК определяли после введения этаминал-натрия (0,8 усл. ед.), этанола (0,37) и фентанила (0,039). Фенамин не активировал экспрессию мРНК ни в миндалине, ни в гипоталамусе. Экспрессия мРНК вазопрессина не отмечена ни в одной группе животных. Следовательно, подкрепляющая система гипоталамуса обеспечивает однотипную реакцию на введение наркотиков, тогда как система расширенной миндалины включает элементы как собственно подкрепления, так и стресс-реактивности.

**Ключевые слова:** кортиколиберин, вазопрессин, стресс, лимбические структуры мозга, гипоталамус, миндалина, экспрессия мРНК, крысы

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами показано [2, 5, 12, 13], что центральное ядро миндалины, входящее в систему так называемой расширенной миндалины (*extended amygdala*), модулирует эффекты фармакологических средств, обладающих наркотическим потенциалом. При этом миндалина выполняет роль “побуждающего фактора” (*incentive agent*), запускающего подкрепляющие дофаминергические механизмы гипоталамуса [6, 7]. Основную иницирующую роль внутреннего стрессогенного фактора в этом случае выполняет кортиколиберин, или кортикотропин-рилизинг гормон, обладающий свойствами универсального индуктора стресс-реакции в центральной нервной системе [14, 16]. Введенный в желудочек мозга животным, кортиколиберин вызывает типичную реакцию стресса, продолжающуюся в течение 40–60 мин [6, 14]. Он также участвует в механизмах подкрепления [9, 13], памяти [8], тревожности, страха, депрессии [9], действии фармакологических агентов на эти процессы [2, 5, 9, 13]. Кортиколиберин может

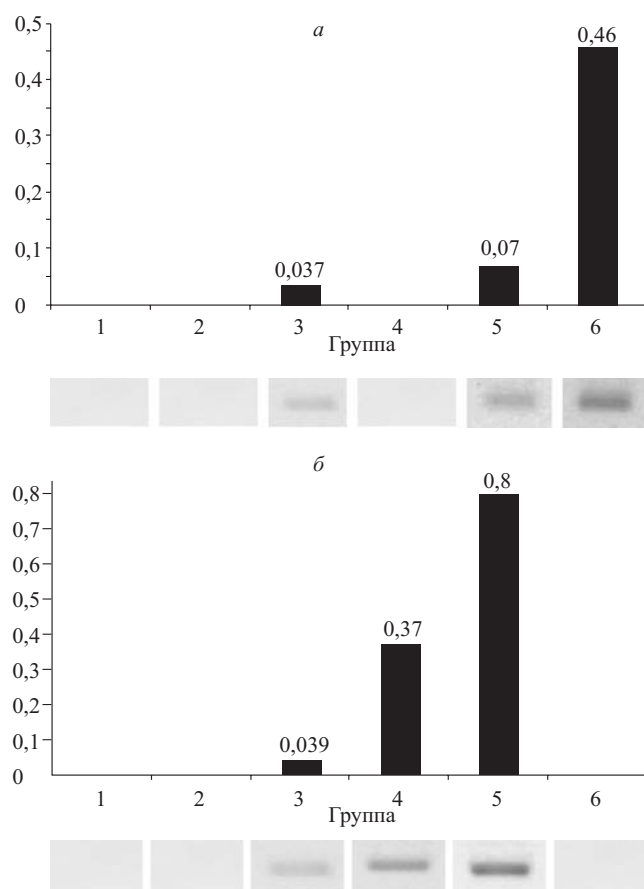
проявлять и отсроченные эффекты, если его вводить в период раннего онтогенеза [9, 10]. Как полагают большинство исследователей [12, 14, 16], эффекты кортиколиберина связаны с активацией системы стресса-антистресса, значимая роль в которой принадлежит, прежде всего, структурам лимбической системы мозга, в частности, гипоталамусу и миндалине. При этом не исключено, что и другие нейропептиды (вазопрессин, холецистокинин, субстанция Р, нейротензин) могут участвовать в данных процессах [1, 6, 12].

Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии мРНК кортиколиберина и аргинил-8-вазопрессина в гипоталамусе и миндалине крыс, которым в форсированном режиме (с увеличением доз препаратов) вводили препараты, обладающие наркотической активностью.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Выбор животных.* Опыты выполнены на 69 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животные были разделены на несколько групп, которые в течение 4 дней подряд внутрибрюшинно получали в возрастающих дозах: 1) физиологический раствор (контроль; 0,1–0,2–0,4–0,8 мл/крысу), 2) психомоторный стимулятор фенамин (0,5–1–2–4 мг/кг); 3) опиоидный анальгетик фентанил (0,00625–0,0125–0,025–0,05 мг/кг), 4) этанол (0,5–1–2–4 г/кг), 5) снотворное сред-

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, 194044, ул. Акад. Лебедева, 6; e-mail: shabanov@mail.rcom.ru



Влияние наркотиков на экспрессию мРНК кортиколиберина в миндалине (а) и гипоталамусе (б) крыс.

По оси ординат — величина экспрессии мРНК кортиколиберина (усл. ед. в сравнении с  $\beta$ -актином). Цифрами обозначены группы, получавшие: 1 — физиологический раствор (контроль), 2 — фенамин, 3 — фентанил, 4 — этанол, 5 — этаминал-натрий, 6 — дексаметазон. Под рисунками — электрофоретическая визуализация ПЦР-продуктов.

ство барбитурового ряда этаминал-натрий (2,5–5–10–20 мг/кг) или б) глюкокортикоид дексаметазон (0,5–1–2–4 мг/кг). Форсированный режим введения препаратов предусматривал повышение дозы препарата вдвое в каждый последующий день введения (всего 4 введения). Такой способ введения обеспечивает градуальную нагрузку организма препаратом и препятствует развитию толерантности. Данный способ применяется для ускоренного формирования зависимости (или отдельных ее признаков) от ряда наркотиков [1]. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при температуре  $22 \pm 2$  °С. После последнего введения веществ крыс декапи-

тировали, извлекали мозг, выделяли гипоталамус и миндалину на холоде, пробы замораживали и держали при  $-70$  °С до проведения биохимических опытов.

**Определение экспрессии мРНК.** Экспрессию мРНК кортиколиберина и аргинил-8-вазопрессина в гипоталамусе и миндалине крыс определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Тотальную мРНК выделяли в соответствии со стандартным протоколом [15] с использованием гуанидина тиоционата (“Promega”, США).

Для проведения обратной транскрипции использовали 1 мкл затравочных олиго-dT-праймеров (“Promega”, США), нуклеотидтрифосфаты до конечной концентрации 1,25 ммоль каждого (“Силекс М”, Москва), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз (“Promega”, США), 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV (“Promega”, США). Пробу добавляли из расчета 2 мкг на реакцию. Общий объем реакционной смеси доводили до 20 мкл деионизированной водой, обработанной диэтилпироксикарбонатом.

Для проведения ПЦР по 2 мкл продуктов реакции обратной транскрипции добавляли в реакционную смесь, содержащую 2,5 мкл 10-кратного буфера, нуклеотидтрифосфаты до конечной концентрации в растворе 0,8 ммоль каждого, специфический праймер (+) 25 пкмоль, специфический праймер (–) 25 пкмоль, 1 мкл Taq DNA полимеразы,  $MgCl_2$  (концентрацию подбирали для каждой пары праймеров отдельно, см. таблицу). Конечный объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. ПЦР проводили в амплификаторе фирмы “Techne” (Великобритания) при термальном профиле  $94$  °С — 1 мин; при температуре отжига — 1 мин; при температуре  $72$  °С — 1,2 мин. Температуру отжига (см. таблицу) подбирали предварительно для каждой пары праймеров отдельно.

Специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer-Master 1.0 по нуклеотидным последовательностям соответствующих мРНК и ДНК крыс, полученным из Европейского молекулярного банка данных. Последовательности праймеров и условия проведения ПЦР (концентрация ионов магния и количество циклов проведения реакции) представлены в таблице. В качестве внутреннего стандарта для оценки прохождения реакции обратной транскрипции использовали мРНК  $\beta$ -актина.

