

НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НАРКОЛОГИИ –  
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ПСИХИАТРИИ И НАРКОЛОГИИ ИМЕНИ В.П. СЕРБСКОГО"  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*



Перегуд Данил Игорьевич

**РОЛЬ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА BDNF  
В МЕХАНИЗМАХ ОПИЙНОЙ АБСТИНЕНЦИИ  
(экспериментальное исследование)**

Специальность – 1.5.24 – нейробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:

Панченко Леонид Федорович, доктор  
медицинских наук, профессор, академик  
РАН, заслуженный деятель науки  
Российской Федерации

Гуляева Наталия Валерьевна, доктор  
биологических наук, профессор

Москва 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Актуальность исследования .....	5
Цель.....	9
Задачи .....	9
Научная новизна .....	9
Теоретическое и практическое значение .....	10
Методология и методы исследования .....	11
Положения, выносимые на защиту.....	12
Степень достоверности и апробация работы.....	12
Личный вклад автора .....	14
Публикации .....	14
Структура и объем работы .....	14
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Механизм действия опиатов.....	15
1.1.1. Молекулярные процессы при активации опиоидных рецепторов .....	15
1.1.2. Локализация нейромедиаторных процессов в условиях воздействия опиатов .....	19
1.1.3. Нейропластические процессы при действии опиатов .....	22
1.2. Основы функционирования BDNF .....	29
1.2.1. Экспрессия гена BDNF .....	30
1.2.2. Внутриклеточные сигнальные каскады и функционирование BDNF.....	38
1.3. BDNF как регулятор развития опиной зависимости и абстиненции .....	43
1.3.1. Влияние опиатов на содержание BDNF в ЦНС .....	43
1.3.2. Функциональная роль BDNF при действии опиатов.....	53
1.3.3. Взаимосвязь BDNF с клиническими проявлениями опиной зависимости .....	56
1.4. Взаимодействие NO и BDNF в контексте развития опиной зависимости и абстиненции .....	58
1.4.1. Нитрергическая система как медиатор развития опиной зависимости и абстиненции .....	58
1.4.2. Взаимодействие BDNF и NO в ЦНС .....	66
1.4.3. Взаимодействие BDNF и NO в ЦНС в условиях действия опиатов .....	68

1.5. Патогенез алкогольной зависимости и абстиненции: фокус на BDNF .....	69
1.5.1. Влияние алкоголя на содержание BDNF в ЦНС в модельных системах	71
1.5.2. Функциональная роль BDNF при алкогольной зависимости .....	74
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	78
2.1. Эксперименты на животных.....	78
2.1.1. Интоксикация морфином.....	79
2.1.2. Алкоголизация.....	79
2.1.3. Введение ингибитора NO-синтазы .....	82
2.1.4. Введение рекомбинантного BDNF .....	82
2.1.5. Введение миметика BDNF.....	84
2.1.6. Оценка спонтанного синдрома отмены морфина .....	85
2.1.7. Тест «открытое поле» .....	86
2.1.8. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт».....	86
2.1.9. Тест условной реакции предпочтения места .....	87
2.2. Биохимическая и молекулярно-биологическая часть работы.....	88
2.2.1. Активность NO-синтазы, концентрация нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x^-$ ), содержание цГМФ.....	89
2.2.2. Обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция .....	90
2.2.3. Иммунопреципитация хроматина.....	93
2.2.4. Иммунопреципитация РНК .....	95
2.2.5. Иммуноблоттинг .....	96
2.2.6. Иммуноферментный анализ.....	97
2.2.7. Содержание общего белка.....	98
2.3. Статистическая обработка материала .....	98
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	99
3.1. Особенности и потенциальные молекулярные механизмы экспрессии BDNF в ЦНС крыс при спонтанной отмене морфина. ....	101
3.1.1. Уровень мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина.....	101
3.1.2. Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при интоксикации и спонтанной отмене морфина .....	103
3.1.3. Потенциальные транскрипционные механизмы экспрессии гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина .....	105

3.1.4. Потенциальные посттранскрипционные механизмы экспрессии BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина .....	107
3.1.5. Сопоставление изменений содержания мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс с уровнем соответствующего белка.....	115
3.2. Взаимосвязь оксида азота и сопряженных нейрохимических систем с абстинентными нарушениями.....	120
3.2.1. Активность нитрергической системы в гиппокампе коррелирует с изменениями поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной абстиненции .....	120
3.2.2. Концентрация цГМФ в отделах головного мозга коррелирует с тяжестью спонтанного синдрома отмены морфина .....	125
3.3. Взаимодействие NO и BDNF в отделах головного мозга крыс в условиях спонтанной отмены морфина .....	128
3.3.1. Функциональная роль NO в манифестации спонтанного синдрома отмены морфина у крыс .....	128
3.3.2. NO регулирует содержание и активность BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина .....	131
3.3.3. Влияние инъекции BDNF в ВОП на проявления спонтанной отмены морфина.....	136
3.3.4. Влияние инъекции BDNF в ВОП на выработку и воспроизведение условной реакции предпочтения места, ассоциированной с введением морфина.....	140
3.4. Функциональная роль BDNF в регуляции потребления алкоголя и алкогольной абстиненции.....	142
3.4.1. Взаимосвязь экспрессии BDNF с паттерном потребления этанола .....	143
3.4.2. Функциональная роль BDNF в регуляции мотивации к потреблению алкоголя и манифестации проявлений алкогольной абстиненции .....	152
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	160
ВЫВОДЫ .....	166
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	167
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	169

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность исследования**

В клинической практике препараты опиной группы применяются в качестве сильнодействующего анальгетика. Благодаря ярко выраженной способности вызывать эйфорию опиаты и опиоиды нелегально используются не по назначению. При неконтролируемом использовании опиатов и опиоидов развивается патологическая зависимость, которая характеризуется непреодолимой тягой к приему препарата и манифестацией синдрома отмены при прекращении его поступления в организм. Злоупотребление препаратами опиного ряда и последующее формирование зависимости представляют собой актуальную медицинскую и социально-экономическую проблему мирового масштаба. В Российской Федерации патологическая зависимость от препаратов опиного ряда традиционно занимает ведущее место после алкоголизма в структуре наркологических заболеваний. Согласно аналитическому обзору о работе наркологической службы в Российской Федерации за период 2019-2020 гг. общая заболеваемость (учтенная распространенность) расстройствами наркологического профиля в 2020 г. составила 1203,5 случая на 100 тыс. населения. Из них на долю состояний, ассоциированных со злоупотреблением опиатов, пришлось 82,1 случая, что составило треть от общей структуры наркотической зависимости (Киржанова и соавт. 2021). При этом на первичную заболеваемость расстройствами наркологического профиля в 2020 г. пришлось 87,2 случая на 100 тыс. населения. Из которых на долю расстройств, связанных со злоупотреблением опиатов, пришлось 2,4 случая, что составило десятую долю от общей структуры расстройств, связанных со злоупотреблением наркотиков. Исследование бремени болезней в мировом масштабе, опубликованном в журнале *Lancet*, продемонстрировало, что распространенность заболеваний, связанных со злоупотреблением опиатов и опиоидов, в 2016 г. составляла 26,8 млн человек, тогда как первичная заболеваемость 2,8 млн человек (GBD, 2016). Согласно отчету ООН о потреблении наркотических средств в мировом масштабе в 2019 г. 62 млн человек потребляли опиоиды (при этом доля потребляющих опиаты (героин и опий)

составляла около 50%), что соответствует порядка 1,2 % мировой популяции взрослого населения (15-64 лет) (World Drug Report, 2021). Между 2010 и 2019 гг. число злоупотребляющих опиоидами увеличилась вдвое, что соответствовало увеличению распространенности на 76%, тогда как мировая численность населения увеличилась на 10%. Согласно данному исследованию немедицинскому потреблению опиоидов соответствует 12,9 млн лет потерянной жизни с учетом нетрудоспособности (DALY, Disability Adjusted Life Years) или 70% DALY связанных с потреблением наркотиков в общем (World Drug Report, 2021). Суммарные экономические потери России в 2017 г. от психоактивных веществ, выраженные в рублях, составили от 887,4 млрд до 8,5 трлн рублей, при этом потери, связанные со злоупотреблением опиатов от 38,6 млрд до 317,8 млрд рублей (Сошников и соавт., 2020). Употребление опиатов и вызванные им последствия в России принесли вред здоровью 0,5 млн DALY (Сошников и соавт., 2020). Суммарные траты, связанные с зависимостью от опиатов и фатальной передозировкой могут достигать поистине колоссальные значения, так, к примеру, было посчитано, что в 2017 г. в США соответствующие траты составили порядка триллиона долларов (Florence, et al., 2021). Таким образом, учитывая значительный урон, наносимый злоупотреблением опиатов мировому сообществу, всестороннее изучение механизмов течения опиоидной зависимости представляется актуальным направлением исследований.

Злоупотребление опиатами вызывает стойкую психическую и физическую зависимость, которая характеризуется соматическими и аффективными абстинентными расстройствами при отмене потребления. Заболевание характеризуется хроническим течением с повторяющимися циклами интоксикации, синдрома отмены и ремиссии. Согласно отдельным аналитическим работам, считается, что синдром отмены при прекращении поступления препарата является движущей силой формирования опиоидной зависимости (Evans, Cahill, 2016; Koob, 2020, 2021). Положительное подкрепляющее действие опиатов, действующее мотивационным стимулом употребления на первых этапах, постепенно замещается отрицательным подкреплением, проявляющимся в

стремлении приема опиатов с целью облегчения вегетативных, соматических и аффективных проявлений абстиненции.

Считается, что в основе феномена зависимости лежит изменение функционирования ряда нейромедиаторных и нейромодуляторных систем мезокортиколимбических областей головного мозга (De Vries, Shippenberg, 2002). Несмотря на очевидный прогресс понимания биологических основ зависимости, точные механизмы ее течения и становления остаются до сих пор не выясненными. Согласно данным литературы, химическая зависимость, в том числе и опиоидная, может рассматриваться как вариант нейропластичности (Dacher, Nugent, 2011; Korpi et al., 2015), под которой подразумеваются структурно-функциональные изменения в ЦНС, затрагивающие все уровни организации.

Нейротрофины известны своей способностью опосредовать нейропластические процессы в норме и при патологических состояниях (Chao, 2003; Mitre et al., 2017). Более того, данные литературы свидетельствуют о том, что нейротрофины в той или иной степени могут быть вовлечены в механизмы aberrантной нейропластичности при формировании химической зависимости от опиатов. В частности, известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) вовлечен в адаптационные процессы ЦНС при действии психоактивных веществ (Russo et al., 2009; Koskela et al., 2017). Тем не менее особенности экспрессии, а также функциональная роль BDNF при отмене опиатов при сформированной зависимости практически не охарактеризованы, а имеющиеся данные достаточно противоречивы (Geoffroy, Noble 2017).

Представляется, что конкретная нейрохимическая система не может функционировать изолированно. Одной из потенциальных биологически активных молекул, взаимосвязанных с активностью BDNF, является внутри- и межклеточный посредник оксид азота (NO), который, с одной стороны, регулирует многие аспекты пластичности нервной ткани (Cossenza et al., 2014). С другой стороны, NO вовлечен в механизмы реализации фармакологических эффектов опиатов (Taufun Uzbay, Oglesby, 2001; Toda et al., 2009). Ранее нами была проведена серия экспериментов, результаты которых продемонстрировали, что активность системы

NO изменяется в отделах головного мозга крыс на всех стадиях формирования зависимости от морфина (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006). При этом было установлено, что активность NO-синтазы и концентрация стабильных метаболитов NO - нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x^-$ ) регион-специфично коррелируют с тяжестью синдрома отмены. Однако, непосредственное участие NO в реализации зависимости и опиной абстиненции, а также его взаимосвязь с системой BDNF в данных условиях не исследовались.

Принимая во внимание участие NO в механизмах нейропластичности, а также факт вовлеченности NO и BDNF в процессы зависимости, можно полагать, что эти нейрохимические системы могут функционировать согласованно при формировании зависимости от опиатов, а также реализации абстинентных расстройств при их отмене. Данное направление исследований представляется своевременным и актуальным, поскольку соответствующие экспериментальные результаты отсутствуют.

Результаты, полученные на лабораторных животных, свидетельствуют об изменении уровня BDNF в мезокортиколимбических структурах головного мозга при алкогольной интоксикации и формировании зависимости. При этом посредством манипуляций уровнем BDNF убедительно продемонстрировано, что BDNF противодействует развитию зависимости и атрофических процессов при действии алкоголя. В основе упрощенной модели биологии алкоголизма лежит представление о том, что низкий уровень BDNF, сопровождающийся атрофией нейронов мезокортиколимбических структур, является триггером развития алкогольной зависимости (Davis, 2008; Logrip et al., 2015; Ron, Barak, 2016; Ron, Berger, 2018). Учитывая различие фармакологических свойств опиатов и этилового спирта, а также общности механизмов формирования зависимости была предпринята попытка сопоставить особенности и механизмы экспрессии BDNF, а также оценить роль BDNF в манифестации алкогольной и опиной абстиненции.

Таким образом, основываясь на данных литературы и предварительных собственных результатах, была выдвинута рабочая гипотеза, согласно которой экспрессия BDNF при отмене морфина изменяется в отделах головного мозга, а



манипуляция уровнем BDNF в эксперименте способна модулировать проявления абстинентных расстройств поведения.

## **Цель**

Установить механизмы экспрессии BDNF в отделах головного мозга крыс при опийной абстиненции, а также выявить взаимосвязь NO и BDNF при синдроме отмены морфина.

## **Задачи**

1. Исследовать паттерн и механизмы экспрессии BDNF в отделах головного мозга при отмене морфина.
2. Оценить ассоциацию компонентов сигнального каскада NO с выраженностью отмены морфина.
3. Изучить взаимосвязь NO и BDNF при отмене морфина.
4. Сопоставить полученные результаты с особенностями экспрессии BDNF в отделах головного мозга и ролью BDNF при отмене алкоголя.

## **Научная новизна**

Впервые установлено, что уровни мРНК BDNF во фронтальной коре (ФК), гиппокампе и среднем мозге (СМ) повышаются при спонтанной отмене морфина у животных со сформированной зависимостью от морфина, что не отмечается при острой или субхронической интоксикации. Представлены экспериментальные доказательства того, что транскрипция гена BDNF при отмене морфина инициируется с промотора экзона I, что сопровождается увеличением связывания транскрипционного фактора CREB (cAMP responsive element binding protein) с данной регуляторной областью гена и увеличением содержания, соответствующего транскрипта. Выявленные особенности экспрессии BDNF специфичны для отмены морфина, поскольку алкогольная абстиненция сопровождается, эпигенетически

опосредованным, повышением уровня мРНК BDNF, содержащей экзон VI, в гиппокампе. Повышение уровня мРНК BDNF при отмене морфина может быть связано с ослаблением микроРНК-опосредованной деградации. Кроме того, в основе посттранскрипционной регуляции BDNF при отмене морфина может лежать способность нейрон-специфического белка HuD, связывающего AU-богатые элементы (ELAV-like protein 4, также известный как Hu-antigen D) взаимодействовать с 3'-некодирующей областью (3'-UTR, 3'-untranslated region) мРНК BDNF.

Установлено, что при отмене морфина концентрация  $\text{NO}_x^-$  в гиппокампе коррелирует с поведением в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Кроме того, при спонтанной отмене морфина концентрация циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) повышается в ФК и снижается в СМ только у животных, демонстрирующих низкую выраженность абстиненции, при этом концентрация цГМФ коррелирует с выраженностью синдрома отмены.

Получены новые результаты, демонстрирующие способность ингибирования синтеза NO, предотвращать повышение уровня BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина. Более того, ранее не было известно, что системное ингибирование синтеза NO приводит к усилению абстинентных расстройств при спонтанной отмене морфина.

Впервые показано, что введение BDNF в вентральную область покрышки (ВОП) ослабляет поведенческие проявления синдрома отмены морфина. Впервые установлено, что стимуляция активности BDNF на модели чрезмерного потребления алкоголя частично ослабляет проявления алкогольной абстиненции, не оказывая влияния на сформированную алкогольную мотивацию.

### **Теоретическое и практическое значение**

В ходе выполнения работы получены принципиально новые экспериментальные данные, которые позволяют предложить концептуальную модель регуляции BDNF и его роли в реализации опийной абстиненции, а также согласованного

взаимодействия с NO при спонтанной отмене морфина в условиях сформированной физической зависимости.

Предполагается, что установленная взаимосвязь BDNF и NO, а также способность данных нейрохимических систем ослаблять проявления абстиненции, с одной стороны, расширяет представления о фундаментальных механизмах зависимости. С другой стороны, открывает возможность фармакологического воздействия на данные системы при терапевтических мероприятиях, направленных на купирование опиоидной абстиненции. В частности, исходя из того факта, что и NO, и BDNF ослабляют проявления отмены, для дальнейших доклинических исследований можно рекомендовать соединения, которые обладали бы способностью напрямую или опосредованно стимулировать их активность.

### **Методология и методы исследования**

Поставленные задачи были решены посредством современных подходов с использованием адекватных экспериментальных моделей на крысах и привлечением методов оценки поведения, а также методов, используемых в нейрохимических исследованиях.

Основными моделями, использованными в работе, являются модель спонтанного синдрома отмены на фоне физической зависимости от морфина, а также модель прерывистого доступа к 20 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора. Выраженность синдрома отмены морфина оценивали по специфическим для грызунов признакам абстиненции. Для оценки тревожно-подобных нарушений поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт» и тест «открытое поле». Для выявления функциональной роли BDNF и NO использовали вещества, способные изменять активность соответствующих нейрохимических систем.

Для анализа содержания мРНК и микроРНК в отделах головного мозга использована ПЦР после этапа обратной транскрипции с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени. Иммуноблоттинг и

иммуноферментный анализ использованы для регистрации уровня белков. При исследовании взаимодействия транскрипционных факторов, а также особенностей посттрансляционных модификаций гистонов в районе регуляторных участков гена BDNF использована иммунопреципитация хроматина, совмещенная с ПЦР в режиме реального времени. Для оценки взаимодействия белковых комплексов с транскриптом BDNF использована иммунопреципитация РНК, совмещенная с ПЦР после этапа обратной транскрипции.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Экспрессия BDNF в отделах мозга специфично повышается при опийной абстиненции, при этом изменения происходят на уровне как транскрипционных, так и посттранскрипционных процессов. Повышение экспрессии BDNF в мозге ослабляет синдром отмены.
2. Проявления абстиненции опосредованы изменениями сигнального каскада NO; NO противодействует опийной абстиненции, в частности, влияя на функционирование системы BDNF.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Степень достоверности и надежность результатов подтверждается достаточным количеством биологических и технических повторов, а также выбором адекватных методических подходов. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью статистического анализа, соответствующего гипотезе, требующей проверки и характеристикам выборок. Результаты исследования опубликованы в рецензируемых научных журналах. Публикации, в которых представлены результаты работы, имеют цитирования.

В работу вошли исследования, выполненные при поддержке грантов РФФИ [19-015-00483-а (2019-2021) – «Регуляция потребления алкоголя и абстинентных нарушений поведения: взаимодействие SHH (Sonic Hedgehog) и BDNF (Brain-derived neurotrophic factor).»; 16-04-01329-а (2016-2018) – «Нейротрофический

фактора мозга при алкогольной абстиненции»; 13-04-01415-а (2013-2015) – «Посттранскрипционные механизмы экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF) при опийной зависимости»; 12-04-31478-мол\_а (2012-2013) – «Транскрипционные механизмы экспрессии нейротрофического фактора мозга при действии морфина» 10-04-01403-а (2010-2012) «Нейротрофические сигнальные каскады в реализации эффектов морфина»; 07-04-00829-а (2007-2009) «Индивидуальные особенности формирования опийной зависимости и постабстинентных расстройств: роль оксида азота»]. Результаты работы по грантам одобрены соответствующими экспертными советами.

Результаты работы были представлены в рамках отечественных и международных научных мероприятий: на международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Ростов-на-Дону, 2008; конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга», Санкт-Петербург – Колтуши, 2008; 2-й, 3-й и 4-й Всероссийских конференциях с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии», Томск, 2008, 2013 и 2018; 22-й конференции международного нейрохимического общества (International Society for Neurochemistry), Пусан, Корея, 2009; 4-й конференции европейского нейрохимического общества (European Society for Neurochemistry), Лейпциг, Германия, 2009; 6-м и 7-м форумах Федерации европейских нейронаучных обществ (Federation of European Neuroscience Societies), Женева, Швейцария, 2008 и Амстердам, Нидерланды, 2010; 10-м мировом конгрессе по биологической психиатрии, Прага, Чешская Республика, 2011; научно-практической конференции с международным участием «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга», Ростов-на-Дону, 2011; Всероссийской научно-практической конференции «Совершенствование организации и оказания наркологической помощи населению», Москва, 2011; научно-практической конференции с международным участием «Мир аддикций: химические и нехимические зависимости, ассоциированные психические расстройства» Санкт-Петербург, 2012; 20-м

Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2013; научно-практической конференции с международным участием «Современная наркология: достижения, проблемы, перспективы развития», Москва, 2017; семинаре отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН «Молекулярный мозг», посвященном 75-летию со дня рождения академика Е.В. Гришина, Москва, 2021.

### **Личный вклад автора**

Автор выдвинул рабочую гипотезу, спланировал исследования, выполнил биохимические эксперименты, принял участие в поведенческих экспериментах, осуществил статистическую обработку, анализ и представление результатов, принял участие в написании статей, представлял результаты на российских и международных конференциях.

### **Публикации**

Экспериментальный материал, представленный в диссертации, в полной мере изложен в 18 научных работах в том числе в 15 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых аналитическими базами SCOPUS, WoS и RSCI, а также в 3 статьях в журналах из списка ВАК, определенных пунктом 2.3 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова.