Анализ ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием для визуализации мРНК. Фотографирование гелей производили цифровым фотоаппаратом Canon (Power Shot S30) в проходящем УФ-свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция).

Денситометрический анализ электрофоретических полос проводили с помощью программы SCImage. Уровень мРНК кортиколиберина и вазопрессина нормировали относительно уровня мРНК  $\beta$ -актина. Результат представляли в виде соотношения этих величин.

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическими методами (U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, критерий парных знаков).

#### Параметры определения полимеразной цепной реакции

Показатель	Праймер	Последовательность	Температура отжига, °С	[Mg]	Число циклов	Размер фрагмента
Кортиколиберин	+	5'aggtacctcgagaaca3'	56,9	2	32	249
	–	3'actaggcgtaccacttc5'				
Аргинил-8-вазопрессин	+	5'gccacatccgacatggag3'	57,3	2	38	271
	–	3'gtcacagctctccaaa5'				
$\beta$ -Актин	+	5'gaagatcctgac-cgagcgtg3'	59	2	30	347
	–	3'gagatacggttgtgcacga5'				

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наибольшие значения в экспрессии мРНК кортиколиберина в миндалине (рисунок, а) регистрировали после введения дексаметазона (0,46 усл. ед. в сравнении с  $\beta$ -актином,  $p < 0,01$ ) и существенно более низкие значения — после введения этаминал-натрия (0,07,  $p < 0,05$ ) и фентанила (0,037). В гипоталамусе (рисунок, б) повышенную экспрессию мРНК определяли после введения этаминал-натрия (0,8 усл. ед.,  $p < 0,001$ ), этанола (0,37,  $p < 0,01$ ) и фентанила (0,039). Фенамин не активировал экспрессию мРНК ни в миндалине, ни в гипоталамусе.

Что касается вазопрессина, то при отработке условий на положительных пробах для проведения ПЦР были выбраны 30 циклов, однако при данных условиях не удалось выявить экспрессию мРНК аргинил-8-вазопрессина ни в одной группе, ни в одной структуре. Последовательно количество циклов было увеличено до 38, мРНК аргинил-8-вазопрессина была выявлена только в гипоталамусе в контрольной группе, однако это количество циклов уже не находится в экспоненциальной фазе и при электрофорезе регистрировали неспецифические изменения.

Таким образом, форсированное (в течение 4 дней в возрастающих дозах) введение фармакологических агентов, обладающих наркотической активностью, не активирует экспрессию мРНК аргинил-8-вазопрессина в гипоталамусе и миндалине мозга крыс и лишь выборочно активирует экспрессию мРНК кортиколиберина в гипоталамусе (этаминал-натрий  $\gg$  этанол  $>$  фентанил) и миндалине (дексаметазон  $\gg$  этаминал-натрий  $>$  фентанил).

Повышение экспрессии мРНК кортиколиберина в миндалине под влиянием дексаметазона вполне ожидаемо, поскольку миндалина играет более значимую роль (в сравнении с гипоталамусом) в подкрепляющих эффектах наркотиков [2, 12, 13]. Так, в исследованиях нашей лаборатории показано [2, 5, 13], что фенамин (1 мг/кг), морфин (1 мг/кг) и этаминал-натрий (5 мг/кг) в разной степени (+ 18 – 37 %) активировали реакцию самостимуляции латерального гипоталамуса у крыс. При внутривенном введении в миндалину или паравентрикулярную область гипоталамуса астрессин (1 мкг/мкл), неселективный антагонист рецепторов кортиколиберина, на 55 % и 17 % соответственно угнетал реакцию самостимуляции. Блокада экстрагипоталамических (в центральном ядре миндалины) рецепторов кортиколиберина астрессинном меняла действие разных наркотиков на реакцию самостимуляции латерального гипоталамуса. На этом фоне этаминал-натрий и в меньшей степени фенамин проявляли свой психоактивирующий эффект, а у морфина умеренный стимулирующий эффект менялся на депрессантный. Лей-энкефалин при этом вызывал стойкий депрессантный эффект, усиливая действие астрессина. Блокада гипоталамических (в паравентрикулярной об-