### **Структура и объем работы**

Диссертация изложена на 222 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, экспериментальных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 465 источников. Работа снабжена 24 таблицами и 43 рисунками.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Механизм действия опиатов

#### 1.1.1. Молекулярные процессы при активации опиоидных рецепторов

Фармакологические эффекты опиатов и опиоидов опосредуются соответствующими трансмембранными метаботропными рецепторами, сопряженными с гетеротримерными белками, связывающими гуаниновые нуклеотиды (G-белки). На данный момент охарактеризованы  $\mu$ -,  $\kappa$ -,  $\delta$ - и ноцицептиновые опиоидные рецепторы (Waldhoer et al., 2004). Считается, что основные фармакологические эффекты морфина, в первую очередь анальгезия, положительное подкрепление и развитие синдрома отмены на фоне зависимости, опосредуются  $\mu$ -опиоидными рецепторами (Matthes et al., 1996), в связи с чем описанные ниже процессы будут относиться к внутри- и межклеточным событиям, развивающимся при связывании типичного агониста - морфина с данными рецепторами. Тем не менее в реализации эффектов опиатов и опиоидов не исключается участие и других опиоидных рецепторов, более того, отмечается, что активация разных рецепторов сопровождается в основном сходными внутри- и межклеточными изменениями (Taylor, Fleming, 2001).

Опиоидные рецепторы преимущественно связаны с G-белками, чувствительными к токсину коклюша ( $G_i$  и  $G_o$ ), хотя в ряде работ отмечается связь с G-белками, нечувствительными к токсину коклюша ( $G_s$  и  $G_z$ ) (Connor, Christie, 1999; Tso, Wong, 2003). При связывании агониста с рецептором происходят конформационные изменения, результатом которых является обмен молекулы ГДФ на ГТФ связанного с  $\alpha$ -субъединицей G-белка (Рис. 1). Следующим этапом является диссоциация комплекса рецептора и G-белка и разделение последнего на  $\alpha$ - и  $\beta/\gamma$ -субъединицы, которые являются интермедиатами проведения сигнала внутрь клетки, впоследствии происходит гидролиз ГТФ, а субъединицы G-белка вновь образуют тример (Neer, 1995). В результате активации  $G_i$ - и  $G_o$ -белков активируется ряд каскадов, среди которых выделяют ингибирование аденилатциклазы (АЦ) посредством  $\alpha$ -субъединицы, последующее снижение

продукции цАМФ и активности цАМФ-зависимой протеинкиназы А. В свою очередь диссоциированная  $\beta/\gamma$ -субъединица опосредует ингибирование потенциал-зависимых кальциевых каналов и активацию G-белок связанных калиевых каналов. Кроме того, в ответ на стимуляцию  $\mu$ -опиоидных рецепторов отмечается активация каскада, опосредованного митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК, mitogen activated protein kinase). В частности, морфин вызывает активацию протеинкиназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK, extracellular signal-regulated kinase), в основе чего лежит диссоциация  $\beta/\gamma$ -субъединица G-белка и последующая активация малых ГТФаз семейства RAS (Li, Chang, 1996; Trapaidze et al., 2000). Представляется, что активация протеинкиназ ERK играет важную роль в развитии толерантности к анальгетическому эффекту опиоидов, а также развитию зависимости и синдрома отмены, поскольку они принимают участие в десенситизации и интернализации рецепторов (Polakiewicz et al., 1998), а также в механизмах синаптической пластичности (Sweatt, 2004).

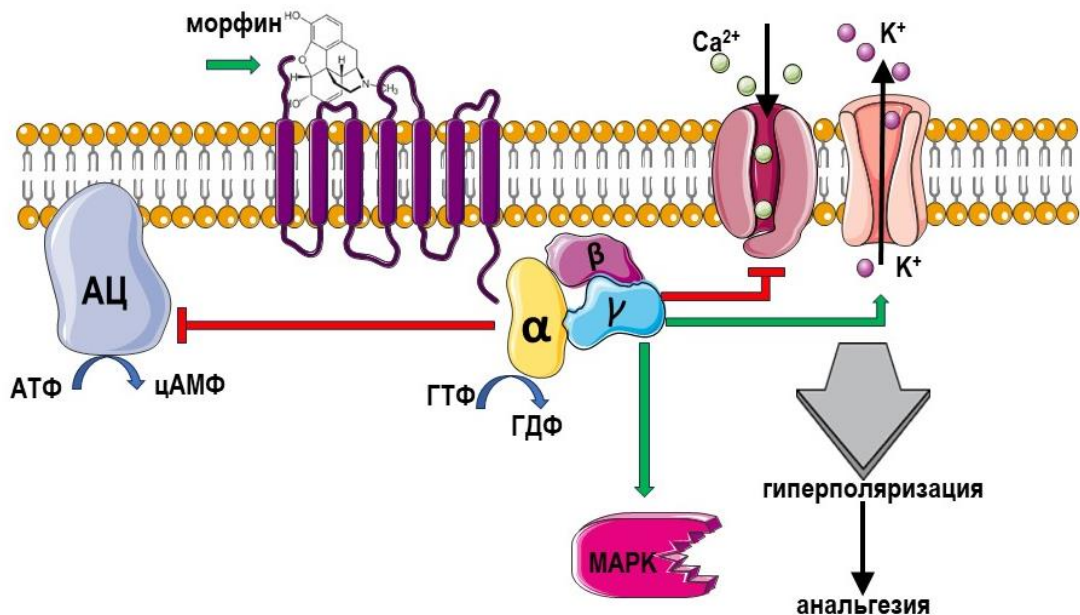


Рисунок 1 – Основные внутриклеточные сигнальные каскады при активации опиоидных рецепторов.\*

\* Здесь и далее схемы, иллюстрирующие биологические процессы, созданы с использованием шаблонов Servier Medical Art (Servier), предоставляемых по свободной лицензии Creative Commons Attribution 3.0 unported license.



Активность сигналинга, инициированного  $\mu$ -опиоидными рецепторами, находится под контролем таких процессов как десенситизация и интернализация, в реализации которых помимо прочих компонентов играет роль белок  $\beta$ -аррестин (Рис. 2). Вслед за активацией рецептор подвергается фосфорилированию, что запускает механизмы торможения сигналинга, опосредованного G-белками, посредством связывания белков инициирующих интернализацию - в первую очередь  $\beta$ -аррестина. Основными протеинкиназами, фосфорилирующими  $\mu$ -опиоидные рецепторы, являются киназы рецепторов, связанных с G-белками (GRK, G protein receptor kinases) (Miess et al., 2018). Кроме того, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase), протоонкоген тирозин-протеинкиназа Src и протеинкиназа C (PKC, protein kinase C) также опосредуют фосфорилирование рецептора (Lemos Duarte, Devi, 2020). Последовательное фосфорилирование рецептора является необходимым условием для связывания структурного белка  $\beta$ -аррестин, который опосредует связь рецептора с белками цитоскелета и инициирует его последующий эндоцитоз.

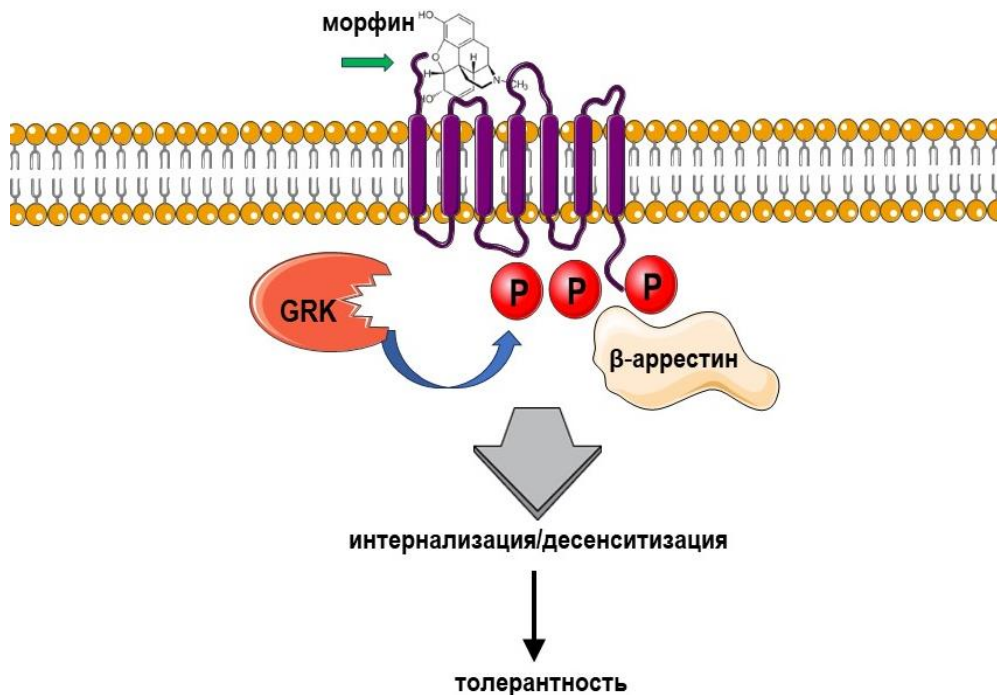


Рисунок 2 – Участие  $\beta$ -аррестина в функционировании опиоидных рецепторов.

Таким образом активация каскадов, опосредованных G-белками (Рис. 1), приводит к гиперполяризации нейронов и снижению возбудимости, что лежит в основе таких острых фармакологических эффектов опиатов как анальгезия, тогда как интернализация и десенситизация, опосредованная  $\beta$ -аррестином (Рис. 2), лежат в основе развития толерантности к антиноцицептивному действию, угнетения дыхательного центра и манифестации абстиненции на фоне развившейся физической зависимости (Kudla, Przewlocki, 2021; Cuitavi et al., 2021).

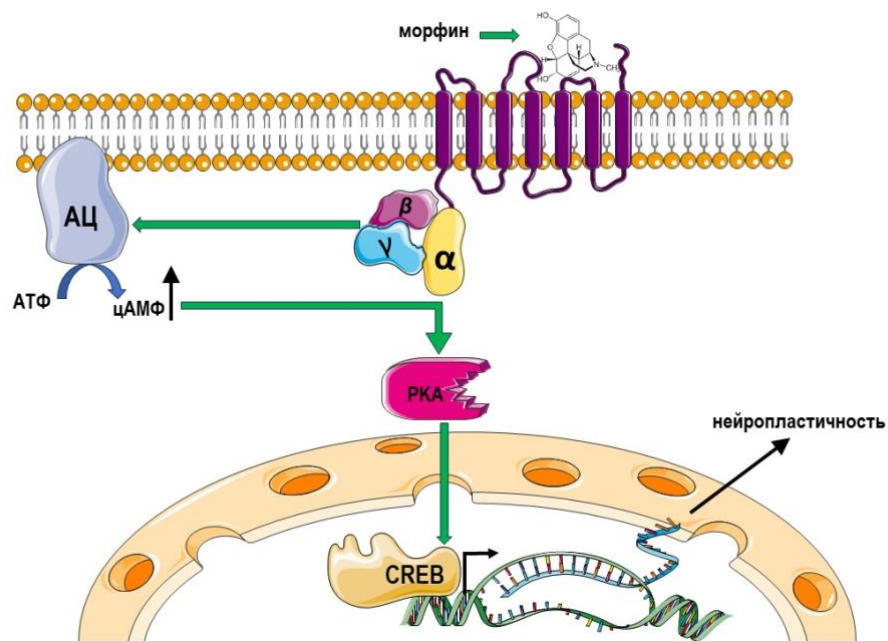


Рисунок 3 – Внутриклеточные адаптационные процессы при длительной стимуляции опиоидных рецепторов.

При длительной стимуляции опиоидных рецепторов наблюдаются адаптационные процессы на молекулярном, функциональном и структурном уровнях организации ЦНС (Christie, 2008). Снижение внутриклеточной концентрации цАМФ при продолжительном воздействии опиоидов компенсируется гиперактивацией АЦ частично за счет  $\beta/\gamma$ -субъединицы G-белка, таким образом, в упрощенном виде, нижележащие эффекторы цАМФ, такие как протеинкиназа А и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB, вырабатывают толерантность на молекулярном уровне (Рис. 3) (Watts, Neve, 2005). В свою очередь фосфорилирование CREB определяет транскрипционный контроль

ряда рецепторов нейротрансмиттеров, собственно изоформ АЦ и других сигнальных белков, что в итоге регулирует возбудимость нейронов (Carlezon et al., 2005). CREB стимулирует возбудимость нейронов голубого пятна (ГП, locus ceruleus) и как следствие увеличивает выраженность синдрома отмены (Han et al., 2006). Отмечается, что нарушения внутриклеточной передачи сигнала в дофаминергических нейронах ВОП могут сохраняться до недели после окончания введения опиоидов (Bonci, Williams, 1996). Считается, что именно адаптационные процессы на уровне транскрипционного контроля могут обеспечивать долговременные изменения в ЦНС при развитии опиоидной зависимости.

### *1.1.2. Локализация нейромедиаторных процессов в условиях воздействия опиатов*

Функциональные  $\mu$ -опиоидные рецепторы широко представлены в нейронах путей ЦНС ответственных за ноцицепцию таких как соматосенсорные нейроны заднего корешкового ганглия и ноцицептивные нейроны заднего рога спинного мозга. Однако отмечается, что основными областями мозга, в которых реализуются анальгетические свойства агонистов  $\mu$ -опиоидных рецепторов являются околотоводопроводное серое вещество и ростральная часть вентромедиальной области продолговатого мозга (Fields, 2004). Две последние области ствола мозга характеризуются наличием двух популяций нейронов, которые стимулируют или тормозят болевые ощущения за счет модуляции активности ноцицептивных нейронов заднего рога спинного мозга. Различная локализация  $\mu$ -опиоидных рецепторов и их активация в данных популяциях нейронов ведут к развитию анальгетического эффекта (Fields, 2004).

Функционирование мезокортиколимбической системы, определяющей такие базовые функции ЦНС как мотивация и подкрепление, состоящей из взаимосвязанных структур, включая канонические дофаминергические пути, находится под контролем опиоидных рецепторов. Согласно классическим представлениям, стимуляция  $\mu$ -опиоидных рецепторов ГАМК-ергических интернейронов ВОП посредством снижения их активности оказывает

растормаживающее влияние на дофаминергические нейроны, что сопряжено с высвобождением дофамина в прилежащем ядре стриатума. Данный процесс лежит в основе формирования положительного подкрепления, как от естественных подкрепляющих стимулов, так и от психоактивных веществ (Le Merrer et al., 2009). Собственно, в прилежащем ядре стриатума также представлены функциональные  $\mu$ -опиоидные рецепторы, участвующие в механизмах положительного и отрицательного подкрепления. Еще одна область мезокортиколимбической системы, в которой  $\mu$ -опиоидные рецепторы проявляют функциональную активность - префронтальная кора (ПФК). Считается, что в ПФК активация  $\mu$ -опиоидных рецепторов приводит к активации глутаматергических пирамидных нейронов также посредством растормаживания.

При продолжительном воздействии развивается толерантность ко многим фармакологическим эффектам опиатов в первую очередь анальгетическому и положительному подкрепляющему. Отмечается, что развитие толерантности связано с фармакодинамическими свойствами и по большей части не имеет отношения к катаболизму агонистов опиоидных рецепторов. Адаптационные процессы в сигнальных каскадах, которые опосредуют активность опиоидных рецепторов различны в нейронах чувствительных к опиоидам в различных областях головного мозга.

Считается, что адаптационные процессы в стволовых структурах, таких как ГП и околотоводопроводное серое вещество лежат в основе процессов, составляющих соматические компоненты зависимости при синдроме отмены, в амигдаллярном комплексе протекают процессы, связанные с аффективными компонентами абстиненции, тогда как изменения в ВОП, прилежащем ядре стриатума и ПФК могут определять психические компоненты зависимости, в частности, потеря контроля принятия решения и компульсивное влечение (Christie, 2008; Strang et al., 2020; Koob, 2020). В основе негативного эмоционального состояния при опиоидном синдроме отмены, который вносит вклад в формирование отрицательного подкрепления, лежат два процесса: снижение функциональной активности системы подкрепления (ВОП и прилежащее ядро) и повышенная активность в

амигдаларном комплексе, которая опосредует реакцию на стресс (Strang et al., 2020).

Снижение активности системы ВОП-прилежащее ядро при абстинентном синдроме сопряжено с дефицитом дофамина и передачи соответствующего сигнала. Так стимуляция дофаминовых D2 рецепторов ослабляет соматические проявления отмены морфина (Harris, Aston-Jones, 1994). Тогда как антагонист дофаминовых D2, но не D1, рецепторов повышает выраженность синдрома отмены у грызунов (Funada, Shippenberg, 1996). Повышение активности в амигдале связывают со стресс-реактивными молекулами, такими как фактор, высвобождающим кортикотропин (CRF, corticotropin-releasing factor), динорфином, вазопрессинном, норадреналином, глюкокортикоидами и нейроиммунными факторами (Kreek, Koob, 1998; Strang et al., 2020; Koob, 2020).

Опийная зависимость характеризуется хроническим течением с повторяющимися циклами интоксикации, синдрома отмены, ремиссии и рецидива. Таким образом, налицо чередование положительного и отрицательного подкрепления, при этом со временем формируется сенситизация, которая проявляется учащением рецидивов и сокращением периодов ремиссии. Согласно отдельным аналитическим работам, считается, что аффективное состояние при прекращении поступления препарата является движущей силой формирования опийной зависимости (Evans, Cahill, 2016; Koob, 2020, 2021). Положительное подкрепляющее действие опиатов, действующее мотивационным стимулом употребления на первых этапах, постепенно замещается отрицательным подкреплением проявляющееся в стремлении приема опиатов с целью облегчения вегетативных, соматических и аффективных проявлений абстиненции – так называемые оппонентные процессы. Таким образом, Evans и Cahill кратко описывают данный процесс как ассоциативное обучение с целью облегчить негативные переживания (Evans, Cahill, 2016). Koob ввел понятие гиперкатифея (от греч. katifeia, подавленность, негативно окрашенное эмоциональное состояние), которым характеризует психоэмоциональное состояние при абстинентном синдроме. При этом гиперкатифея сохраняется продолжительный период и,

взаимодействуя с процессами обучения, формирует обстановочные стимулы при абстиненции, провоцирующие компульсивное поведение и рецидив (Кооб, 2021). С определенной долей скептицизма можно полагать, что нейропластические процессы, развивающиеся в условиях циклов интоксикация/абстиненция, могут переводить функционирование нервной системы на другой физиологический уровень, который отличается от нормы. Таким новым функциональным состоянием нервной системы и определяются нестабильность ремиссии и симптоматика постабстинентного состояния при опиоидной зависимости.

### *1.1.3. Нейропластические процессы при действии опиатов*

Данные литературы свидетельствуют, что определяющее значение в патогенезе химической и, в частности, опиоидной зависимости могут иметь структурно-функциональные изменения в мезокортиколимбической системе головного мозга (Табл. 1). Другими словами, химическая (опиоидная) зависимость может рассматриваться как особый вид нейропластичности – способности нейронов в ответ на разнообразные стимулы к морфологическим и функциональным изменениям, в основе которых лежат специфические молекулярные процессы (Robinson, Kolb, 2004, Williams et al., 2001; Kalivas, O'Brien, 2008).

Психоактивные вещества, препараты опиоидного ряда в том числе, оказывают значительный эффект на синаптическую пластичность, процесс, являющийся основой научения и памяти, в нейронах мезокортиколимбических структур прежде всего таких как гиппокамп, ВОП, прилежащее ядро и ПФК (Kauer, Malenka, 2007; Lüscher, Malenka, 2011; Dacher, Nugent, 2011). Исследования в данном направлении в основном сфокусированы на таких процессах как долговременная потенция и долговременная депрессия, которые среди прочего определяются качественным и количественным составом метаботропных и ионотропных (NMDA и AMPA-подтипов, соответственно) глутаматных рецепторов в синапсах нейронов и регулируются сигнальными каскадами, которые причастны к адапционным механизмам при острой и хронической стимуляции опиоидных рецепторов.

Таблица 1 – Проявления нейропластичности у грызунов при хроническом действии опиатов

Показатель	Анатомическая локализация	Источник
экспрессия AMPA-рецепторов ↑	дофаминергические нейроны ВОП	Fitzgerald et al. 1996; Glass et al., 2008
высвобождение глутамата ↓	дофаминергические нейроны ВОП	Manzoni, Williams, 1999
пресинаптическая долговременная потенция ↓	дофаминергические нейроны прилежащего ядра	Robbe et al., 2002
долговременная депрессия ↑	пирамидные нейроны ПФК	Van den Oever et al., 2008
долговременная депрессия ↓	гиппокамп	Pu et al., 2002; Billa et al., 2010
плотность синапсов и толщина постсинаптических уплотнений ↑	поле CA1 гиппокампа	Heidari et al., 2013
размер тела нейрона ↓	дофаминергические нейроны ВОП	Skclair-Tavron et al., 1996; Spiga et al., 2003
размер тела нейрона ↓	дофаминергические нейроны ВОП с проекциями в прилежащее ядро	Simmons et al., 2019
размер тела нейрона ↑	дофаминергические нейроны ВОП с проекциями в ПФК	Simmons et al., 2019
количество ветвей дендритов и шипиков ↓	пирамидные нейроны ПФК	Robinson, Kolb, 1999; Li et al., 2007; Robinson et al., 2002
количество ветвей дендритов и шипиков ↓	срединные шипиковые нейроны прилежащего ядра	Robinson, Kolb, 1999; Spiga et al., 2005; Robinson et al., 2002
количество ветвей дендритов и шипиков ↓	пирамидные нейроны зрительной коры	Li et al., 2007; Robinson et al., 2002
нейрогенез ↓	гиппокамп	Eisch et al., 2000; Arguello et al., 2009
плотность шипиков ↑	орбитофронтальная кора	Robinson et al., 2002
плотность шипиков ↑	прилежащее ядро	Pal, Das, 2013
плотность шипиков ↑	ФК	Pal, Das, 2013

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение.

В частности, было показано, что острое воздействие морфина увеличивает вклад AMPA-рецепторов по отношению к NMDA-рецепторам в возбуждающие постсинаптические токи в ВОП (Saal et al., 2003). Однократное действие морфина тормозит индукцию долговременной потенции в ГАМК-ергических синапсах дофаминергических нейронов ВОП на период до 24 ч (Nugent et al., 2007).

Указывается, что механизм индукции долговременной потенциации в данных синапсах основан на NMDA-рецептор-зависимой продукции оксида азота (NO) и последующей активации гуанилатциклазы (ГЦ) в пресинапсах (Nugent et al., 2007) при этом сигналинг, опосредованный цАМФ, не играет в данном процессе функциональной роли (Nugent et al., 2009). Таким образом, острое воздействие опиатов в дофаминергических нейронах ВОП стимулирует долговременную потенциацию в возбуждающих глутаматергических, но препятствует ее развитию в тормозных ГАМК-ергических синапсах (Dacher, Nugent, 2011).

С другой стороны, в зависимости от отдела мозга длительное воздействие опиатов может запускать постсинаптическую долговременную потенциацию за счет увеличения популяции AMPA-рецепторов, снижения долговременной постсинаптической депрессии за счет снижения экспрессии AMPA-рецепторов на плазматической мембране и/или долговременной пресинаптической депрессии за счет снижения пресинаптического высвобождения глутамата (Dacher, Nugent, 2011). Так Fitzgerald и соавторы показали, что длительное воздействие морфина сопровождается увеличением экспрессии субъединицы AMPA-рецептора - GluR1 в ВОП, что может отражать постсинаптическую долговременную потенциацию возбуждающих синапсов (Fitzgerald et al. 1996). Авторы полагают, что избыточное возбуждение при блокаде деполяризации отмечаемое при хроническом воздействии может подавлять активность дофаминергических нейронов и высвобождение дофамина, что определяет негативные аспекты синдрома отмены (Fitzgerald et al. 1996). С другой стороны, при отмене морфина отмечается снижение высвобождения глутамата, опосредованное метаботропными глутаматными рецепторами в дофаминергических нейронах ВОП, что также может проявляться снижением возбудимости дофаминергических нейронов и высвобождения дофамина (Manzoni, Williams, 1999). Продолжительное воздействие опиатов снижает экспрессию субъединицы AMPA-рецептора - GluR1 на плазматической мембране дендритов дофаминергических нейронов в прилежащем ядре стриатума (Glass et al., 2008). Пресинаптическая долговременная потенциация, зависящая от метаботропных рецепторов глутамата, отсутствует в



прилежащем ядре у мышей во время отмены морфина (Robbe et al., 2002). На модели самовведения героина Van den Oever и соавторы продемонстрировали, что предъявление условного стимула сопровождается усилением долговременной депрессии (снижение токов, опосредованных AMPA-рецепторами, но не NMDA-рецепторами) пирамидных нейронов медиальной ПФК, в основе чего лежит эндоцитоз субъединицы AMPA-рецептора - GluR2 (Van den Oever et al., 2008). При этом блокада эндоцитоза AMPA-рецептора значительным снижением уровня самовведения в ответ на предъявление условного стимула (Van den Oever et al., 2008). При хроническом воздействии опиатов меняется субъединичный состав AMPA-рецепторов в синапсах гиппокампа, что сопряжено со снижением выраженности долговременной депрессии (Billa et al., 2010). Долговременная потенция в гиппокампе значительно снижена при отмене морфина, что сопряжено с нарушением поведения в водном лабиринте Морриса при этом ингибиторы протеинкиназы A восстанавливают способность вызывать долговременную потенцию (Pu et al., 2002). Процессом, характеризующим адаптацию в ВОП, прилежащем ядре, околосинаптическом сером веществе и ГП, является увеличение пресинаптического высвобождения ГАМК в ответ на активацию каскада цАМФ-протинкиназа A, что может отражать долговременную потенцию в ингибирующих синапсах (Christie, 2008; Williams et al., 2001).

В клинической практике пациенты с диагнозом опиоидная зависимость проявляют разной степени выраженности дефицит когнитивных способностей, что как считается, может являться проявлением структурных перестроек, которые вызывают опиоиды (Blackwood, Cadet, 2021). У потребителей героина отмечается атрофия мозга, выражающаяся в снижении объема ряда структур, снижении плотности серого вещества коры больших полушарий и лейкоэнцефалопатии (Blackwood, Cadet, 2021). На ультраструктурном уровне у людей, употреблявших опиоидные препараты, в нейронах обнаруживались нарушения в распределении рибосом, патология цистерн эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, плеоморфизм митохондрий, а также накопление в клетках липидов и липофусцина, появление в межклеточном пространстве сенильных (сенильноподобных) бляшек

(Морозов, Боголепов, 1984). Подчеркивается неспецифичность и различная выраженность морфологических изменений в разных отделах ЦНС (отсутствие избирательности): от весьма незначительных до тяжелых. Речь идет в первую очередь не о прямом токсическом влиянии наркотиков, а сосудистых нарушениях, вызываемых ими, аноксических процессах и гипоксии мозга, нарушения питания и витаминной недостаточности, соматической патологии и др. (Морозов, Боголепов, 1984).

В экспериментах на грызунах продемонстрировано, что продолжительное воздействие опиатов также сопровождается морфологическими перестройками в ЦНС по большей части атрофического характера (Robinson, Kolb, 2004; Russo et al., 2010).

Согласно данным полученным Боголеповым в сенсомоторной коре крыс, получавших субхронически морфин отмечаются ряд изменений цитоархитектоники нейронов (Bogolevov, 1985). В частности, появляются участки просветления и снижения числа микротрубочек, а также их перераспределение в дендритах, а также увеличению числа выявляемых варикозных уплотнений, что, по мнению автора, может свидетельствовать как о снижении количества синапсов, так и об образовании новых (Bogolevov, 1985). Потребление морфина в виде раствора на протяжении 21 дня сопровождается значительными ультраструктурными изменениями нейронах поля СА1 гиппокампа: по сравнению с контрольной группой увеличивается плотность синапсов и толщина постсинаптических уплотнений, что сопровождается изменением формы синапсов (вогнутых становится меньше, тогда как выпуклых значительно больше) (Heidari et al., 2013).

Субхроническое воздействие морфина приводит к снижению размера (величины площади и периметра) дофаминергических нейронов ВОП у крыс (Sklair-Tavron et al., 1996). При этом указывается, что отмена субхронического введения морфина, но не субхроническая интоксикация сопровождается снижением величины площади и периметра тела дофаминергических нейронов ВОП (Spiga et al., 2003). Интересно, что морфологические изменения нейронов ВОП при субхроническом воздействии морфина проявляются в разной степени у

нейронов различных популяций в данной области (Simmons et al., 2019). Так было показано, что размер тела дофаминергических нейронов, имеющих проекции в медиальную оболочку, но не центр прилежащего ядра стриатума значительно снижается у мышей, получавших морфин, тогда как размер тела нейронов, имеющих проекции ПФК, увеличивается (Simmons et al., 2019).

На срединных шипиковых нейронах прилежащего ядра и пирамидных клетках париетальной коры и ПФК крыс было выявлено снижение количества ветвей дендритов и количество шипиков спустя 24-25 дней после 1 месяца введения морфина в дозе 10 мг/кг (Robinson, Kolb, 1999). В работах Spiga и соавторов установлено, что как спонтанная, так и индуцированная налоксоном отмена введения морфина, но не субхроническая интоксикация сопровождается снижением плотности шипиков дендритов на срединных шипиковых нейронах прилежащего ядра крыс (Spiga et al., 2005). Отмечается, что снижение длины дендритов и плотности дендритов на пирамидных нейронах третьего слоя первичной зрительной коры крыс наблюдается спустя 3 ч после введения морфина в течение 10 дней дважды в день в дозировке 10 мг/кг (Li et al., 2007). Субхроническое, но не острое введение морфина, так же, как и самовведение героина сопровождается значительным снижением нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа у взрослых крыс (Eisch et al., 2000). В исследовании Arguello и соавторов (2009) также указывается, что при субхронической интоксикации морфином отмечается снижение числа пролиферирующих клеток в субгранулярной зоне гиппокампа у мышей.

В работе Liao и соавторов было установлено, что  $\mu$ -опиоидные рецепторы локализованы с AMPA- и NMDA-рецепторами в зрелых синапсах нейронов грызунов при этом действие морфина в культуре нейронов характеризуется значительным снижением частоты и амплитуды миниатюрных возбуждающих постсинаптических потенциалов, причиной данных изменений может быть способность морфина снижать количество и размер шипиков дендритов и, следовательно, количество синапсов (Liao et al., 2005). В культуре гиппокампальных нейронов крысы было продемонстрировано, что длительное

воздействие опиоидов на морфологию дендритов зависит от агониста и его способности оказывать влияние на интернализацию  $\mu$ -опиоидных рецепторов (Liao et al., 2007). Так после 3 суток культивирования в среде, содержащей морфин, который вызывает минимальную интернализацию, снижается плотность отростков и шипиков дендритов, тогда как DAMGO и эторфин, вызывающие значительную интернализацию рецепторов, оказывают обратный эффект на морфологии дендритов (Liao et al., 2007).

Robinson и соавторы исследовали как различные способы введения морфина (посредством самовведения самим животным или введение с помощью экспериментатора) влияют на плотность шипиков дендритов в различных областях коры больших полушарий, гиппокампе и прилежащем ядре у крыс (Robinson et al., 2002). Спустя один месяц после воздействия морфина в большинстве исследуемых отделах головного мозга (медialная ФК, первичная зрительная кора и прилежащее ядро) наблюдается снижение плотности шипиков дендритов независимо от того, как вводился морфин, посредством самовведения животным или экспериментатором, хотя более выраженные изменения наблюдались при самовведении морфина (Robinson et al., 2002). В гиппокампе отмечалось снижение плотности шипиков только при самовведении морфина, тогда как в первичной соматосенсорной коре отмечалось снижение шипиков при введении морфина экспериментатором (Robinson et al., 2002).

С другой стороны, необходимо отметить, что в единичных работах продемонстрировано, напротив, стимулирующее действие длительного воздействия опиатов на дендритогенез. Так в орбитофронтальной коре морфин увеличивает плотность шипиков независимо от того, как морфин поступал (посредством самовведения или пассивно), хотя при самовведении изменения были более выражены (Robinson et al., 2002). Как субхроническая интоксикация мышей морфином, так и длительная отмена на протяжении 2-х месяцев сопровождается увеличением плотности шипиков дендритов в ФК и прилежащем ядре стриатума, при этом в ФК, но не прилежащем ядре плотность зрелых шипиков дендритов при отмене выше по сравнению с интоксикацией (Pal, Das, 2013).

В ходе исследования фундаментальных процессов, лежащих в основе нейропластичности в условиях субхронического воздействия опиатов, список медиаторов постоянно пополняется новыми участниками, тем не менее вклад многих из них остается малоизученным. Нейротрофины – одни из ключевых белковых молекул принимающих участие в реализации пластических процессов в ЦНС. Накопленный экспериментальный материал свидетельствует, что BDNF, который является одним из самых изученных представителей данного семейства, вовлечен в патогенетические механизмы структурно-функциональных изменений в отделах ЦНС на разных этапах формирования химической (опийной) зависимости (Russo et al., 2009; Autry, Monteggia, 2012; Koskela et al., 2017; Geoffroy, Noble 2017).

## **1.2. Основы функционирования BDNF**

BDNF был впервые выделен Barde и соавторами в 1982 г. из мозга свиней как фактор, обеспечивающий выживаемость и рост отростков эмбриональных нейронов кур (Barde et al., 1982). Позднее ген BDNF был клонирован (Leibrock et al., 1989), а консервативность аминокислотной последовательности позволила включить его в качестве члена семейства нейротрофинов наряду с фактором роста нервов (NGF, nerve growth factor) а также нейротрофином-3 и нейротрофином-4.

Нейротрофины - секретируемые белки, которые помимо способности регулировать выживаемость, рост и дифференцировку нервных клеток, играют ключевую роль в регуляции пластичности ЦНС зрелого организма (Park, Roо, 2013). Наиболее изученным представителем семейства является BDNF. BDNF проявляет широкий спектр биологической активности в нервной ткани на разных стадиях онтогенеза: он участвует в процессах выживания и дифференцировки стволовых клеток – предшественников нейронов, синаптогенезе, формировании нейронных сетей, а также участвует в передаче нервного импульса как нейромодулятор и как нейромедиатор (Park, Roо, 2013). Широкий диапазон, в некоторой степени избыточный, функциональной активности BDNF в ЦНС

связывают с пространственно-временными факторами: специфичность определяется локализацией молекулярных процессов как на уровне одного нейрона, так и на уровне макроструктурной анатомической локализацией в мозге, а также длительностью воздействия того или иного стимула (Wang et al., 2022; Bazzari, Bazzari, 2022).

### *1.2.1. Экспрессия гена BDNF*

BDNF характеризуется обширной представленностью в головном мозге, при этом наибольший его уровень отмечается в неокортексе, гиппокампе и мозжечке (Hofer et al. 1990). Экспрессия гена BDNF – комплексный процесс, который определяется специфическим строением гена, а также составом белковых комплексов транскрипционных регуляторов, представленных в его регуляторных участках (West et al., 2001; Mitchelmore, Gede, 2014; Ooi, Wood, 2008; Flavell, Greenberg, 2008).

У грызунов ген BDNF содержит, по меньшей мере, 9 экзонов, имеющих индивидуальные промоторы в 5'-области (некодирующие экзоны I – VIII, и кодирующий экзон IX), что определяет существование соответствующих экзон-специфических вариантов мРНК (Aid et al., 2007) (Рис. 4). Все экзон-специфические варианты мРНК BDNF кодируют одинаковую аминокислотную последовательность препробелка.

Функциональная роль большого количества вариантов мРНК BDNF до конца не выяснена. Есть указания, что определенные экзон-специфические транскрипты BDNF имеют различную субклеточную локализацию в нейронах (Tongiorgi, Vaj, 2008; Colliva, Tongiorgi, 2021) (Рис. 4). При повышении активности нейронов гиппокампа экзоны II и VI располагаются преимущественно в дистальных дендритах, тогда как экзоны I и IV преимущественно в теле нейронов (Chiaruttini et al., 2008; Colliva, Tongiorgi, 2021). Транскрипты BDNF, содержащие экзон I, являются наиболее представленными в синаптической фракции коры и гиппокампа крыс по сравнению с мРНК, содержащих экзоны II, IV или VI (Lekk et al., 2023).

Более того, нокдаун экзонов I и IV в культуре клеток нарушает структуру проксимальных дендритов, тогда как нокдаун экзонов II и VI - дистальных (Baj et al., 2011). Предполагается, что локальное повышение уровня специфических экзонов может обеспечивать локальную трансляцию BDNF, который может участвовать в синаптогенезе (Tongiorgi, Baj, 2008). В недавнем исследовании с помощью технологии CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) было установлено, что экзон-специфическое повышение транскриптов, содержащих экзон I, в нейронах гиппокампа крыс, сопровождается увеличением экспрессии генов, ответственных за рост дендритов, тогда как содержащих экзон IV увеличением генов, участвующих в катаболизме белка (Bach et al., 2023). Более того, увеличение мРНК BDNF, содержащей экзон I, но не экзон IV, стимулирует дендритогенез в культуре нейронов гиппокампа крыс (Bach et al., 2023). Тогда как повышение мРНК BDNF, содержащей экзон IV, но не экзон I, в гиппокампе ослабляет выработку условнорефлекторной реакции страха у крыс (Bach et al., 2023).

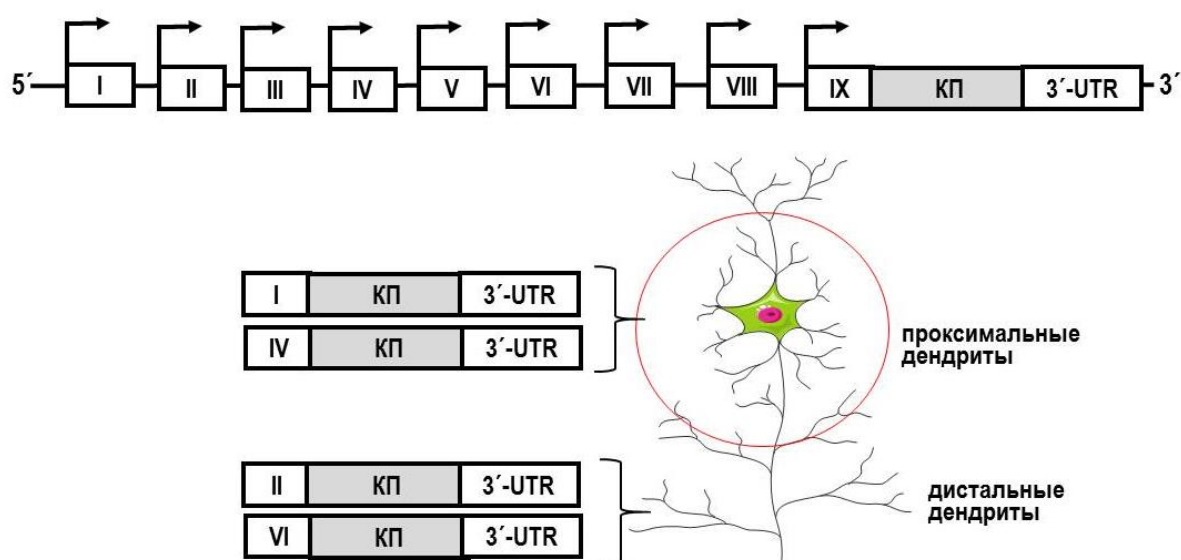


Рисунок 4 – Схема строения гена BDNF грызунов. КП – кодирующая последовательность.

Транскрипция BDNF является стимул-зависимой, инициируется при электрической активности нейронов, и определяется транскрипционными регуляторами (активаторами и репрессорами) (Рис. 5). Отмечается, что промоторы различных экзонов имеют участки связывания для специфических транскрипционных регуляторов, что является основой экзон-специфической чувствительности к различным стимулам (You, Lu, 2023). Достаточно изученными являются активатор транскрипции CREB и репрессор транскрипции MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2). При деполяризации нейронов повышается внутриклеточный уровень кальция, что является причиной последующей активации и связывания CREB с регуляторными участками гена BDNF и повышения его экспрессии (Tao et al., 1998). Способность CREB активировать транскрипцию определяется тем, что он рекрутирует к промоторным областям гена BDNF ацетилтрансферазный комплекс, состоящий из белков ко-активаторов транскрипции p300 и белка, связывающего CREB (CBP, CREB binding protein) (Flavell, Greenberg, 2008). Примечательно, что транскрипционная регуляция гена BDNF зависит от региона головного мозга и длительности воздействия стимула. CREB и его ко-активаторы играют большую роль в экспрессии BDNF в кортикальных нейронах по сравнению с нейронами гиппокампа (Esvald et al., 2022). Кроме того, активность CREB регулирует BDNF при кратковременном возбуждении нейронов и в меньшей степени регулирует экспрессию при длительной активности нейронов (Esvald et al., 2022). MeCP2, напротив, способен репрессировать активность гена BDNF за счет рекрутирования к регуляторным участкам белковых комплексов, содержащих корепрессоры транскрипции, деацетилазы и метилтрансферазы гистонов (Martinowich et al., 2003). Среди множества регуляторов транскрипции гена BDNF выделяют белковый комплекс PRC2 (polycomb repressive complex 2) обладающий гистон-метилтрансферазной активностью, при этом особая роль отводится субъединице EZH2 (enhancer of zeste 2), которая является собственно метилтрансферазой и оказывает репрессирующее действие на экспрессию гена как *in vitro* (Qi et al., 2014; Palomer et al., 2016) так и *in vivo* (Koo et al., 2015). Модификации гистонов индивидуальных промоторных областей BDNF является известным механизмом



эпигенетической регуляции транскрипции BDNF, в общем случае их ацетилирование – сопряжено с активацией транскрипции, тогда как деацетилирование, напротив, приводит к репрессии транскрипции (Рис. 5).

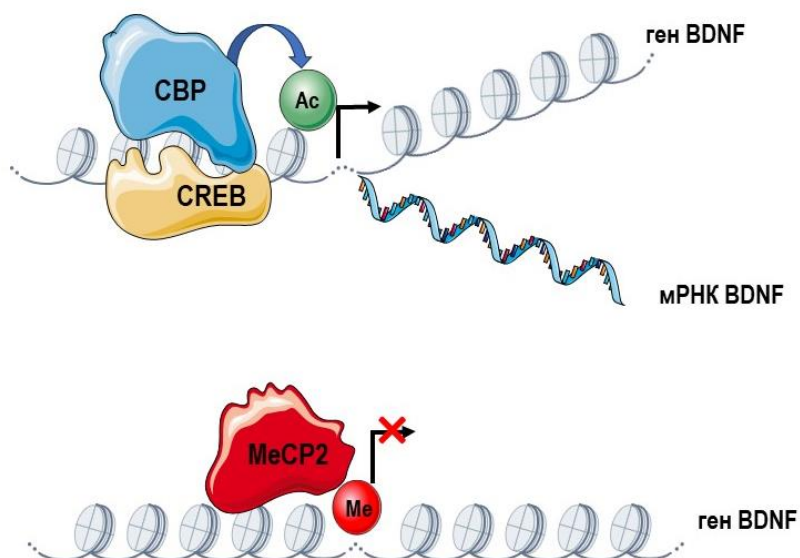


Рисунок 5 – Транскрипционная регуляция гена BDNF.

Посттранскрипционная регуляция стабильности, транспорта и трансляции мРНК, в том числе и BDNF, определяет его дальнейшую судьбу, и вовлеченность в функционирование ЦНС включает в себя механизмы опосредуемые малыми некодирующими РНК и РНК-связывающими белками (Loya et al., 2010; Карпова, 2014).