ласти) рецепторов кортиколиберина астрессинном в меньшей степени меняла действие наркотиков на реакцию самостимуляции латерального гипоталамуса. Психоактивирующий эффект сохранили фенамин, морфин и этаминал-натрий, а лей-энкефалин не менял депрессантного действия астрессина. Было сделано предположение, что кортиколибериновая система миндалины, по-видимому, оказывает активирующее действие на подкрепляющую систему гипоталамуса. Усиление астрессинном угнетающего действия лей-энкефалина на самостимуляцию мозга могло быть связано с временным выключением активирующего влияния центрального ядра миндалины на гипоталамус. Следовательно, блокада рецепторов кортиколиберина астрессинном в миндалине (и в значительно меньшей степени в гипоталамусе) устраняет или существенно уменьшает подкрепляющие эффекты морфина, этаминал-натрия и лей-энкефалина, но не фенамина [7, 13]. По-видимому, центральное ядро миндалины (основное звено *extended amygdala*) модулирует подкрепляющие свойства латерального гипоталамуса, возможно, за счет экстрагипоталамических кортиколиберинсодержащих нейронов.

Однако в настоящей работе показана повышенная экспрессия мРНК кортиколиберина и в гипоталамусе, и в миндалине под влиянием этаминал-натрия и фентанила, а также в гипоталамусе под влиянием этанола. Все три препарата относятся к гипноседативным наркотикам и безусловно действуют на подкрепляющие механизмы мозга сходным образом. Если в миндалине экспрессия мРНК кортиколиберина под влиянием этаминал-натрия и фентанила была незначительной (0,07 – 0,037 усл. ед. в сравнении с  $\beta$ -актином) и ее можно трактовать как относительно неспецифическую, то в гипоталамусе неспецифический характер носила экспрессия мРНК кортиколиберина под влиянием лишь фентанила (0,039 усл. ед.). Что касается этаминал-натрия и этанола, то экспрессия мРНК кортиколиберина в гипоталамусе была весьма выражена (для этаминал-натрия — 0,8 усл. ед., для этанола — 0,37 усл. ед.) и ею нельзя пренебречь. По-видимому, механизмы подкрепления гипоталамуса в меньшей степени связаны со стресс-лимитирующими системами мозга (системами кортиколиберина-АКТГ), в то время как механизмы подкрепления расширенной миндалины в большей степени зависимы от внешнего и внутреннего стресса [3, 11, 14]. Тогда становится понятным, что реакция гипоталамуса на введение наркотиков однотипна (в первую очередь наркотиков гипноседативной направленности — этаминал-натрия, фентанила, этанола), тогда как система расширенной миндалины включает элементы как собственно подкрепления, так и стресс-реактивности. В этом случае глюкокортикоид дексаметазон выполняет роль индуктора стресса и запуска подкрепляющих механизмов, не (мало) связанных с гипоталамусом.

Подобные предположения применимы и для объяснения отсутствия экспрессии мРНК аргинил-8-вазопрессина в гипоталамусе и миндалине, поскольку этот нейропептид практически не участвует в механизмах подкрепления, но играет значимую роль в мнестических процессах [6, 8]. Лимбические структуры мозга вовлекаются в эти процессы, но только как модуляторы эмоциональной составляющей памяти [4, 6].

## ВЫВОДЫ

1. Психоактивные препараты, обладающие наркотической активностью, избирательно увеличивают экспрессию мРНК кортиколиберина в гипоталамусе и миндалине.

2. В миндалине наибольшие значения экспрессии мРНК кортиколиберина регистрируются после введения дексаметазона, а в гипоталамусе — после введения этаминал-натрия, этанола и фентанила.

3. По-видимому, подкрепляющая система гипоталамуса обеспечивает однотипную реакцию на введение наркотиков, тогда как система расширенной миндалины включает элементы собственно подкрепления и стресс-реактивности.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00549а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Б. Константинопольский, И. В. Чернякова, А. И. Майский, Т. А. Гудашева, *Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам. Матер. 4-й межд. конф.*, Москва (2006).