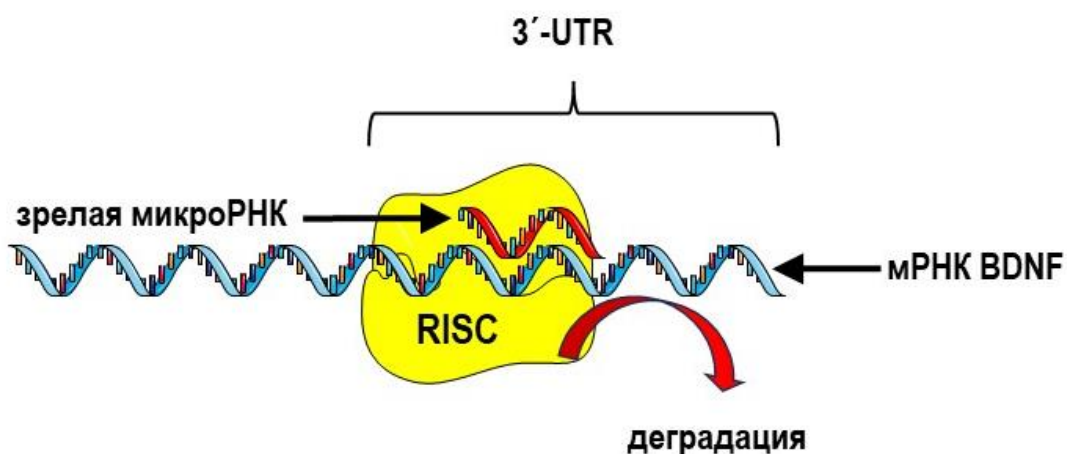


Рисунок 6 – Посттранскрипционная регуляция BDNF посредством микроРНК.

Среди прочих молекулярных процессов, регулирующих экспрессию на посттранскрипционном уровне, можно выделить регуляцию стабильности мРНК с помощью микроРНК. МикроРНК (miR) - короткие некодирующие РНК, которые способны регулировать экспрессию мРНК на посттранскрипционном уровне (Qureshi, Mehler, 2012). МикроРНК транскрибируются РНК-полимеразой II или III в виде первичной микроРНК, которая формирует вторичную структуру в виде шпильки длиной 50-120 нуклеотидов. В последующем первичная микроРНК расщепляется до предшественника – пре-микроРНК, которая экспортируется из ядра. В цитоплазме шпилька пре-микроРНК расщепляется до дуплекса, и затем формируются одноцепочечные зрелые микроРНК из каждого плеча дуплекса длиной ~ 22 нуклеотида. Зрелая микроРНК в ассоциации с комплексом белков, называемым RISC (RNA-induced silencing complex), который она направляет к специфическим мРНК посредством комплементарного взаимодействия с короткими последовательностями нуклеотидов в мРНК, инициирует деградацию мРНК мишени, тем самым, предотвращая трансляцию. МикроРНК играют ключевую роль в развитии, функционировании и пластичности нервной системы, при этом нарушения молекулярных процессов, в которые вовлечены микроРНК, могут вносить вклад в развитие заболеваний нервной системы, в том числе наркологического профиля (Heyer, Kenny, 2015). В литературе описан ряд микроРНК, для которых мРНК BDNF является экспериментально подтвержденной мишенью (Varendi et al., 2015) (Рис. 6). В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, miR-1, miR-10b, miR-155 и miR-191 способны напрямую снижать уровень BDNF связываясь с консенсусными участками, расположенными в 3'-UTR мРНК BDNF (Varendi et al., 2014). В исследовании Mellios и соавторов выявлено 10 микроРНК из пяти семейств (miR-30a-5p/b/c/d, miR-103/107, miR-191, miR-16/195, miR-495) потенциально способных ингибировать экспрессию BDNF на посттранскрипционном уровне. При этом продемонстрировано прямое участие miR-30a в регуляции уровня BDNF в ПФК человека на поздних стадиях развития и старении (Mellios et al., 2008). Описано, что miR-206 снижает содержание BDNF в ПФК крыс за счет соответствующих участков связывания в 3'-UTR (Tarosik et al.,

2014). Имеются указания на то, что микроРНК способны опосредованно регулировать экспрессию BDNF за счет регуляции факторов, участвующих в транскрипции. Так miR-212 способна репрессировать трансляцию MeCP2, негативного регулятора экспрессии BDNF, тем самым регулируя действие кокаина на экспрессию BDNF в стриатуме крыс (Im et al., 2010).

Участки связывания ряда РНК-связывающих белков представлены в 3'-UTR мРНК, что играет важную роль в регуляции ее стабильности и транспорта (Bolognani, Perrone-Bizzozero, 2008). Стабильность мРНК BDNF зависит от электрической активности нейронов и определенные области 3'-UTR BDNF вовлечены в данный процесс, при этом вторичные структуры, влияющие на доступность сайтов полиаденилирования, имеют большое значение (Fukuchi, Tsuda, 2010). Многие РНК-связывающие белки контролируют транспорт и локализацию внутри нейрона, а также трансляцию и экспрессию мРНК BDNF включая транслин (Chiaruttini et al., 2009; Wu et al., 2011), Bicaudal-D2 (Oe et al., 2016), hnRNP A/B (CBF-A) (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein CArG Box binding Factor A) (Raju et al., 2011), тристетрапролин (Kumar et al., 2014), белки связывающие цитоплазматические сайты полиаденилирования (CPEB, cytoplasmatic polyadenylation element binding proteins) (Oe, Yoneda, 2010; Vicario et al., 2015), FMR (Fragile X mental retardation protein) (Vicario et al., 2015), FUS (Qiu et al., 2014), а также белки принадлежащие к семейству антигенов Hu (также известные как ELAV (embryonic lethal abnormal vision like proteins) (Vicario et al., 2015) (Рис. 7). Белок HuD из семейства антигенов Hu является наиболее изученным РНК-связывающим белком регулирующим мРНК BDNF. Посредством связывания последовательностей богатых аденином/уридином (AREs, adenosine/uridine (A/U)-rich elements) нейрональных мРНК HuD регулирует процессинг пре-мРНК, стабильность и трансляцию мРНК тем самым являясь звеном механизмов обеспечивающих нейропластичность, обучение и память, а также патогенеза ряда заболеваний нервной системы (Bronicki, Jasmin, 2013). Согласно общим представлениям HuD специфично связывается с консервативными AREs расположенными в 3'-UTR BDNF, стабилизирует мРНК BDNF и повышает его

экспрессию *in vitro* и *in vivo* (Lim, Alkon., 2012; Allen et al., 2013; Vanevski, Xu B., 2015).

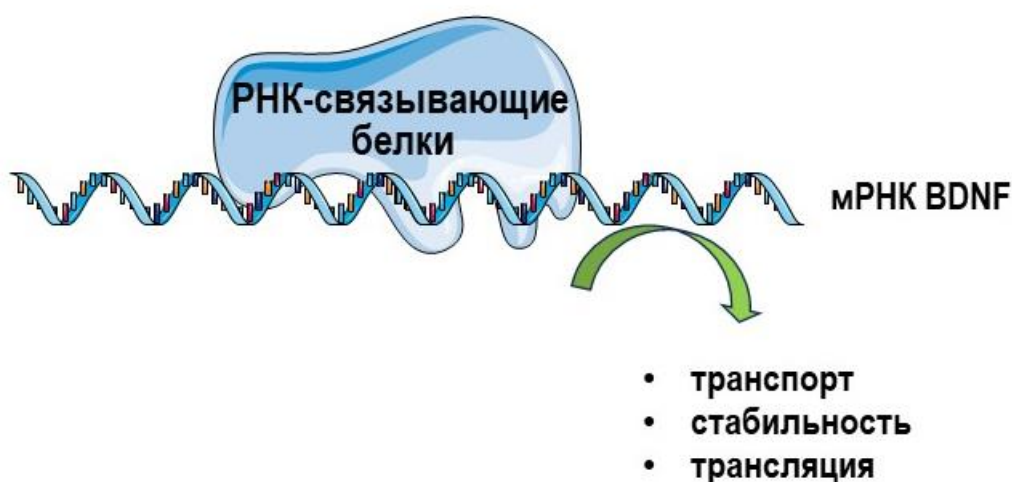


Рисунок 7 – Посттранскрипционная регуляция BDNF посредством РНК-связывающих белков.

В дополнение к вариантам мРНК, которые различаются 5'-UTR описаны изоформы мРНК BDNF, различающиеся 3'-UTR - длинный и короткий варианты (Timmusk et al., 1993). Как и в случае с экзон-специфическими вариантами мРНК BDNF с длинной и короткой 3'-UTR различаются внутриклеточной локализацией. Транскрипты с короткой 3'-UTR представлены в теле нейронов гиппокампа, тогда как с мРНК с длинной 3'-UTR также представлены в дендритах, где играет важную роль в дендритогенезе и поддержании долговременной потенции (An et al., 2008).

В эндоплазматическом ретикулуме мРНК BDNF транслируется в препропротеин, далее транслированный пептид BDNF подвергается протеолитическому созреванию, что в конечном счете определяет спектр его дальнейшей физиологической активности. После ограниченного протеолиза удаляется сигнальный пептид и образуется про-BDNF. В свою очередь про-BDNF подвергается дальнейшему протеолизу и образованию зрелого пептида и про-домена. Таким образом, речь идет о существовании нескольких белковых

продуктов гена BDNF каждый из которых проявляет физиологическую активность (Hempstead, 2015) (Рис. 8).

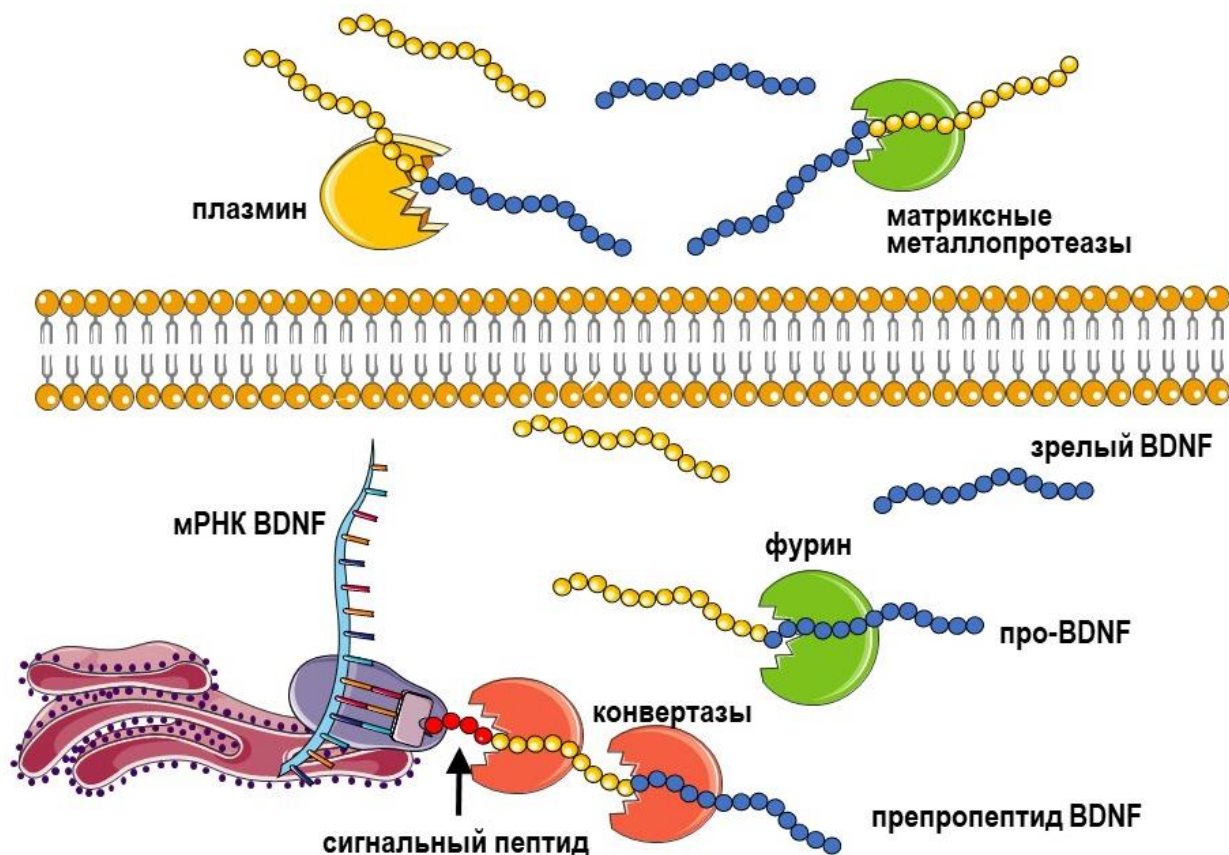


Рисунок 8 – Посттрансляционная регуляция BDNF.

Внутриклеточное созревание про-BDNF опосредуется фурином, а также другими представителями пропротеин конвертаз (Seidah et al., 1996). Внеклеточно процессинг про-BDNF обеспечивается матриксными металлопротеазами MMP-2, MMP-3, MMP-7 и MMP-9 (Hwang et al., 2005). На мышях нокаутированных по гену MMP-9 продемонстрирован дефицит зрелой формы BDNF в гиппокампе, что имеет значение в развитии судорог на модели киндлинга вызванного пентилентетразолом (Mizoguchi et al., 2011). Во внеклеточном созревании BDNF также принимает участие протеолитическая система, состоящая из активатора (tPA, plasminogen activator, tissue) тканевого плазминогена (PLG, plasminogen), который обеспечивает протеолиз плазминогена до плазмينا (Pang et al., 2004; Gray, Ellis, 2008). В результате протеолиза про-BDNF, опосредованного внеклеточной протеазой

плазмин, образуется активная зрелая форма BDNF, которая среди прочего стимулирует рост нейритов клеток PC-12 (Gray, Ellis, 2008), и имеет важное значение в поддержании долговременной потенциации в гиппокампе мышей (Pang et al., 2004).

### *1.2.2. Внутриклеточные сигнальные каскады и функционирование BDNF*

Специфичность функционирования BDNF определяется наличием соответствующих рецепторов. Связываясь со своими рецепторами и запуская специфические внутриклеточные сигнальные каскады, BDNF может играть ключевую роль в реализации синаптической пластичности при активации нервной ткани, являясь связующим звеном между синаптической активностью и долговременными структурно-функциональными перестройками синаптических связей (Chao, 2003). Зрелая форма белка BDNF и его про-форма демонстрируют различную аффинность к рецепторам, которые запускают специфические внутриклеточные сигнальные каскады. В частности, зрелая форма в форме димера связывается преимущественно с TrkB (tyrosine kinase receptor B) (Рис. 9), тогда как про-BDNF преимущественно с рецептором NGFR (nerve growth factor receptor), который известен также как p75NTR (p75 neurotrophin receptor) (Рис. 10) (Greenberg et al., 2009, Hempstead, 2015). По всей видимости, наличие специфических рецепторов, различающихся сигнальными каскадами, является основой противоположности ряда биологических эффектов, оказываемых зрелым пептидом и про-BDNF (Lu et al., 2005; Kowiański et al., 2018).

Согласно классическим представлениям, после связывания лиганда рецептор-тирозинкиназа TrkB образует гомодимеры и активируется, результатом чего является аутофосфорилирование, что составляет основу инициации нижележащих молекулярных событий (Chao, 2003; Sasi et al., 2017; Kowiański et al., 2018; Zagrebelsky et al., 2020) (Рис. 9). Фосфорилирование TrkB приводит к связыванию, фосфорилированию и активации адаптерного белка Shc. Shc инициирует каскад фосфоинозитид-3-киназа (PI3K, phosphoinositide 3-kinase)/протеинкиназа АКТ и

активирует малые ГТФазы семейства RAS, что в последующем может активировать протеинкиназы ERK. Кроме того, фосфорилирование TrkB с карбоксильного конца создает участок связывания для фосфолипазы C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), которая стимулирует высвобождение кальция из внутриклеточных депо и активацию кальций-зависимых молекулярных звеньев, регулирующих нейропластичность, например активацию CaMKII и PKC. Каждому элементу внутриклеточного сигнального каскада, инициируемого активацией рецептора TrkB, соответствует своя функция (Kowiański et al., 2018). Сигнальный каскад PI3K/AKT оказывает негативное влияние на развитие апоптоза, тем самым стимулируя выживаемость нейронов, а также модулирует синаптическую пластичность, опосредованную глутаматными рецепторами NMDA-подтипа. Стимуляцию протеинкиназы mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) посредством PI3K/AKT связывают со стимуляцией синтеза структурных белков цитоскелета, которые определяют последующий рост и ветвление дендритов. Сигнальный каскад, включающий протеинкиназы MAPK важен для активации нижележащих транскрипционных факторов, например, CREB, что является основой экспрессии генов и последующего синтеза белков цитоскелета, участвующих в синаптогенезе. Активация малых ГТФаз семейства Rho, таких как Rac1 и Cdc42, стимулирует синтез актина и микротрубочек, что является основой роста отростков нейронов и поддержания долговременной потенциации. Также выделяют дополнительные звенья каскадов, которые стимулирует связывание лиганда TrkB. Например, киназа взаимодействующая с митоген-активируемыми протеинкиназами (MNK, MAP kinase-interacting kinases), которая регулирует трансляционные процессы в условиях развития долговременной потенциации (Panja et al., 2014). TrkB не только аутофосфорилируется, но и подвержен фосфорилированию другими киназами. Так, циклин-зависимая протеинкиназа 5 (CDK5, cyclin-dependent kinase 5), фосфорилирует TrkB, что активирует малую ГТФазу Rac1 посредством белка фактора обмена гуанина TIAM1 (T cell lymphoma invasion and metastasis 1), при этом указывается, что данный механизм важен для

структурной пластичности шипиков дендритов который стимулирует BDNF (Lai et al., 2012).

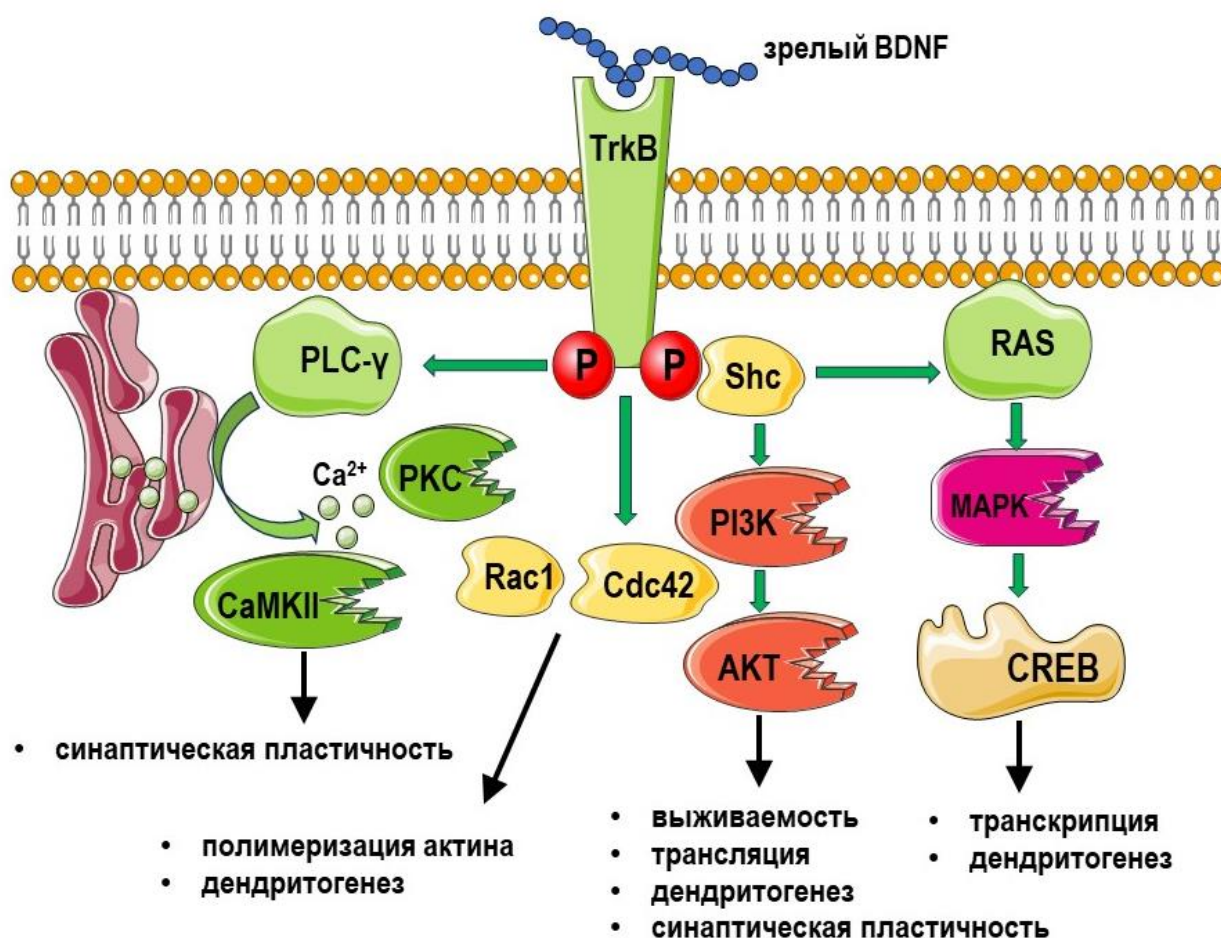


Рисунок 9 – Внутриклеточные сигнальные каскады опосредованные зрелым BDNF.

Посредством стимуляции TrkB BDNF обеспечивает выживаемость и дифференцировку нейронов *in vitro*, хотя нокаут BDNF в ЦНС не сопровождается сокращением количества нейронов, он приводит снижению плотности шипиков дендритов и ветвлению дендритов (Gao et al., 2009; Rauskolb et al., 2010). Таким образом, *in vivo* BDNF действует скорее, как фактор дифференцировки, чем выживаемости. Кроме того, BDNF, модулируя функционирование синапсов, имеет критическое значение в регуляции проведения нервного импульса. Пептид BDNF активно транспортируется к терминалям аксонов и секретируется в синаптическую щель после деполяризации мембраны (Conner et al., 1997; Dieni et al., 2012).



Показано, что BDNF повышает эффективность передачи импульса в возбуждающих синапсах (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996), но ослабляет возбудимость тормозных синапсов ГАМК-ергических интернейронов (Holm et al., 2009). Модуляция передачи нервного импульса осуществляется пресинаптически за счет влияния на эффективность высвобождения нейротрансмиттеров (Boulanger, Poو, 1999), либо постсинаптически посредством усиления действия нейротрансмиттеров с последующим изменением функциональности соответствующих рецепторов, например, NMDA-рецептора (Park, Poو, 2013). Для реализации данных механизмов влияния на передачу нервного импульса требуется связывание BDNF с рецептором TrkB, который представлен как на пре- так и на постсинаптической мембранах. Также BDNF обеспечивает реализацию феномена долговременной потенциации (Kang et al., 2007; Korte et al., 2008; Cowansage et al., 2010), и обеспечивает рост шипиков дендритов (Rex et al., 2007) тем самым регулируя функционирование зрелых нейронных сетей.

Рецептор NGFR (p75NTR) принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей, которые кодируют цитоплазматический домен смерти и индуцируют развитие апоптоза после связывания лиганда. про-BDNF активирует рецепторный комплекс NGFR-сортилин: регион, кодирующий зрелый BDNF, представленный в про-BDNF связывается с NGFR, тогда как про-домен связывается с ко-рецептором NGFR – сортилином (Teng et al., 2005). В результате связывания лиганда рецепторный комплекс NGFR рекрутирует специфические адаптерные белки, которые инициируют каскады, в конечном счете, активирующие малую ГТФазу RhoA (Ras homolog gene family member A), транскрипционный фактор NF-κB (nuclear factor kappa B) и протеинкиназу JNK (Jun N-terminal kinase), что является определяющим для функционирования рецептора (Chao, 2003; Kowiański et al., 2018) (Рис. 10). Согласно современным представлениям, активация JNK запускает процесс апоптоза, малые ГТФазы Rho связаны с развитием конусов роста и подвижностью клеток, а NF-κB регулирует выживаемость нейронов (Kowiański et al., 2018).

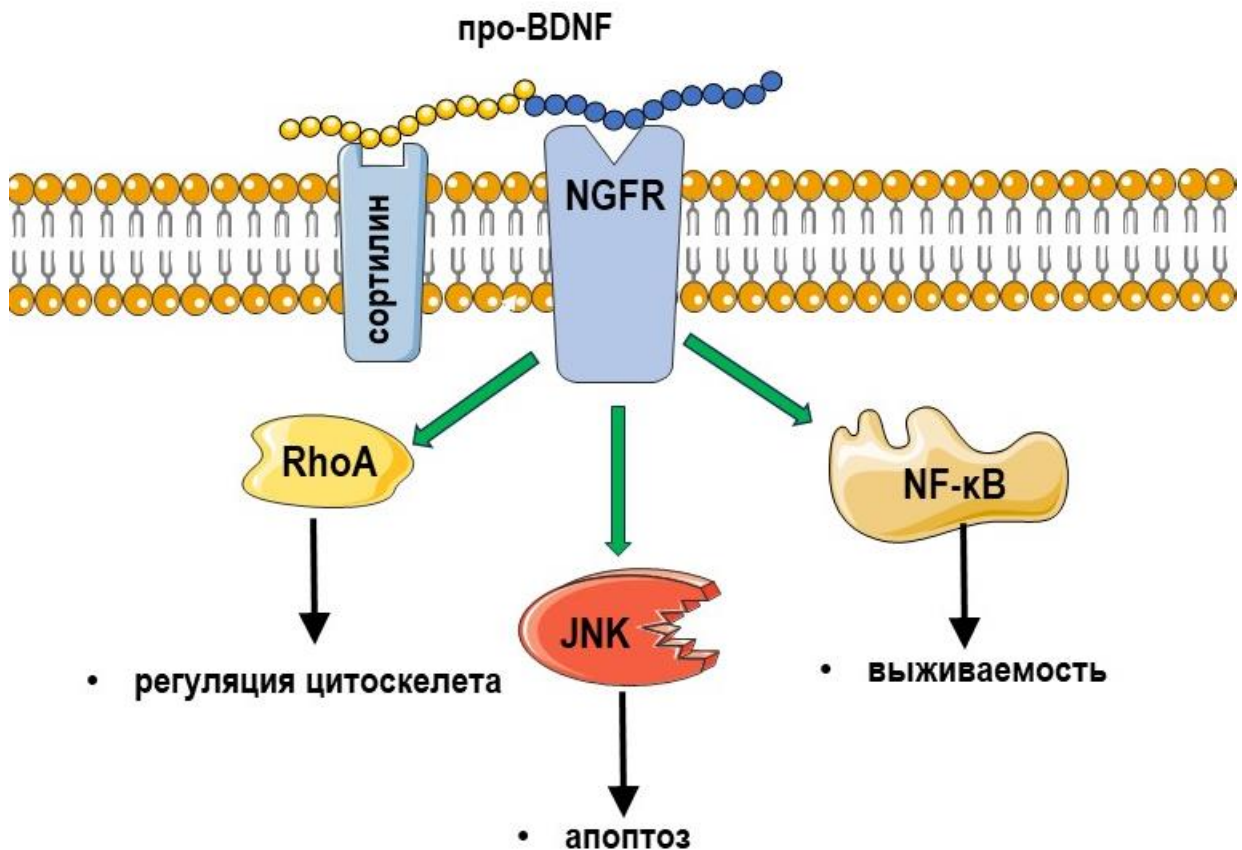


Рисунок 10 – Внутриклеточные сигнальные каскады опосредованные про-BDNF.

Как говорилось ранее в целом функция про-BDNF противоположна функции оказываемой зрелой формой. Так обработка нейронов экспрессирующих NGFR про-BDNF вызывает гибель клеток (Teng et al., 2005). Кроме того, физиологическая активность про-BDNF включает сокращение конусов роста (Anastasia et al., 2013), и отростков аксонов (Sun et al., 2012), стимуляцию долговременной депрессии зрелых нейронов (Woo et al., 2005).

Таким образом, BDNF вовлечен в механизмы регуляции структурных изменений и функциональной активности ЦНС в ответ на разнообразные стимулы. Учитывая вышеизложенное, закономерно ожидать, что изменения уровня BDNF могут быть причиной фенотипических изменений на уровне поведения. Действительно, экспериментальное манипулирование содержанием продемонстрировало, что BDNF принимает участие в регуляции научения и памяти

(Heldt et al., 2007), а также формирования таких поведенческих реакций как тревожность и депрессия (Deltheil et al., 2008; Carola et al., 2010; Sakata et al., 2010), агрессивность и пищевое поведение (Lyons et al., 1999; Ito et al., 2011).

### **1.3. BDNF как регулятор развития опишной зависимости и абстиненции**

Широкий спектр биологической активности BDNF в ЦНС определяет его вовлеченность в патогенез ряда неврологических и психиатрических заболеваний. Не является исключением и формирование химической зависимости, в частности, зависимости от опиатов. Согласно современным представлениям как острая, так и длительная интоксикация опиатами влияют на уровень BDNF в отделах головного мозга. При этом посредством экспериментальной манипуляции содержанием BDNF была продемонстрирована его функциональная значимость в реализацию фармакологических эффектов опиатов.

#### *1.3.1. Влияние опиатов на содержание BDNF в ЦНС*

Необходимым условием структурно-функциональных изменений в нервной системе, которые наблюдаются при формировании зависимости, является специфическая регуляция экспрессии генов (McClung, Nestler, 2008). В связи с чем принципиально важно понять, насколько изменяется экспрессия BDNF в ЦНС при воздействии опиатов.

Характер изменений экспрессии при острой интоксикации зависит от способа доставки опиата и от типа рецептора, с которым он преимущественно связывается, также имеет значение исследуемый регион головного мозга (Табл. 2).

Таблица 2 – Экспрессия BDNF в головном мозге грызунов при острой стимуляции опиоидных рецепторов

Агонист (преимущественный подтип опиоидного рецептора), способ введения	Экспрессия BDNF	Отдел мозга	Источник
морфин (μ), в.ж.; DAMGO (μ), в.ж.; (+)BW373U86 (δ), п.к.; β-эндорфин (μ), в.ж., эндоморфин-1 (μ), в.ж.; эндоморфин-2 (μ), в.ж.	мРНК ↑	ФК, гиппокамп, амигдала, сенсорная кора	Zhang, Ko, 2009; Torregrossa et al., 2004; Zhang et al., 2006
(+)BW373U86 (δ), в.ж.	мРНК ↑	ФК	Zhang et al., 2006
(+)BW373U86 (δ), в.ж.	мРНК =	гиппокамп, амигдала,	Zhang et al., 2006
лей-энкефалин, (μ, δ), в.ж.; мет-энкефалин (δ), в.ж.	мРНК↑	гиппокамп	Zhang et al., 2006
лей-энкефалин, (μ, δ), в.ж.; мет-энкефалин (δ), в.ж.	мРНК =	ФК, амигдала	Zhang et al., 2006
морфин (μ), п.к.; фентанил (μ), п.к.; эторфин (μ, δ, κ), п.к.	мРНК =	ФК, гиппокамп, амигдала, сенсорная кора	Zhang, Ko, 2009;
героин (μ), п.к.	мРНК, белок =	ВОП	Vargas-Perez et al., 2009
морфин (μ), в.б.	мРНК =	парагигантокле точное ядро	Hatami et al., 2007
морфин (μ), п.к.	мРНК =	ядра шва	Lunden, Kirby, 2013

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений. Способ введения: в.ж. – в желудочки головного мозга, п.к. – подкожно, в.б. – внутривенно.

Так было показано, что однократное введение морфина или DAMGO (агонист μ-опиоидных рецепторов) в желудочки головного мозга (Zhang, Ko, 2009) и подкожное введение (+)BW373U86 (агонист δ-опиоидных рецепторов) (Torregrossa et al., 2004) повышает уровень мРНК BDNF в ФК, полях CA1 и CA3 и зубчатой фасции гиппокампа, базолатеральном амигдалоидном комплексе, эндопириформном ядре и сенсорной коре крыс. При этом подкожное введение морфина, фентанила (агонист μ-опиоидных рецепторов) или эторфина (неспецифический агонист опиоидных рецепторов) не влияет на содержание мРНК BDNF в данных регионах (Zhang, Ko, 2009). Внутрижелудочковое введение (+)BW373U86 увеличивает содержание мРНК BDNF в ФК, тогда как лей- и мет-энкефалины повышают уровень мРНК BDNF в гиппокампе посредством активации μ- и δ-опиоидных рецепторов, при этом β-эндорфин, эндоморфин-1 и эндоморфин-2 значительно повышают экспрессию мРНК

BDNF в ФК, гиппокампе и амигдале (Zhang et al., 2006). Согласно работе Vargas-Perez и соавторов изменений экспрессии BDNF на уровне белка или мРНК в ВОП у крыс при острой интоксикации героином не выявляется (Vargas-Perez et al., 2009). Также согласно исследованию Lunden и Kirby содержание мРНК BDNF в ядах шва крыс не изменяется спустя 3 ч после подкожной имплантации капсулы, содержащей морфин (Lunden, Kirby, 2013). Аналогично в работе Natami и соавторов острая интоксикация морфином не сопровождается изменением экспрессии мРНК BDNF в парагигантоклеточном ядре ретикулярной формации продолговатого мозга у крыс (Natami et al., 2007). Следует отметить, что в указанных работах не уточняется какие сплайс-варианты мРНК BDNF исследовались. Следовательно, можно считать, что до настоящего момента особенности экспрессии экзон-специфической мРНК BDNF в отделах головного мозга при острой интоксикации морфином не охарактеризованы.

Характер изменений экспрессии BDNF в отделах головного мозга при субхронической интоксикации опиатами, при формировании зависимости и после отмены также неоднозначен (Табл. 3). В ряде работ описано, что опиаты при субхронической интоксикации оказывают репрессивное влияние на экспрессию BDNF в головном мозге. Так, после 6 дней интоксикации морфином уровень BDNF в плазме крови и мРНК BDNF в прилежащем ядре и медиальной ПФК крыс значительно снижается (Chen et al., 2012). Субхроническое воздействие морфина посредством подкожной имплантации капсулы или системного введения на протяжении недели снижает уровень экспрессии мРНК BDNF в ВОП у мышей (Koo et al., 2012). Напротив, экспрессия BDNF на уровне мРНК и белка может повышаться в ФК и гиппокампе мышей, получавших морфин субхронически (Wan et al., 2011). Тем не менее согласно некоторым работам субхроническое воздействие опиатов может и не оказывать влияния на экспрессию в ЦНС экспериментальных животных. В частности, указывается, что субхроническое воздействие морфина не оказывает влияния на содержание BDNF и его рецептора TrkB на уровне белка в гиппокампе мышей (Arguello et al., 2009), а также на уровне мРНК в гиппокампе крыс (Nibuya et al., 1995). Интересно, что при отмене субхронического введения опиатов, в отличие

от субхронической интоксикации, преимущественно регистрируется повышение экспрессии BDNF в отделах головного мозга. Так, период ранней абстиненции после субхронической интоксикации героином сопровождается увеличением уровня мРНК и белка BDNF в ВОП у крыс, при этом при продолжительной отмене после субхронической интоксикации изменений не наблюдается (Vargas-Perez et al., 2009). В работе Yu и соавторов установлено, что уровень белка BDNF повышался при субхронической интоксикации морфином и еще более выраженное повышение было выявлено при отмене морфина в ПФК, ГП и гиппокампе, но не в прилежащем ядре или ВОП (Yu et al., 2011). Тогда как содержание мРНК BDNF в ПФК, ГП и гиппокампе, но не в прилежащем ядре или ВОП, повышалось при отмене и только в ПФК при интоксикации (Yu et al., 2011). Субхроническая интоксикация морфином, и в большей степени его индуцированная отмена сопровождаются повышением мРНК BDNF в ГП, но не ВОП, при этом отмечается незначительное, но достоверное увеличение экспрессии рецептора BDNF - TrkB в ВОП и ГП на начальных этапах отмены (Numan et al., 1998). Содержание мРНК BDNF в парагигантоклеточном ядре - главном афференте ГП увеличивается, начиная с 6 ч отмены до 72 ч после спонтанной отмены интоксикации морфином у зависимых крыс (Natami et al., 2007). На модели самовведения героина после 2 недель вынужденной абстиненции уровень мРНК BDNF в ПФК крыс значительно повышается, что сопровождается усилением положительного подкрепления, связанным с действием героина (Kuntz-Melcavage et al., 2009). Также согласно исследованию Lunden и Kirby содержание мРНК BDNF повышается в ядрах шва у крыс при индуцированной отмене морфина (Lunden, Kirby, 2013). Подобно предыдущим работам субхроническая интоксикация героином приводит к снижению экспрессии BDNF в прилежащем ядре крыс, тогда как индуцированная и спонтанная отмена, напротив, сопровождаются увеличением экспрессии (Li et al., 2017). Тем не менее при абстиненции может наблюдаться снижение числа клеток экспрессирующих BDNF, а также содержания белка BDNF в ВОП, что сопряжено со снижением размера дофаминергических нейронов в данной области мозга (Chu

et al., 2007). В работах перечисленных в Табл. 3 не уточняется какие сплайс-варианты мРНК BDNF исследовались.

Таблица 3 – Экспрессия BDNF в головном мозге грызунов при длительном действии опиатов

Агонист, модель	Экспрессия BDNF	Отдел мозга	Источник
морфин, интоксикация	мРНК ↓	ПФК, прилежащее ядро	Chen et al., 2012
морфин, интоксикация	мРНК ↓	ВОП	Koo et al., 2012
морфин, интоксикация	мРНК, белок ↑	ФК, гиппокамп	Wan et al., 2011
морфин, интоксикация	мРНК, белок =	гиппокамп	Nibuya et al., 1995; Arguello et al., 2009
морфин, отмена (16 ч)	мРНК, белок ↑	ВОП	Vargas-Perez et al., 2009
морфин, отмена (15 дн)	мРНК, белок =	ВОП	Vargas-Perez et al., 2009
морфин, интоксикация, индуцированная отмена	мРНК, белок =	ВОП, прилежащее ядро	Yu et al., 2011
морфин, интоксикация, индуцированная отмена (2 ч, 6 ч)	мРНК =	ВОП	Numan et al., 1998
морфин, интоксикация, индуцированная отмена	белок ↑	ПФК, ГП, гиппокамп	Yu et al., 2011
морфин, интоксикация, индуцированная отмена	мРНК ↑	ПФК	Yu et al., 2011
морфин, интоксикация	мРНК =	ГП, гиппокамп	Yu et al., 2011
морфин, интоксикация, индуцированная отмена (2 ч, 6 ч, 20 ч, 70 ч)	мРНК ↑	ГП	Numan et al., 1998
морфин, отмена (6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч)	мРНК ↑	парагигантоклеточное ядро	Hatami et al., 2007
героин; отмена (14 дн)	мРНК ↑	ПФК	Kuntz-Melcavage et al., 2009
морфин, индуцированная отмена	мРНК ↑	ядра шва	Lunden, Kirby, 2013
морфин, отмена (3 ч, 24 ч, 14 дн)	количество BDNF-позитивных клеток ↓, белок ↓	ВОП	Chu et al., 2007

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений.

Посттранскрипционная модификация гистонов и ДНК, а также репертуар транскрипционных факторов и их ко-регуляторов представленных в районе регуляторных участков ряда генов, включая BDNF, определяют их экспрессию, что может иметь критическое значение в процессе формирования опиоидной зависимости (Browne et al., 2020). Транскрипционная регуляция промоторных областей определенных экзонов определяет особенности их экспрессии в контексте воздействия опиатов (Табл. 4).

Таблица 4 – Транскрипционная регуляция BDNF при действии опиатов

Агонист, модель	Экспрессия BDNF	Элемент регуляции	Отдел мозга	Источник
морфин, интоксикация	мРНК экзон I, IV ↑	ацетилтрансферазная активность CBP ↑	околосредоводное серое вещество	Matsushita, Ueda, 2009
морфин, отмена (7 дн)	мРНК ↑	H3K9me3 в районе промоторов экзонов II и III ↓	ВОП, ГП	Mashayekhi et al., 2012
	мРНК ↑	H3K9ac, H3K14ac в районе промотора экзона II ↑	ГП	
морфин, сенситизация поведения	белок ↑	H3K9ac ↑	вентролатеральная орбитофронтальная кора	Wei et al., 2016
морфин, УРПМ	белок и мРНК ↑	H3K9ac, CREB ↑	базолатеральная амигда	Wang et al., 2015
морфин, отмена (14 дн)	мРНК экзон II, IV и VI ↓	H3K27me3 ↑, EZH2 ↑, NURR1 ↓, CREB ↓ в районе промоторов BDNF	ВОП	Koo et al., 2015
морфин, условно-рефлекторное избегание места (острая отмена)	белок и мРНК ↑	CREB и H3ac в районе промотора экзона I ↑	ПФК	Wang et al., 2012
морфин, УРПМ	белок ↓	G9a в районе промоторов экзонов II и IV ↑	амигда	Zhang et al., 2014
морфин, УРПМ	белок и мРНК ↑	RACK1 ↑	гиппокамп, ПФК	Wan et al, 2011

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений.



В работе Matsushita и Ueda (2009) указывается на специфику экспрессии вариантов мРНК BDNF соответствующих экзонам I и IV, а также транскрипта с общим экзоном VI, кодирующего белок BDNF которые повышались на 6 день интоксикации морфином в околосинаптическом сером веществе мышей. Авторы показали, что куркумин (натуральное соединение, которое известно своей способностью ингибировать гистон ацетилтрансферазную активность CBP), при субхронической интоксикации морфином предотвращал повышение уровня мРНК BDNF, содержащей экзона I и IV в околосинаптическом сером веществе у мышей (Matsushita, Ueda, 2009). Посттранскрипционная модификация гистонов в регуляторных областях генов является эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии. Таким образом, повышение экспрессии специфических экзонов BDNF при субхроническом воздействии морфина может быть связано со специфическими модификациями хроматина в соответствующих регуляторных областях. Так в исследовании Mashayekhi и соавторов показано, что на 7 день отмены после интоксикации морфином в течение 11 дней отмечается повышение уровня общей мРНК BDNF, что сопровождалось снижением уровня гистона H3 триметилированного в положении K9 (H3K9me3 маркер хроматина с которого не идет транскрипция) в районе промоторов BDNF II и III как в ВОП так и ГП, и увеличением уровня маркера активного хроматина - гистона H3 ацетилированного в положениях K9 и K14 (H3K9ac и H3K14ac, соответственно) в районе промотора II только в ГП (Mashayekhi et al., 2012). При этом отмечается, что спустя 2 или 24 ч после интоксикации подобных изменений не отмечалось (Mashayekhi et al., 2012). Локальная инъекция ингибитора деацетилаз гистонов трихостатина А в вентролатеральную орбитофронтальную кору стимулирует сенситизацию морфин-индуцированного поведения, что сопровождается увеличением уровня BDNF и ацетилированного гистона H3K9ac (Wei et al., 2016). Схожие результаты получены после инъекций трихостатина А в амигдалу крыс: подкрепляющие свойства морфина в модели условной реакции предпочтения места (УРПМ) повышались, что сопровождалось сочетанным увеличением уровней BDNF, CREB и ацетилированного гистона H3K14ac (Wang et al., 2015). Экспрессию гена BDNF в

условиях воздействия опиатов могут опосредовать транскрипционные факторы NURR1 (nuclear receptor related-1) (Koo et al., 2015) и CREB (Koo et al., 2015, Wang et al., 2012), белки, эпигенетически регулирующие транскрипцию, такие как MeCP2 и G9a (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2) (Zhang et al., 2014), а также RACK1 (receptor for activated C kinase 1) (Wan et al., 2011). На модели условно-рефлекторного избегания места, связанного с острой отменой морфина показано, что при ослаблении памяти о негативных переживаниях связанных с острой отменой наблюдается увеличение уровня транскрипционного фактора CREB, связанного с промотором экзона I гена BDNF, а также уровня ацетилированного гистона H3 в данном регионе, что сопровождается увеличением уровня мРНК и белка BDNF в вентромедиальной ПФК крыс (Wang et al., 2012). При этом указывается, что данные изменения определяются активностью деацетилаз гистонов и протеинкиназы ERK, которые в свою очередь контролируются глутаматергической нейромедиаторной системой (Wang et al., 2012). Опиаты вызывают снижение экспрессии мРНК BDNF, содержащей общий экзон IX, в ВОП у лиц с зависимостью от героина, а также у грызунов на различных моделях, связанных с субхроническим воздействием опиатов (самовведение героина, отмена субхронической интоксикации морфином и УРПМ связанная с введением морфина) (Koo et al., 2015). При этом во время длительной абстиненции (14 дн) после субхронического введения морфина в ВОП также отмечается снижение мРНК BDNF, содержащих экзоны II, IV и VI, но не экзон I (Koo et al., 2015), что сопровождается увеличением уровня репрессивных модификаций гистонов - триметилированного гистона H3 в положении K27 (H3K27me3) в промоторных областях гена BDNF, увеличения роли ко-репрессорных белков составляющих метилтрансферазный комплекс PRC2 таких как EZH2 и снижения взаимодействия активирующих транскрипционных факторов, таких как NURR1 и CREB (Koo et al., 2015). Было оказано, что в центральном ядре амигдалы метилтрансфераза G9a связывается с промоторами BDNF соответствующих экзонам II и IV и оказывает репрессивное действие на экспрессию, при этом ингибирование G9a сопровождается увеличением уровня BDNF и усилением подкрепляющего эффекта морфина в тесте УРПМ (Zhang et al.,

2014). Введение в желудочки головного мозга интерферирующих мРНК к ядерному белку RACK1 (receptor for activated C kinase 1), который способен проникать в ядро и участвовать в посттрансляционной модификации хроматина в районе промоторных областей гена BDNF тем самым стимулирует его экспрессию, предотвращает выработку УРПМ, снижая экспрессию BDNF в гиппокампе и ПФК (Wan et al, 2011). Таким образом к настоящему времени особенности и механизмы экспрессии экзон-специфических мРНК BDNF в отделах головного мозга при опиоидной абстиненции практически не охарактеризованы.