2. А. А. Лебедев, В. П. Павленко, И. М. Воейков и др., *Психофармакол. и биол. наркол.*, **6**(1–2), 1204–1211 (2006).
3. В. В. Михеев, П. Д. Шабанов, *Фармакологическая асимметрия мозга*, Элби-СПб, Санкт-Петербург (2007).
4. П. Д. Шабанов, Ю. С. Бородин, *Нарушения памяти и их коррекция*, Наука, Ленинград (1989).
5. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. Е. Воеводин, В. Ф. Стрельцов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 14–18 (2006).
6. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, Ш. К. Мещеров, *Дофамин и подкрепляющие системы мозга*, Лань, Санкт-Петербург (2002).
7. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. П. Павленко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(5), 44–49 (2006).
8. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. В. Русановский, В. Ф. Стрельцов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(6), 3–8 (2006).
9. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. П. Стеценко и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(1), 6–10 (2007).
10. П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. П. Стеценко и др., *Нейронауки*, **2**(5), 4–9 (2006).
11. П. Д. Шабанов, Р. О. Ройк, В. Ф. Стрельцов, *Наркология*, **4**(6), 27–30 (2005).
12. П. Д. Шабанов, В. В. Русановский, А. А. Лебедев, *Зоосоциальное поведение млекопитающих*, Элби-СПб, Санкт-Петербург (2006).
13. П. Д. Шабанов, В. В. Русановский, А. А. Лебедев, *Наркология*, **4**, 17–22 (2006).
14. В. Г. Шаляпина, П. Д. Шабанов, *Основы нейроэндокринологии*, Элби-СПб, Санкт-Петербург (2005).
15. Sambrook J., Fritsch F., and Maniatis T., *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Gold Spring Harbor Lab. Press, 2, 1418–1419 (1989).
16. Z. Sarnyai, Y. Shaham, and S. C. Heinrichs, *Pharmacol. Rev.*, **53**, 209–243 (2001).

Поступила 28.01.08

## EXPRESSION OF mRNA FOR CORTICOLIBERIN AND VASOPRESSIN IN HYPOTHALAMUS AND AMYGDALA ON THE BACKGROUND OF ADMINISTRATION OF PSYCHOACTIVE DRUGS IN RATS

P. D. Shabanov and A. A. Lebedev

Department of Pharmacology, St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia  
e-mail: shabanov@mail.com.ru

Wistar male rats were injected intraperitoneally for 4 days in elevated doses with: (1) physiological saline (control; 0.1–0.2–0.4–0.8 ml/rat), (2) amphetamine (0.5–1.0–2.0–4.0 mg/kg); (3) fentanyl (0.00625–0.0125–0.025–0.05 mg/kg), (4) 40% aqueous ethanol solution (0.5–1.0–2.0–4.0 g/kg), (5) ethaminal sodium (2.5–5–10–20 mg/kg), and (6) dexamethasone (0.5–1.0–2.0–4.0 mg/kg). The forced regime of drug administration led to gradual load of the organism and prevented drug tolerance development. This method is widely used for the formation of drug dependence (or its features) due to various narcotic agents. The maximum level of mRNA expression for corticoliberin was registered in amygdala after the administration of dexamethasone (0.46 units compared to  $\beta$ -actin), and the minimum level was observed after treatment with sodium ethaminal (0.07) and fentanyl (0.037). In hypothalamus, sodium ethaminal produced elevated mRNA expression (0.8 units), followed by ethanol (0.37) and fentanyl (0.039). Amphetamine activated mRNA expression for corticoliberin neither in hypothalamus nor in amygdala for all of the drugs studied. The mRNA expression for vasopressin was also not registered for all drugs in hypothalamus and amygdala. Therefore, the reinforcing system of hypothalamus supports the typical reaction on the administration of narcotic agents, while the extended amygdala system includes both the proper reinforcement and the stress reactivity elements.