При том, что есть некоторые данные относительно транскрипционной регуляции гена BDNF в условиях действия опиатов, посттрансляционный контроль уровня BDNF остается практически не исследованным. Согласно нескольким работам miR-212/132, miR-219 и miR-375 могут опосредованно влиять на содержание BDNF в модельных системах. В частности, при воздействии морфина на эмбрионы рыбок *Danio rerio* miR-212/132 определяют паттерн экспрессии BDNF, судя по всему, посредством прямого негативного влияния на эпигенетический регулятор BDNF - MeCP2 (Jimenez-Gonzalez et al., 2016). Кроме того, установлено, что miR-219 (Hu et al., 2016) и miR-375 (Li et al., 2017) регулируют толерантность к антиноцицептивному эффекту морфина за счет опосредованной регуляции уровня BDNF в ганглиях задних корешков спинного мозга мышей. Так miR-219 (Hu et al., 2016) и miR-375 (Li et al., 2017) способны регулировать уровень BDNF в данных условиях за счет прямого влияния на протеинкиназы CaMKII-γ и JAK2 (Janus kinase 2), соответственно. Роль РНК-связывающих белков в регуляции уровня BDNF в условиях воздействия морфина до настоящего времени также практически не исследована. Тем не менее известно, что HuD, как наиболее исследованный посттрансляционный регулятор BDNF может быть вовлечен реализацию эффектов другого психоактивного вещества – кокаина, что может определять перспективность исследований в данном направлении. Tiruchinaralli и соавторы (2008) продемонстрировали, что экспрессия HuD, а также его валидированных мишеней BDNF и CaMKII повышаются под действием кокаина. Более того HuD проявляет функциональную активность в развитии зависимости от кокаина.

Экспрессия HuD на уровне мРНК и белка повышается в прилежащем ядре стриатума у мышей в результате реализации модели УРПМ, ассоциированного с кокаином, тогда как трансгенные мыши с повышенным уровнем HuD демонстрируют увеличение выраженности УРПМ, ассоциированного с кокаином (Oliver et al., 2018). Таким образом, представляется, что РНК-связывающие белки, прежде всего HuD, могут быть потенциальными регуляторами BDNF в условиях развития опиоидной зависимости. Немногочисленными работами продемонстрированы закономерности созревания BDNF в отделах головного мозга грызунов в процессе формирования зависимости от морфина. Bachis и соавторы продемонстрировали увеличение как зрелого белка BDNF так и про-формы в ФК не только при спонтанной отмене морфина, но и при субхронической интоксикации, при этом отмена в большей степени сопровождается повышением про-BDNF, что отражается снижением отношения зрелый BDNF/про-BDNF (Bachis et al., 2017). Кроме того, в данном исследовании было установлено, что повышение уровня про-BDNF связано с дефицитом протеолитической системы tPA (фурин и матриксные металлопротеазы не изменялись), которая контролирует эффективность созревания пептида BDNF при интоксикации и спонтанной отмене морфина (Bachis et al., 2017). На третий день спонтанной отмены морфина отмечается рост содержания про-BDNF и NGFR, а также активация протеинкиназы JNK (изменений уровня зрелого BDNF, TrkB, а также активных ERK и CREB не наблюдалось) в гиппокампе мышей, при этом фармакологическая коррекция выраженности синдрома отмены сопровождается нормализацией каскада про-BDNF/NGFR/JNK (Martins et al., 2020). При этом показано, что интенсификация апоптоза в гиппокампе мышей при отмене морфина связана с NGFR/JNK (Asuni et al., 2021).

Подытоживая, можно заключить, что изменение содержания BDNF в отделах ЦНС при субхроническом воздействии опиатов и формировании зависимости является установленным фактом. Тем не менее механизмы транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии BDNF в данных условиях не установлены.

### 1.3.2. Функциональная роль BDNF при действии опиатов

Экспериментальная манипуляция уровнем BDNF при действии опиатов позволяет модулировать их фармакологические свойства прежде всего положительное подкрепляющее действие, развитие толерантности, а также формирование зависимости и манифестацию синдрома отмены (Табл. 5).

Таблица 5 – Функциональная роль BDNF при действии опиатов

Агонист, модель	Показатель	Взаимосвязь с BDNF	Источник
морфин, интоксикация	тирозингидроксилаза в ВОП ↑; активность протеинкиназы A и AЦ в прилежащем ядре ↑	введение BDNF в ВОП нормализует уровень тирозингидроксилазы в ВОП, а также активность протеинкиназы A и AЦ в прилежащем ядре	Berhow et al., 1996
морфин, интоксикация	активность ERK ↑	введение BDNF в ВОП нормализует активность ERK	Berhow et al., 1996
морфин, интоксикация	объем дофаминергических нейронов ↓	введение BDNF в ВОП нормализует объем дофаминергических нейронов	Skclair-Tavron et al., 1996
морфин, УРПМ	положительное подкрепление	введение BDNF в ВОП стимулирует дофамин-зависимый положительный подкрепляющий эффект	Vargas-Perez et al., 2009
морфин, УРПМ	положительное подкрепление	ингибирование сигналинга BDNF через рецептор TrkB в ВОП стимулирует положительный подкрепляющий эффект морфина	Koo et al., 2012
морфин, интоксикация	развитие толерантности к анальгетическому эффекту	блокирующие антитела к BDNF (в.ж.) предотвращают развитие толерантности	Matsushita, Ueda, 2009
морфин, индуцированная отмена	выраженность синдрома отмены	условный нокаут гена BDNF снижает тяжесть абстиненции	Akbarian et al., 2002
морфин, индуцированная отмена	выраженность синдрома отмены	антагонист рецептора TrkB ANA-12 (в.б.) усиливает тяжесть абстиненции	Khalil-Khalili et al., 2018
морфин, спонтанная отмена	выраженность синдрома отмены	антагонист рецептора TrkB ANA-12 (в.б.) усиливает тяжесть абстиненции	Rezamohammadi et al., 2020
морфин, индуцированная отмена	выраженность синдрома отмены	миметик BDNF ГСБ-106 (в.б.) снижает тяжесть абстиненции	Колик и соавт. 2020

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение. Способ введения: в.ж. – в желудочки головного мозга, в.б. – внутривенно.

Введение BDNF в ВОП крыс предотвращает характерные для субхронической интоксикации морфином нейрохимические изменения в ЦНС: увеличение уровня тирозингидроксилазы в данной области, повышение активности цАМФ-зависимой протеинкиназы А и АЦ в прилежащем ядре стриатума (Verhow et al., 1996), а также предотвращает повышение активности митоген-активируемой протеинкиназы ERK в ВОП (Verhow et al., 1995). Кроме того, было показано, что BDNF может восстанавливать структуру нейронов при опийной интоксикации. Так, инфузии BDNF в ВОП предотвращают снижение объема и изменение формы дофаминергических нейронов данной области (Skclair-Tavron et al., 1996). В исследовании Russo и соавторов указывается, что один из сигнальных каскадов, иницируемый BDNF - каскад белок-адаптер IRS2 (Insulin receptor substrate 2) /протеинкиназа АКТ в ВОП может играть важную роль в регуляции морфологических изменений дофаминергических нейронов при субхроническом воздействии морфина, а также положительного подкрепляющего эффекта морфина (Russo et al., 2007).

Однократная инъекция BDNF в ВОП стимулирует дофамин-зависимый положительный подкрепляющий эффект опиатов, что основано на способности BDNF стимулировать возбуждающую активность ГАМК-А рецептора на ГАМК-ергических нейронах ВОП (Vargas-Perez et al., 2009). В работе Коо и соавторов, напротив, указывается, что BDNF подавляет положительный подкрепляющий эффект морфина. Так, ингибирование сигналинга BDNF через рецептор TrkB в ВОП увеличивает способность морфина стимулировать активность дофаминергических нейронов в данной области и положительный подкрепляющий эффект морфина, зависимый от проекций нейронов ВОП в прилежащее ядро (Коо et al., 2012). При этом с помощью полногеномного исследования содержания мРНК в прилежащем ядре выявлены гены, которые могут опосредовать данный эффект BDNF, в частности была валидирована роль транскрипционного фактора SOX11 (SRV-Box Transcription Factor 11) и предраннего гена GADD45- $\gamma$  (Growth Arrest And DNA Damage Inducible Gamma) в прилежащем ядре при реализации положительного подкрепляющего эффекта морфина (Коо et al., 2012). Кроме того, в нескольких исследованиях есть косвенные указания на то, что BDNF может быть вовлечен в

реализацию положительного подкрепляющего эффекта опиатов (Wan et al., 2011; Chen et al., 2012). BDNF участвует в реализации развития толерантности к анальгетическому эффекту у мышей что было продемонстрировано при введении блокирующих антител к BDNF в желудочки головного мозга (Matsushita, Ueda, 2009). BDNF также может быть вовлечен в реализацию негативных аспектов опиоидной зависимости – в первую очередь, абстиненции. Ингибирование сигналинга, опосредованного BDNF, предотвращает развитие условно-рефлекторного избегания места, связанного с острой отменой морфина (Wang et al., 2012; Ju et al., 2015). У мышей, нокаутированных по гену BDNF, тяжесть синдрома отмены морфина, вызванного введением налоксона, снижается, что проявляется в меньшей выраженности как соматических, так и вегетативных признаков абстиненции (Akbarian et al., 2002). Кроме того, в адренергических нейронах ГП у животных с нокаутированным геном BDNF отмечаются более выраженные нарушения функционирования, характерные для опиоидной интоксикации (Akbarian et al., 2002). С другой стороны, воздействие на систему BDNF-TrkB посредством фармакологических инструментов показывает, что данный каскад, напротив, противодействует как формированию зависимости, так и ее манифестации у крыс. Однократное системное введение антагониста рецептора TrkB – ANA-12 усиливает выраженность индуцированного синдрома отмены морфина (Khalil-Khalili et al., 2018). Также субхроническое системное введение ANA-12 на протяжении формирования зависимости от морфина усиливает выраженность спонтанного синдрома отмены морфина (Rezamohammadi et al., 2020). Напротив, как однократное, так и субхроническое введение низкомолекулярного миметика 4-й петли BDNF - соединения ГСБ-106 снижало суммарный индекс индуцированного синдрома отмены морфина (Колик и соавт. 2020). Так же есть косвенные указания на вовлеченность BDNF в формирование зависимости от опиатов и сопутствующих нарушений. Так добровольная двигательная активность в колесе предотвращает нарушения пространственной памяти и ослабляет выраженность зависимости у мышей, получавших морфин субхронически, при этом отмечается повышение уровня белка BDNF в гиппокампе, а ингибирование сигналинга, опосредованного BDNF, в

гиппокампе ослабляет эффект добровольной двигательной активности на память при морфинизации (Miladi-Gorji et al., 2011). Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует, что системное воздействие на сигнальные каскады, инициируемые BDNF, может модифицировать формирование зависимости и манифестацию абстиненции. Тем не менее способность внутримозгового введения BDNF влиять на данные процессы не изучена. Учитывая, что ранее неоднократно было продемонстрирована способность BDNF регулировать адаптационные процессы в контексте воздействия опиатов в ВОП, можно полагать, что его локальное введение в данную область может также влиять на опииную абстиненцию.

### *1.3.3. Взаимосвязь BDNF с клиническими проявлениями опиинной зависимости*

При том, что в ходе большого количества работ на экспериментальных животных установлена определенная роль BDNF в реализации действия опиатов, исследования BDNF у больных с опиинной зависимостью не так многочисленны и зачастую противоречивы. Тем не менее результаты работ, выполненных на клиническом материале, демонстрируют потенциальную вовлеченность BDNF в течение опиинной зависимости. Учитывая ограниченность методических подходов в работе с клиническим материалом, на данный момент существует только два направления: выявление взаимосвязи циркуляторного уровня BDNF или структурных особенностей соответствующего гена с клиническими проявлениями течения опиинной зависимости.

Известно, что у больных с зависимостью от опиатов, проходящих заместительную терапию, по сравнению со здоровыми уровень BDNF в сыворотке крови повышен, при этом отмечается положительная корреляция с выраженностью влечения к наркотику (Heberlein et al., 2011). Повышенный уровень BDNF в сыворотке у лиц с зависимостью от героина не достигал нормальных значений спустя месяц воздержания (Zhang et al., 2014). Кроме того, указывается, что уровень BDNF в сыворотке крови зависимых от героина выше, чем у здоровых, однако он не связан с дефицитом когнитивных функций (Luan et al., 2017). Согласно другому



исследованию, уровень BDNF в сыворотке и плазме крови был снижен у потребителей героина со сформированной зависимостью (Angelucci et al., 2007; Chen et al., 2015). Пониженный уровень BDNF в сыворотке крови по сравнению со здоровыми повышается в течение длительной абстиненции в течение 26 недель и отрицательно коррелирует с выраженностью симптомов длительной отмены опиатов, но все равно не достигает нормальных значений (Zhang et al., 2016). Более того согласно мета-анализу уровень BDNF в плазме крови как у активных потребителей героина, так и при абстиненции ниже, чем в контрольной выборке (Ornell et al., 2018). Таким образом, очевидно, что периферический уровень BDNF у больных опиоидной зависимостью может быть отличным от здоровых, при этом он может изменяться в стадии ремиссии и под действием лекарственных средств, однако на данный момент клиническая значимость данного показателя остается сомнительной и делается акцент на необходимости дополнительных исследований (Palma-Álvarez et al., 2017).

Наиболее изученным полиморфным локусом гена BDNF является rs6265, который приводит к замене валина на метионин в положении 66 (Val66Met), что может иметь значение в созревании, локализации и секреции белка. Носители однонуклеотидного полиморфизма rs6265 в гене BDNF характеризуются меньшим объемом некоторых отделов головного мозга, а также нарушением памяти (Hariri et al., 2003; Egan et al., 2003). У носителей гетерозигот полиморфизма rs6265 отмечается более ранний дебют употребления героина по сравнению с носителями гомозиготных генотипов (Hou et al., 2010). Также носители аллеля Met полиморфизма rs6265 демонстрируют более выраженную тягу к употреблению героина. (Greenwald et al., 2012). Полиморфные локусы гена BDNF rs6265, rs11030104 и rs10767664 могут быть связаны с пониженным риском развития зависимости от героина в китайской популяции (Jin et al., 2016). С другой стороны, в китайской популяции лиц, зависимых от героина, не обнаружено различий в частоте распределения аллелей и генотипов rs6265, также носительство данного полиморфизма не связано с уровнем BDNF в плазме крови (Chen et al., 2015). В работе de Cid и соавторов, в которой исследовали взаимосвязь между носительством однонуклеотидных полиморфизмов в гене BDNF

человека и эффективностью метадоновой заместительной терапии у больных с опиоидной зависимостью, был выявлен гаплотип CCGCCG шести полиморфизмов (rs7127507, rs1967554, rs11030118, rs988748, rs2030324 и rs11030119), у носителей которого эффективность терапевтической программы была снижена (de Cid et al., 2008).

#### **1.4. Взаимодействие NO и BDNF в контексте развития опиоидной зависимости и абстиненции**

Среди прочих нейрохимических систем участвующих в реализации эффектов морфина активно исследуется оксид азота (NO). NO является газообразным соединением, выполняющим в нервной системе роль внутри- и межклеточного посредника (Garthwaite, 2008). NO образуется из аминокислоты L-аргинина в реакции, которую катализирует фермент NO-синтаза (NOS). Выделяют несколько изоформ NOS – кальций-зависимые нейрональная и эндотелиальная, а также кальций-независимая индуцибельная. Основной внутриклеточной мишенью NO является растворимая гуанилатциклаза (pГЦ). NO образует нитрозильные комплексы с гемовым железом, входящим в активный центр данного фермента, что вызывает активацию pГЦ и образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) (Garthwaite, Boulton, 1995; Garthwaite, 2008). цГМФ является внутриклеточным посредником, регулирующим многочисленные внутриклеточные процессы, среди его эффекторов выделяют ионные каналы, протеинкиназы и фосфодиэстеразы (Garthwaite, 2008).

##### *1.4.1. Нитрергическая система как медиатор развития опиоидной зависимости и абстиненции*

Воздействие опиатов сопровождается изменением активности сигнального каскада NO/цГМФ в ЦНС (Leza et al., 1995; Leza et al., 1996; Kumar, Bhargava, 1997; Bhargava, Cao, 1997; Cuellar et al., 2000). При этом NO вовлечен в реализацию эффектов опиатов, таких как двигательная и мотивационная сенситизация,

анальгезия, положительное подкрепление, толерантность, зависимость и манифестация абстинентного синдрома (Tayfun Uzbay, Oglesby, 2001; Toda et al., 2009; Motahari et al., 2016).

Согласно данным литературы, отмена субхронического введения агонистов опиоидных рецепторов может сопровождаться изменениями активности NOC в отделах головного мозга. В работе Leza и соавторов при индуцированной отмене морфина наблюдали увеличение активности NOC в мозжечке (Leza et al., 1996). В работе Cuéllar и соавторов (2000) выявили повышение активности кальций-зависимой NOC в мозжечке, но не в ФК, как при субхронической морфинизации, так и после индукции отмены введением налоксона. Кроме того, после индукции отмены налоксоном Cuéllar и соавторы (2000) зарегистрировали увеличение иммунореактивности нейрональной NOC гипоталамусе и ГП. Тем не менее активность NOC в условиях отмены может и не изменяться, так, через 24 ч после отмены морфина активность NOC не изменялась в мозжечке, СМ и коре больших полушарий у мышей (Kumar, Bhargava, 1997). Агонисты  $\kappa$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов также могут влиять на активность NOC в ЦНС в условиях абстиненции. Так отмена введения агониста  $\kappa$ -опиоидных рецепторов U-50,488H сопровождается повышением активности NOC в коре больших полушарий, но остается неизменной в мозжечке, СМ и спинном мозге мышей (Bhargava, Kumar, 1997). При отмене агониста  $\delta$ -опиоидных рецепторов DPDPE у мышей выявлено снижение активности NOC в коре больших полушарий, мозжечке и спинном мозге, однако в СМ установлено значительное увеличение активности NOC при этом в стриатуме изменений выявлено не было (Bhargava, Cao, 1998). Таким образом, до настоящего времени было проведено сравнительно немного исследований посвященных активности NOC при отмене агонистов опиоидных рецепторов при этом нет четких представлений о характере изменений. Также нет конкретных представлений об изменении концентрации цГМФ в отделах головного мозга при отмене опиатов. В частности, уровень цГМФ в стриатуме и мозжечке значительно повышается через 24 или 72 ч отмены морфина (Volicer et al., 1977). С другой стороны, ни интоксикация синтетическим опиоидом метадоном ни его отмена не

сопровождается изменением уровня цГМФ в стриатуме, амигдале, околотоводопроводном сером веществе и таламусе (Sadava, Mack, 1986). В работе Bhargava и Cao мыши подвергались субхроническому воздействию морфина, U-50,488H или DPDPE (агонисты  $\mu$ -,  $\kappa$ - и  $\delta$ -опиоидных рецепторов, соответственно), и после отмены препаратов регистрировали концентрацию цГМФ в гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, коре, СМ, мосте, мозжечке и спинном мозге (Bhargava, Cao, 1997). При отмене морфина наблюдали увеличение содержания цГМФ в стриатуме и мосте, при отмене U-50,488H в мосте, тогда как отмена DPDPE сопровождалась повышением в мосте и снижением в мозжечке и спинном мозге (Bhargava, Cao, 1997). Кроме работы Liang и Clark (2004) в литературе нет данных относительно количественных изменений уровня ферментов, катализирующих синтез компонентов сигнального каскада NO/цГМФ в центральной нервной системе при воздействии агонистов опиоидных рецепторов. Согласно результатам данной работы в поясничном отделе спинного мозга мышей, которые субхронически подвергались действию морфина, посредством подкожной имплантации капсулы с морфином наблюдалось повышение содержания как нейрональной NOC, так и  $\alpha 1$  субъединицы ГЦ на уровне белка и мРНК (Liang, Clark, 2004). Таким образом, длительное воздействие агонистов опиоидных рецепторов сопровождается изменением активности каскада NO/цГМФ, при этом характер изменений зависит от исследованного отдела мозга и фармакологического профиля агониста (Табл. 6).

Таблица 6 – Активность каскада NO/цГМФ в ЦНС при длительном воздействии агонистов опиоидных рецепторов

Агонист (преимущественный подтип опиоидного рецептора), модель	Показатель	Отдел мозга	Источник
морфин ( $\mu$ ), индуцированная отмена	активность NOC $\uparrow$	мозжечок	Leza et al., 1996
морфин ( $\mu$ ), интоксикация, индуцированная отмена	активность NOC $\uparrow$	мозжечок	Cuéllar et al., 2000
морфин ( $\mu$ ), интоксикация, индуцированная отмена	активность NOC =	ФК	Cuéllar et al., 2000

морфин (μ), индуцированная отмена	количество NOC-позитивных клеток ↑	гипоталамус, ГП	Cuéllar et al., 2000
морфин (μ), отмена	активность NOC =	мозжечок, неокортекс	CM, Kumar, Bhargava, 1997
U-50,488H (κ), отмена	активность NOC ↑	неокортекс	Bhargava, Kumar, 1997
U-50,488H (κ), отмена	активность NOC =	мозжечок, спинной мозг	CM, Bhargava, Kumar, 1997
DPDPE (δ), отмена	активность NOC ↓	неокортекс, мозжечок, спинной мозг	Bhargava, Cao, 1998
DPDPE (δ), отмена	активность NOC ↑	CM	Bhargava, Cao, 1998
DPDPE (δ), отмена	активность NOC =	стриатум	Bhargava, Cao, 1998
морфин (μ), отмена	концентрация цГМФ ↑	стриатум, мозжечок	Volicer et al., 1977
метадон (μ), интоксикация, отмена	концентрация цГМФ =	стриатум, миндаля, околосерое вещество, таламус	Sadava, Mack, 1986
морфин (μ), отмена	концентрация цГМФ ↑	стриатум, мост	Bhargava, Cao, 1997
U-50,488H (κ), отмена	концентрация цГМФ ↑	мост	Bhargava, Cao, 1997
DPDPE (δ), отмена	концентрация цГМФ ↑	мост	Bhargava, Cao, 1997
DPDPE (δ), отмена	концентрация цГМФ ↓	мозжечок, спинной мозг	Bhargava, Cao, 1997
морфин (μ), интоксикация	белок и мРНК NOC и ГЦ α1 ↑	спинной мозг	Liang, Clark, 2004

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений.

Результаты, полученные при исследовании роли NO в формировании зависимости от опиатов, не являются однозначными (Табл. 7). С одной стороны, указывается на то, что повышенная активность сигнального каскада NO является причиной формирования зависимости (Dehpour et al., 2000; Aricioglu et al., 2004; Abdel-Zaher et al., 2006) или, напротив, предотвращать развитие зависимости (Dambisya, Lee, 1996). С другой стороны, сигнальный каскад NO может и не играть никакой роли в формировании зависимости от опиатов (Ozek et al., 2003) или ослаблять лишь некоторые признаки зависимости (Majeed et al., 1994; Bhargava,

1995). В частности, конкурентное введение селективного ингибитора индуцибельной NOC (аминогуанидина) перед каждой инъекции морфина при субхронической интоксикации значительно ослабляет проявления индуцированного налоксоном синдрома отмены морфина у мышей (Abdel-Zaher et al., 2006). У мышей, получавших эндогенный ингибитор NOC агматин субхронически или остро перед провокацией синдрома отмены морфина, после имплантации капсулы с морфином наблюдается снижение интенсивности синдрома отмены морфина (Aricioglu et al., 2004). При этом у трансгенных мышей, нокаутированных по гену нейрональной NOC, снижаются только периферические проявления синдрома отмены (Aricioglu et al., 2004). Субхроническое введение ингибитора NOC L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester) во время формирования зависимости от морфина снижает проявления зависимости, тогда как введение L-аргинина, напротив, увеличивает, при этом совместное введение лития увеличивает выраженность эффекта (Dehpour et al., 2000). С другой стороны, в работе Ozek и соавторов (Ozek et al., 2003) указывается, что L-NAME, но не L-канаванин (специфический ингибитор индуцибельной NOC), способен предотвращать манифестацию синдрома отмены у крыс, но не оказывает влияния на формирование зависимости. Субхроническое введение L-NAME или L-NNA во время интоксикации морфином способно ослаблять лишь некоторые признаки зависимости от морфина как показано в экспериментах на мышах (Majeed et al., 1994). Bhargava установил, что конкурентное введение N<sup>G</sup>-мометил-L-аргинин (L-NMMA, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine), во время интоксикации морфином крыс, способно ослаблять только прыжковую активность при введении налоксона, интенсивность которой является специфическим признаком индуцированной отмены морфина, при этом остальные признаки отмены не снижались (Bhargava, 1995). В экспериментах на мышах Dambisya и Lee, посредством активации или ингибирования синтеза NO введением L-аргинина или L-NAME и L-NMMA в период формирования зависимости или перед провокацией отмены показали, что NO может играть роль как в формировании толерантности и зависимости, так и манифестации абстинентных расстройств (Dambisya, Lee, 1996). В частности,

повышение уровня NO во время интоксикации морфином ослабляет зависимость, тогда как снижение уровня NO не оказывает влияния на интенсивность зависимости (Dambisya, Lee, 1996). При этом указывается, что ингибирование синтеза NO ослабляет экспрессию, как толерантности, так и зависимости (Dambisya, Lee, 1996).

Как формирование физической зависимости, так и манифестация синдрома отмены опиатов находятся под контролем сигнального каскада NO/цГМФ (Табл. 7). Ранее было продемонстрировано, что неспецифические ингибиторы NOC L-N<sup>G</sup>-нитроаргинин (L-NNA, L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine) и L-NAME препятствуют развитию индуцированного налоксоном синдрома отмены морфина у крыс, за счет снижения таких признаков абстиненции как отряхивания «по типу мокрой собаки» и потеря массы тела (Kimes et al., 1993). В работе Vaupel и соавторов (Vaupel et al., 1997) была подробно исследована активность селективных ингибиторов NOC в отношении поведенческих проявлений синдрома отмены морфина в экспериментах на лабораторных животных. В данной работе исследовалась способность селективных ингибиторов нейрональной NOC (7-нитроиндазол, 3-бром-7-нитроиндазол и S-метил-L-тиоцитруллин) и селективного ингибитора индуцибельной NOC (аминогуанидин) влиять на специфические признаки синдрома отмены морфина (Vaupel et al., 1997). Ранее данная группа авторов исследовала способность селективного ингибитора эндотелиальной NOC L-N5-(1-иминоэтил)орнитин, а также неспецифических ингибиторов NOC L-NNA и L-NAME (Vaupel et al., 1995) оказывать влияние на синдром отмены. Результаты данных исследований показали, что неселективные ингибиторы NOC L-NNA и L-NAME зависимо от дозы снижали такие специфические признаки опиоидной абстиненции, как потеря массы тела, диарея, отряхивания «по типу мокрой собаки» и специфический груминг. Селективные ингибиторы нейрональной NOC (7-нитроиндазол, 3-бром-7-нитроиндазол и S-метил-L-тиоцитруллин) кроме указанных признаков снижали выраженность стереотипного жевания, саливации и пилоэрекции. Селективный ингибитор эндотелиальной NOC снижал потерю массы тела, диарею, отряхивания «по типу мокрой собаки» и специфический груминг, но

обладал сильным гипертензивным эффектом. Аминогуанидин не оказывал влияния на выраженность абстинентных расстройств поведения в данных экспериментах. Селективный ингибитор рГЦ 1Н-[1,2,4]оксодазоло[4,3-а]хиноксалин-1-он (1Н-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)) вводимый перед провокацией синдрома отмены налоксоном у крыс получавших морфин субхронически посредством введения в желудочки головного мозга предотвращает как увеличение содержания возбуждающих аминокислот L-аспартата и L-глутамата в ГП, так и снижает выраженность синдрома отмены морфина (Sullivan et al., 2000). Субхроническое введение тапентадола мышам, который является анальгетиком с двойным механизмом действия (агонист  $\mu$ -опиоидных рецепторов и ингибитор обратного захвата норадрепалина), сопровождается развитием толерантности к анальгетическому эффекту и физической зависимости при этом L-нитроаргинин способен предотвращать как развитие толерантности, так и снижать выраженность индуцированного синдрома отмены (Wolińska et al., 2021). Таким образом, с помощью ингибиторного анализа было показано, что повышенная активность сигнального каскада NO/цГМФ участвует в реализации абстинентных расстройств, при сформированной зависимости от опиатов, причем наибольшую значимость имеют изменения в функционировании нейрональной NOC.

Таблица 7 – Функциональная роль каскада NO/цГМФ в формировании зависимости от морфина и манифестации абстиненции

Модель	Воздействие на каскад NO/цГМФ	Влияние	Источник
морфин, субхронически п.к.	Аминогуанидин (ингибитор индуцибельной NOC), конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↓	Abdel-Zaher et al., 2006
морфин, инплантация капсулы п.к.	агматин (ингибитор NOC), остро перед провокацией абстиненции или конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↓	Agicioglu et al., 2004
морфин, инплантация капсулы п.к.	нокаут нейрональной NOC	выраженность синдрома отмены ↓	Agicioglu et al., 2004
морфин, субхронически в.б.	L-NAME (ингибитор NOC), конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↓	Dehpour et al., 2000
морфин, субхронически в.б.	L-аргинин (субстрат NOC), конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↑	Dehpour et al., 2000



морфин, имплантация капсулы п.к.	L-канаванин (ингибитор индуцибельной NOC), остро перед провокацией	выраженность синдрома отмены =	Ozek et al., 2003
морфин, имплантация капсулы п.к.	L-NAME (ингибитор NOC), остро перед провокацией абстиненции	выраженность синдрома отмены ↓	Ozek et al., 2003
морфин, имплантация капсулы п.к.	L-NMMA (ингибитор NOC), конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↓	Bhargava, 1995
морфин, субхронически	L-аргинин (субстрат NOC), конкурентно с морфином	выраженность синдрома отмены ↓	Dambisya, Lee, 1996
морфин, субхронически	L-NAME и L-NMMA (ингибиторы NOC), остро перед провокацией абстиненции	выраженность синдрома отмены ↓	Dambisya, Lee, 1996
морфин, имплантация капсулы п.к.	L-NNA (ингибитор NOC), остро перед провокацией абстиненции	выраженность синдрома отмены ↓	Kimes et al., 1993
морфин, имплантация капсулы п.к.	неспецифические ингибиторы NOC L-(NAME и L-NNA), ингибиторы нейрональной NOC (7-нитроиндазол, 3-бром-7-нитроиндазол и S-метил-L-тиоцитруллин), ингибитор эндотелиальной NOC (L-N5-(1-иминоэтил)орнитин), остро перед провокацией абстиненции	выраженность синдрома отмены ↓	Vaupel et al., 1995; 1997
морфин, субхронически в.ж.	ODQ (ингибитор рГЦ), остро перед провокацией абстиненции	выраженность синдрома отмены ↓	Sullivan et al., 2000

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений. Способ введения: в.ж. – в желудочки головного мозга, п.к. – подкожно, в.б. – внутривенно.

Следует отметить, что многие вещества способны модулировать фармакологические эффекты опиатов, при этом NO может составлять часть механизма их действия. Так было показано, что селективный ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина венлафаксин способен усиливать острый антиноцицептивный эффект морфина, но предотвращать развитие толерантности к анальгетическому эффекту морфина, при этом ингибирование NOC или цГМФ-зависимой фосфодиэстеразы посредством L-NAME и силденафила, соответственно потенцировало действие венлафаксина в отношении эффектов морфина (Mansouri et al., 2018). Аналогично L-NAME потенцировал, а L-аргинин ослаблял действие гиполипидемического препарата симвастатина в отношении ослабления развития

толерантности и выраженности индуцированного синдрома отмены (Houshmand et al., 2021). Агонист серотониновых рецепторов 1B/D суматриптана предотвращает развитие толерантности к анальгетическому действию морфина при этом совместное введение ингибиторов NOC L-NAME, аминуганидина или 7-нитроиндазола не позволяет реализоваться данному эффекту суматриптана (Hassanipour et al., 2018).

#### *1.4.2. Взаимодействие BDNF и NO в ЦНС*

Способность BDNF оказывать влияние на синаптическую пластичность зависит от взаимодействия с другими молекулами, что важно для настоящей работы в том числе с NO (Biojone et al. 2015; Kowiański et al., 2018). Так известно, что NO экспрессируется в нейронах вентролатеральной части околосредового серого вещества, содержащих BDNF и TrkB (Yin et al., 2014). Несмотря на то, что обе молекулы вовлечены в реализацию многих аспектов функционирования ЦНС их взаимодействие в данном контексте остается малоизученным, а полученные результаты зачастую противоречивы (Kowiański et al., 2018). Согласно данным литературы BDNF и NO могут оказывать модулирующее действие на активность друг друга, что может впоследствии влиять на нейропластические процессы.

В общем случае BDNF стимулирует синтез NO. BDNF вызывает повышение экспрессии нейрональной NOC и продукцию NO в культуре нейронов, тогда как нокаут BDNF снижает содержание NOC в ткани неокортекса мышей (Xiong et al., 1999). BDNF повышает экспрессию нейрональной NOC в клетках предшественников нейронов, при этом NO действует как паракринный посредник BDNF в регуляции пролиферации и дифференцировки этих клеток (Cheng et al. 2003). В синапсоматах, выделенных из ткани коры, BDNF стимулирует синтез NO (Sandoval et al., 2011). Схожие результаты были получены Kolarow и соавторами (2014), которые продемонстрировали, что BDNF может индуцировать продукцию NO в теле и проксимальных дендритах в культуре нейронов гиппокампа крысы, с другой стороны, донор NO нитропруссид натрия, напротив, снижает секрецию нейротрофинов, что свидетельствует о наличии отрицательной обратной связи в

системе NO-BDNF. Выдвинута гипотеза, согласно которой увеличение синтеза NO вызванное BDNF является основой экспрессии генов регулируемых CREB, которые в конечном счете стимулируют ветвление дендритов и долговременное изменения синаптической активности (Kowiański et al., 2018).

В свою очередь NO также изменяет содержание и физиологическую активность BDNF. Обработка срезов мозга, полученных от крыс донором NO нитроглицерином, повышает содержание как зрелого пептида BDNF, так и проформы (Vanoujaafar et al., 2016). В модели окклюзии мозговой артерии у мышей, нокаутированные по гену эндотелиальной NOS обнаружено снижение экспрессии BDNF и TrkB в зоне ишемического повреждения (Cui et al., 2013). На культуре нейронов, полученных от мышей, нокаутированных по гену эндотелиальной NOS показано, что снижение роста нейритов и экспрессии BDNF после депривации кислорода и глюкозы (Cui et al., 2013). С другой стороны, NO может оказывать негативное влияние на BDNF. Ингибирование NOS повышает экспрессию BDNF как *in vitro* в культуре нейронов из неокортекса так *in vivo* в ткани неокортекса (Xiong et al., 1999). В первичной культуре гиппокампальных нейронов крысы было продемонстрировано, что сигнальный каскад NO/цГМФ/протеинкиназа G тормозит секрецию BDNF в культуральную среду (Canossa et al., 2002). Субхроническое, но не острое введение 7-нитроиндазола (ингибитор нейрональной NOS) приводит к увеличению содержания белка BDNF в гиппокампе у крыс (Stanquini et al., 2018). Физиологическая значимость взаимодействия NO и BDNF было продемонстрирована в отношении роста аксонов. Так было показано, что NO вызывает коллапс конусов роста и снижение роста аксонов, при этом BDNF оказывает защитный эффект в данном контексте, при этом совместное, но не по отдельности, действие BDNF и NO, стабилизирует рост аксонов за счет динамического влияния на актиновый цитоскелет (Ernst et al. 2000).

Утверждается, что исследование взаимодействия BDNF и NO позволит лучше понять функционирование ЦНС и важность данной системы в аспекте формирования неврологических и психиатрических заболеваний (Kowiański et al.,

2018), в нашем случае в аспекте развития опиной зависимости и манифестации абстинентных расстройств.

#### *1.4.3. Взаимодействие BDNF и NO в ЦНС в условиях действия опиатов*

Таким образом, функциональная взаимосвязь NO и BDNF в нервной ткани описана как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее указания на то, что данные системы взаимодействуют в условиях действия опиатов единичны и носят большей частью косвенный характер. Предварительное введение венлафаксина перед каждой инъекцией морфина в процессе формирования зависимости значительно снижало выраженность индуцированного синдрома отмены у мышей, что сопровождалось снижением повышенного в условиях абстинентного синдрома уровня белка BDNF в мозге (Mansouri et al., 2020). При этом введение ингибиторов NOС L-NAME или амингуанидина потенцировало эффект венлафаксина в отношении выраженности синдрома отмены и повышенного содержания BDNF в мозге, тогда как L-аргинин оказывал противоположный эффект (Mansouri et al., 2020). Венлафаксин также предотвращает развитие толерантности к анальгетическому действию морфина и нормализует пониженный уровень белка BDNF в мозге зарегистрированный по окончании интоксикации морфином в течение 3 дней (Mansouri et al., 2018). Также как и в случае с моделью индуцированного синдрома отмены введение L-NAME или амингуанидина потенцировало эффект венлафаксина в отношении развития толерантности и пониженного содержания BDNF в мозге, тогда как L-аргинин оказывал противоположный эффект (Mansouri et al., 2020). Совместные внутриамигдаллярные микроинъекции селективного антагониста NMDA рецептора D-AP5 и L-NAME потенцируют способность морфина снижать выраженность аллодинии в модели констрикции седалищного нерва у крыс, что сопровождалось предотвращением активности CREB (отношение pCREB/CREB) в центральной амигдале (Tolou-Dabbaghian et al., 2019). Результаты работы Tolou-Dabbaghian и соавторов (2019) представляют особый интерес, если учитывать, что BDNF является прямой мишенью CREB.

Таким образом, учитывая, что как NO, так и BDNF вовлечены в механизмы опиоидной абстиненции, а также подверженностью взаимодействия данных систем как *in vitro*, так и *in vivo* можно действительно полагать, что данные системы могут составлять часть механизма развития опиоидной зависимости и абстиненции.

### **1.5. Патогенез алкогольной зависимости и абстиненции: фокус на BDNF**

Патологическая зависимость от алкоголя также представляет собой нерешенную медико-биологическую проблему, которая наносит колоссальный социально-экономический ущерб. Согласно аналитическому обзору о работе наркологической службы в Российской Федерации за период 2019-2020 (Киржанова и соавт. 2021) общая заболеваемость (учтенная распространенность) расстройствами наркологического профиля в 2020 г. составила 1203,5 на 100 тыс. населения. Из них на долю расстройств, связанных со злоупотреблением алкоголя, приходилось 934,1 случая. При этом первичная заболеваемость расстройствами наркологического профиля в 2020 г. составила 87,2 на 100 тыс. населения. Из них на долю расстройств связанных с злоупотреблением алкоголя приходилось 61 случая. Согласно исследованию бремени болезней в мировом масштабе, опубликованном в журнале *Lancet*, распространённость заболеваний связанных с злоупотреблением алкоголя в 2016 г. составляла 100,4 млн человек, тогда как первичная заболеваемость 50,4 млн человек (GBD, 2016). Суммарные экономические потери от злоупотребления алкоголем в 2017 г. в России составили от 302,8 млрд до 2,5 трлн рублей при этом принесли вред здоровью 3,9 млн DALY (Сошников и соавт., 2020).

Длительная неконтролируемая интоксикация алкоголем может приводить к формированию зависимости, в основе чего лежит комплекс нейробиологических процессов затрагивающих функционирование ЦНС всех уровней организации (Abraham et al., 2017; Egervari et al., 2021). Хроническое употребление алкоголя и алкогольная зависимость характеризуется атрофией областей ЦНС (Harper, Kril, 1985). Данные, полученные на посмертных образцах лиц с алкогольной зависимостью, свидетельствуют о массивной нейродегенерации в коре больших

полушарий, мозжечке и стволе мозга (Fein et al., 2002; Pfefferbaum et al., 2009), при этом отмечается, что употребление алкоголя даже в умеренных дозах приводит к выраженной атрофии (Альтшулер и соавт., 2013; Toriwala et al., 2017). Среди прочих систем, вовлеченных в данный процесс, особая роль уделяется нейротрофинам, которые являются важным звеном молекулярных механизмов, определяющих действие алкоголя и формирование зависимости (Ron, Barak, 2016; Liran et al., 2020). BDNF является ключевым нейротрофином в данном контексте (Logrip et al., 2015; Ron, Berger, 2018). Экспериментальные данные, полученные в модельных системах, свидетельствуют, что BDNF может играть определяющую роль в нейропластических изменениях при алкоголизме, которые, с одной стороны, определяют собственно патологическое влечение, с другой стороны, вовлечены в механизмы развития морфологических нарушений и последующих когнитивных и психоэмоциональных расстройств (Davis, 2008; Logrip et al., 2015).

Анализ экспериментальных данных, полученных в клинике, показывает потенциальную значимость циркуляторного BDNF как биомаркера течения и прогноза алкогольной зависимости и синдрома отмены алкоголя (Nubukpo et al., 2017; Kethawath et al., 2020). Уровень BDNF в сыворотке больных зависимостью от алкоголя ниже, чем у здоровых людей (Joe et al., 2007; Costa et al., 2011; Zanardiniet al., 2011). При этом концентрация BDNF в сыворотке крови в абстинентный период у пациентов со сформированной алкогольной зависимостью повышается (Costa et al., 2011; Köhler et al., 2013). Кроме того, в лонгитудинальном исследовании было показано, что уровень BDNF в сыворотке крови повышается к 6 месяцам абстиненции, при этом изменение характерно для воздерживающихся по сравнению с лицами, возобновившими потребление алкоголя (Costa et al., 2011). Уровень BDNF образует обратную связь с выраженностью синдрома отмены по шкале CIWA-Ar (Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol scale, Revised) (Heberlein et al., 2010). Отмечается, что уровень сывороточного BDNF не различается у пациентов, страдающих алкоголизмом, и здоровых людей, однако, при отмене алкоголя его уровень повышается, что положительно коррелирует с интенсивностью абстинентных расстройств (Huang et al., 2008). Пониженный по

сравнению со здоровыми людьми уровень BDNF в сыворотке больных с алкогольной зависимостью повышается в процессе детоксикации (Wu et al., 2020). Уровень BDNF повышается с 2 недели абстиненции и держится на достигнутом уровне до шести месяцев при этом назначение баклофена сочетано с повышенным уровнем BDNF (Girard et al., 2020), что позволяет косвенно судить о вовлеченности BDNF в терапевтический процесс.

### 1.5.1. Влияние алкоголя на содержание BDNF в ЦНС в модельных системах

Известно, что экспрессия BDNF в отделах ЦНС грызунов может изменяться как при остром, так и при субхроническом воздействии этилового спирта (Табл. 8).

Ранее было установлено, что в диапазоне между 3 и 24 ч после интоксикации алкоголем в дозе 2.5 г/кг уровень мРНК BDNF снижался в гиппокампе, амигдале, прилежащем ядре стриатума и ПФК, тогда как в ВОП авторы выявили повышение уровня мРНК BDNF (Raivio et al., 2012). Аналогично спустя 3 ч после однократной инъекции этанола в дозе 3.5 г/кг наблюдалось снижение мРНК BDNF как в гиппокампе, так и в амигдале независимо от пола и возраста (Barney et al., 2022).

Таблица 8 – Экспрессия BDNF в головном мозге грызунов при действии этанола

Модель потребления алкоголя	Экспрессия BDNF	Отдел мозга	Источник
острая интоксикация	мРНК ↓	гиппокамп, амигдала, прилежащее ядро, ПФК	Raivio et al., 2012
острая интоксикация	мРНК ↑	ВОП	Raivio et al., 2012
острая интоксикация	мРНК ↓	гиппокамп, амигдала,	Barney et al., 2022
постоянный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 4 недели	мРНК ↑	дорсальный стриатум	McGough et al., 2004
постоянный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 4 недели	мРНК =	гиппокамп, ПФК	McGough et al., 2004
постоянный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 3 недели	белок и мРНК =	гиппокамп	Gallego et al., 2015

ограниченный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 6 недель, 24 ч абстиненции	мРНК ↓	неокортекс	Logrip et al., 2009
ограниченный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 6 недель, 24 ч абстиненции	мРНК =	стриатум	Logrip et al., 2009
ограниченный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 12 дней, 7 дней абстиненции	белок ↓	гиппокамп	Briones, Woods, 2013
постоянный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 4 недели, 14 дней абстиненции	количество BDNF-позитивных клеток ↓	гиппокамп	Roni, Rahman, 2017
прерывистый доступ к парам этанола, 7 недели, 3 ч абстиненция	белок ↑	гиппокамп, неокортекс	Somkuwar et al., 2016
прерывистый доступ к парам этанола, 7 недель, 3 недели абстиненция	белок =	гиппокамп, неокортекс	Somkuwar et al., 2016
постоянный доступ к 3-10% раствору (свободный выбор), 4 недели	белок, мРНК экзон II, III и VI ↑	гиппокамп	Stragier et al., 2015 (a)

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений.

Исследованию уровня BDNF в отделах головного мозга крыс в условиях субхронического воздействия алкоголя посвящено большее количество работ. Однако полученные результаты зачастую противоречивы, что, по-видимому, связано с использованием различных модельных систем (Табл. 8). Непрерывный доступ к 10% раствору этанола в условиях свободного выбора на протяжении 4 недель сопровождается значительным повышением уровня мРНК в дорсальном стриатуме мышей, но не в ПФК или гиппокампе (McGough et al., 2004). С другой стороны, уровень BDNF в гиппокампе также не изменялся спустя 3 нед. непрерывного доступа к алкоголю (Gallego et al., 2015). Ограниченный доступ на 4 ч в темный период суток к 10 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора на протяжении 6 недель приводил к снижению мРНК BDNF в неокортексе, не оказывая эффекта на экспрессию в стриатуме мышей спустя 24 ч после отмены (Logrip et al., 2009). Многие группы исследователей свидетельствуют о снижении уровня белка BDNF в гиппокампе в период отмены независимо от протокола алкоголизации (Briones, Woods, 2013; Roni, Rahman, 2017). Напротив, отмена (3 ч)



но не длительная абстиненция (3 недели) после прерывистой экспозиции в камере с парами этанола на протяжении 7 недель сопровождается повышением уровня BDNF на уровне белка в гиппокампе и медиальной коре крыс (Somkuwar et al., 2016).

Транскрипционные механизмы, регулирующие экспрессию BDNF при действии этанола, до сих пор остаются малоизученными. Так острое воздействие этанола на механизмы экспрессии и содержание экзон-специфических мРНК BDNF в ЦНС до настоящего момента не исследовалось. Тем не менее есть небольшое количество работ, свидетельствующих о возможных механизмах транскрипционной регуляции BDNF при субхроническом потреблении алкоголя. В единичных работах проводилось исследование субхронического воздействия этанола на содержание экзон-специфических мРНК BDNF в отделах головного мозга грызунов (Shojaei et al., 2015; Stragier et al., 2015 (a)). Так в работе Stragier и соавторов было показано, что субхроническое потребление этанола мышами в условиях свободного выбора сопровождается повышением уровня белка BDNF в гиппокампе, а также мРНК BDNF, содержащих экзоны II, III и VI, при этом содержание экзона VIII снижалось, экзонов I и IV не изменялось (Stragier et al., 2015 (a)). Указывается, что содержание экзонов коррелирует с уровнем ацетилированного гистона H3 в районе промотора экзона VI и триметилированного гистона H3 в районе промоторов экзонов II и III (Stragier et al., 2015 (a)). Установлено, что увеличение экспрессии транскрипционного фактора миелина 1 (MyT1, Myelin Transcription Factor 1) в зубчатой фасции гиппокампа посредством инфицирования конструктором на основе лентивируса сопровождается снижением потребления алкоголя в условиях непрерывного свободного выбора и его предпочтения, что сопровождается повышением уровня мРНК BDNF (Bahi, Dreyer, 2017). Прерывистая интоксикация этанолом приводит к снижению экспрессии мРНК BDNF, содержащей экзон IV, в полях CA1 и CA3 гиппокампа, при этом ингибитор деацетилаз гистонов трихостатин А предотвращает развитие тревожно-подобного состояния, а также снижение нейрогенеза и уровня ацетилированного гистона H3K9ac в районе промотора экзона IV (Sakharkar et al., 2016). Кроме того, прерывистая интоксикация

этанолом приводит к повышению уровня метилированной ДНК в амигдале крыс в районе промотора экзона IV в гене BDNF, тогда как ингибитор ДНК-метилтрансфераз 5-азацитидин предотвращает данный процесс, что сопровождается нормализацией тревожно-подобного поведения (Sakharkar et al., 2019).

### 1.5.2. Функциональная роль BDNF при алкогольной зависимости

Таким образом, очевидно, что алкогольная интоксикация, а также сопутствующее формирование зависимости сопровождаются специфическими изменениями экспрессии BDNF в отделах головного мозга и это позволяет предположить, что BDNF может опосредовать фармакологические эффекты этанола. Данные литературы свидетельствуют, что локальная или системная манипуляция активностью BDNF может оказывать влияние на интенсивность потребления этанола в условиях свободного выбора, а также проявления алкогольной абстиненции в эксперименте (Табл. 9).

Таблица 9 – Функциональная роль BDNF при действии алкоголя

Модель потребления алкоголя	Показатель	Взаимосвязь с BDNF	Источник
прерывистый доступ к 20% раствору (свободный выбор)	потребление этанола	частичный нокаут гена BDNF (+/-) повышает потребление этанола	Hensler et al., 2003; McGough et al., 2004
оперантное потребление 10% раствора	потребление этанола	инфузия BDNF в дорсолатеральный стриатум снижает потребление этанола	Jeanblanc et al., 2009; Jeanblanc et al., 2013
оперантное потребление 10% раствора	потребление этанола	нокдаун BDNF в дорсолатеральном стриатуме повышает потребление этанола	Jeanblanc et al., 2009
ограниченный доступ к 15% раствору (свободный выбор)	потребление этанола	повышение уровня BDNF в ПФК снижает потребление этанола	Haun et al., 2018
прерывистый доступ к 20% раствору	тревожно-подобное поведение ↑	миметик BDNF 7,8-дигидроксифлаван (7,8-ДГФ)	Wang et al., 2021

(свободный выбор), 21 день, 48 ч абстиненции		(в.б.) ослабляет тревожно-подобное поведение	
ограниченный доступ к 10% раствору (свободный выбор), 12 дней, 7 дней абстиненции	нейрогенез ↓; депрессивно-подобное поведение ↑	миметик BDNF 7,8-дигидроксифлавон (7,8-ДФФ) (в.б.) нормализует нейрогенез, и ослабляет депрессивно-подобное поведение	Briones, Woods, 2013
постоянный доступ к 3-10% раствору (свободный выбор), 4 недели	нейрогенез ↑	антагонист TrkB ANA-12 (в.б.) подавляет нейрогенез	Stragier et al., 2015 (a)

Примечание. Направление изменений: ↑ – повышение, ↓ – снижение, = – без изменений. Способ введения: в.б. – внутривенно.

Так, гетерозиготные мыши, нокаутированные по гену BDNF (+/-), демонстрируют повышенное по сравнению с диким типом потребление алкоголя в условиях свободного выбора (Hensler et al., 2003; McGough et al., 2004). Локальное снижение уровня BDNF в стриатуме посредством интерферирующих РНК приводит к увеличению уровня потребления этанола, тогда как инфузия BDNF в данный отдел мозга снижает потребление этанола (Jeanblanc et al., 2009). Субхронический прерывистый доступ к парам алкоголя сопровождается снижением уровня белка BDNF в ПФК мышей в период абстиненции (Haun et al., 2018). При этом локальное повышение BDNF в данной области посредством инфузии BDNF или инфицирования вирусом, содержащим соответствующий ген, в последующем снижает уровень потребляемого этанола в условиях свободного выбора (Haun et al., 2018). Потребление этанола сопровождается повышением уровня BDNF в стриатуме, при этом инфузия BDNF в данную область снижает потребление этанола, в основе чего лежит активация каскада ERK, но не PI3K или PLC-γ, и инициация процессов транскрипции и трансляции в течение часов (Jeanblanc et al., 2013). Повторяющиеся циклы потребления алкоголя и последующей отмены нарушает баланс рецепторов BDNF в пользу увеличения роли низко-аффинного NGFR в дорсальном стриатуме, при этом экспериментальное снижение его содержания или активности предотвращает чрезмерное потребление алкоголя в модели чрезмерного потребления в условиях свободного выбора (Darcq et al. 2016).

Недавние исследования продемонстрировали, что стимуляция TrkB посредством миметика BDNF 7,8-дигидроксифлавоном (7,8-ДФФ) оказывает влияние на реализацию модели прерывистого доступа к алкоголю в условиях свободного выбора. Так однократное внутрибрюшинное введение 7,8-ДФФ после отмены прерывистого доступа к 20% алкоголю в условиях свободного выбора снижает избыточное потребление алкоголя при последующем предъявлении (Li et al., 2020), а также ослабляет тревожно-подобные расстройства поведения у мышей во время острой фазы алкогольной абстиненции (Wang et al., 2021). При этом Gao и соавторы показали, что каскад, запускаемый NO в ВОП крыс, принимает участие в снижении потребления алкоголя при острой абстиненции, которое вызывает однократное внутрибрюшинное введение 7,8-ДФФ (Gao et al., 2022). С другой стороны, манипуляция активностью сигнального каскада, инициируемого активацией TrkB, может не влиять на потребления алкоголя экспериментальными животными, но способно оказывать на другие последствия потребления алкоголя. Отмена субхронического употребления алкоголя сопровождается развитием депрессивно-подобного состояния на фоне снижения уровня BDNF и нейрогенеза в гиппокампе (снижение выживаемости и дифференцировки нейронов предшественников), при этом стимуляция сигналинга BDNF посредством 7,8-ДФФ предотвращает подобные нарушения, но не оказывает влияние на потребления алкоголя в условиях свободного выбора (Briones, Woods, 2013). Подобно результатам полученным Briones и Woods (2013) введение антагониста рецептора TrkB ANA-12 не оказывает влияния на потребление алкоголя в условиях свободного выбора, но подавляет нейрогенез сопровождающий потребление алкоголя, что, по мнению авторов, свидетельствует о компенсаторной роли BDNF в данном контексте (Stragier et al., 2015 (a)).

Известно, что некоторые нейротропные препараты, используемые в клинике неврологических и психических заболеваний, могут модулировать активность BDNF при воздействии алкоголя, что позволяет высказать предположение о вовлеченности BDNF в механизм их действия. В частности, неконкурентный антагонист глутаматных рецепторов мемантин снижает потребление алкоголя, что

сопровождается активацией сигнального каскада BDNF (Jeanblanc et al., 2014). Депрессивно-подобное состояние, связанное с употреблением алкоголя, сопровождается снижением уровня BDNF в гиппокампе, при этом антидепрессанты с различным механизмом действия, номифензин и имипрамин, способны нормализовать уровень BDNF (Hauser et al., 2011). Кроме того, некоторые соединения, которые могут напрямую модулировать экспрессию BDNF, способствуют нормализации структурно-функциональных нарушений, отмечаемых при действии алкоголя. Так, ингибирование деацетилаз гистонов при отмене субхронической интоксикации этанолом сопровождается повышением уровня BDNF в амигдале крыс и повышением плотности шипиков дендритов, наряду со снижением уровня тревожности (You et al., 2014).

Таким образом, при алкогольной зависимости в целом отмечается изменение уровня BDNF, по всей видимости, зависящее от структуры ЦНС и способа алкоголизации, что может приводить к специфическим структурным перестройкам нейронов и развитию поведенческих нарушений, тогда как прямое или опосредованное повышение локального уровня BDNF сопровождается обратной динамикой нарушений и снижением потребления алкоголя.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Эксперименты на животных

В работе было использовано 342 аутбредных крыс-самцов Wistar (масса тела 200-300 г). Животные были получены из Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Московская область, Россия). Адаптационный период от момента поступления в виварий до введения в эксперимент составлял не менее 7 дней. Крыс содержали в условиях вивария при искусственном 12-часовом цикле освещения и постоянной температуре (21-23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму. Животных содержали по 4-6 особей в пластмассовых клетках. Индивидуальное содержание было предусмотрено в экспериментах с инъекциями BDNF в ВОП и регистрацией потребления алкоголя в условиях свободного выбора. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией Института.

Таблица 10 – Схема субхронической интоксикации морфином

День эксперимента	Интоксикация	Отмена морфина
	Доза морфина (мг/кг, в.б.) [Время инъекции]	Доза морфина (мг/кг, в.б.) [Время инъекции]
1	10 [20.00]	10 [8.00] 10 [20.00]
2	10 [8.00] 20 [20.00]	20 [8.00] 20 [20.00]
3	20 [8.00] 40 [20.00]	40 [8.00] 40 [20.00]
4	40 [8.00] 60 [20.00]	60 [8.00] 60 [20.00]
5	60 [8.00] 80 [20.00]	80 [8.00] 80 [20.00]
6	80 [8.00] 100 [20.00]	100 [8.00] 100 [20.00]
7	100 [8.00] Забор материала [10.00]	Абстиненция
8		Тестирование синдрома отмены [10.00] Забор материала [12.00]

### 2.1.1. Интоксикация морфином

При моделировании острой опиоидной интоксикации, морфин (ФГУП «Московский эндокринный завод») в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) вводили крысам однократно внутривентриально в дозе 10 мг/кг (3 мл/кг). Животные контрольных групп однократно получали изотонический раствор NaCl (0,9 %) (3 мл/кг). Биологический материал для исследования собирали через 1 или 2 ч после интоксикации.

Для формирования физической зависимости у крыс морфин вводили субхронически по отработанной ранее схеме, предложенной Dum и соавторами (Dum et al., 1981 в модификации Rahman et al., 2002). Данная схема представляет собой 12 внутривентриальных инъекций морфина дважды в день в возрастающих дозах от 10 до 100 мг/кг (3 мл/кг). Животные контрольных групп получали изотонический раствор NaCl (0,9 %) (3 мл/кг) согласно указанной схеме. Биологический материал (ткань отделов головного мозга) для биохимических исследований собирали через 2 ч (субхроническая интоксикация) или 40 ч (спонтанная отмена морфина) после завершающей инъекции морфина. Выраженность спонтанного синдрома отмены оценивали через 38 ч после последней инъекции морфина. Схема соответствующих экспериментов представлена в Табл. 10. В отдельных экспериментах через 3 или 6 дней после субхронической интоксикации морфином (отсроченная отмена\*) проводили тестирование животных в приподнятом крестообразном лабиринте.

### 2.1.2. Алкоголизация

Острую интоксикацию алкоголем проводили согласно работе Raivio и соавторов (Raivio et al., 2012) в которой 12 % раствор этилового спирта (ООО "Главспирттрест") в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) вводили

---

\* - Под отсроченной или длительной отменой (англ. protracted abstinence) подразумевается период после завершения острой фазы синдрома отмены опиатов, когда затухают соматические проявления. Для грызунов данный начинается по прошествии ~ 2 дней после отмены (Ozdemir et al., 2023).

внутрибрюшинно в дозе 2,5 г/кг. Интоксикация крыс этанолом в указанной дозировке в течение десятков минут вызывает выраженную седацию, граничащую с атаксией, что является характерным фармакологическим эффектом этанола (Budygin et al., 2001). Контрольная группа получала изотонический раствор NaCl (0,9 %). Через сутки после инъекции животных декапитировали и на льду выделяли ФК, гиппокамп и СМ для оценки уровня экзон-специфических вариантов мРНК BDNF.

Функциональная роль BDNF в регуляции мотивации потребления алкоголя и абстинентных расстройств поведения, а также особенности экспрессии BDNF в отделах головного мозга были исследованы на модели прерывистого доступа к 20 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора (ПД20%СВ). В модели ПД20%СВ крысы демонстрируют способность повышать уровень потребленного алкоголя в достаточно высоких количествах (до 10 г/кг в сутки). При этом могут отмечаться нарушения памяти, развитие тревожности и депрессивно-подобных симптомов, которые сопровождаются изменениями в ЦНС на молекулярном уровне, что может соответствовать клинической картине при чрезмерном употреблении алкоголя (Carnicella, Ron, Barak, 2014). Процедура ПД20%СВ была реализована согласно подходу использованного Simms и соавторами (2008). В опытной группе 20% раствор этилового спирта и воду предъявляли крысам одновременно в двух сосудах на период 24 ч. Крысы могли свободно выбирать раствор для питья и самостоятельно определять количество выпитого. Экспозицию осуществляли в течение 20 сеансов при этом чередуя положение сосудов в клетке. Перерывы между сеансами составляли 24 ч, в течение которых крысам предъявляли два сосуда с питьевой водой. Контрольная группа имела постоянный доступ к двум емкостям с водой. Сеанс предъявления раствора этанола начинался в темную фазу искусственного освещения. Схема эксперимента представлена в Табл. 11. Сосуды и животных взвешивали каждый раз перед и после сеанса предъявления. Количество потребляемого раствора пересчитывали на потребление спирта в г на



массу тела животного за сеанс (сутки). Уровень предпочтения спирта воде рассчитывали по отношению объема потребленного раствора спирта за сеанс (сутки) к общему объему потребленной жидкости и выражали в процентах. Постепенное повышение потребления раствора этанола на протяжении реализации модели является ключевой особенностью ПД20%СВ (Carnicella, Ron, Barak, 2014). По окончании процедуры проводили корреляционный анализ количества потребляемого этанола и порядкового номера сеанса предъявления этанола. Паттерн потребления этанола считался характерным для ПД20%СВ в случае, если данные показатели образовывали значимые положительные корреляционные отношения. По завершению модели ПД20%СВ в острой фазе алкогольной абстиненции\* исследовали поведение животных: на первый день по завершению модели ПД20%СВ в тесте «открытое поле», на вторые сутки в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Отделы головного мозга для оценки уровня экзон-специфических вариантов мРНК BDNF выделяли на третьи сутки после последнего сеанса.

Таблица 11 – Схема модели прерывистого доступа к 20 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора (ПД20%СВ)

День	Действие
1	Доступ к 20 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора
2	Доступ к воде
3-38	//-//
39	Доступ к 20 % раствору этилового спирта в условиях свободного выбора
40	Доступ к воде
41	Тест «открытое поле»
42	Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»
43	Забор биологического материала

\* - В отношении временных периодов абстиненции после хронического потребления алкоголя грызунами условно принято следующее разделение: острая фаза (до 2-3 дней после отмены), ранняя абстиненция (до 2 недель после отмены) и длительная абстиненция (> 2-4 недель после отмены) (Heilig et al., 2010; Carnicella, Ron, Barak, 2014; Bloch et al., 2022).

### *2.1.3. Введение ингибитора NO-синтазы*

При исследовании роли NO в формировании зависимости от морфина ингибитор NOC L-NAME (L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester, N5751; Sigma-Aldrich, США) вводили системно на протяжении субхронической морфинизации по указанной выше (Табл. 10) схеме за 1 ч до каждой инъекции морфина или изотонического раствора NaCl (0,9 %) в дозе 10 мг/кг (1 мл/кг). Были сформированы четыре экспериментальные группы: группа Морфин (формирование зависимости посредством субхронического введения морфина); группа Контроль (вместо морфина вводили изотонический раствор NaCl (0,9 %)); группа Морфин + L-NAME (введение L-NAME перед каждой инъекцией морфина) и группа Контроль + L-NAME – контрольная группа, получавшая ингибитор NOC. Согласно работе Iadecola и соавторов (1994) доза L-NAME 10 мг/кг является минимальной эффективной дозой, оказывающей ингибирующее действие на активность NOC в ЦНС при системном введении. Кроме того, ранее была продемонстрирована способность L-NAME в данной дозе модифицировать формирование зависимости от морфина и реализацию абстиненции (Dambisya, Lee, 1996; Dehpour et al., 2000).

### *2.1.4. Введение рекомбинантного BDNF*

Животным под наркозом (хлоралгидрат (Органика, Россия) 350 мг/кг) на стереотаксической раме (David Kopf Instruments, США) имплантировали стальную направляющую канюлю для внутримозговых инъекций (C313G; Plastics One, США) в срединную ВОП согласно координатам стереотаксического атласа: -5,3 мм AP и 7,4 мм DV, как описано Verhow и соавторами (Verhow et al., 1995; 1996). При отработке постановки канюли проводили морфологический контроль места введения (Рис. 11). С помощью стальных винтов и зубного цемента направляющую канюлю фиксировали на черепе. После фиксации в канал направляющей канюли устанавливали изолирующую заглушку (C313DC; Plastics One, США). После операции животных помещали на 7 дней в индивидуальные

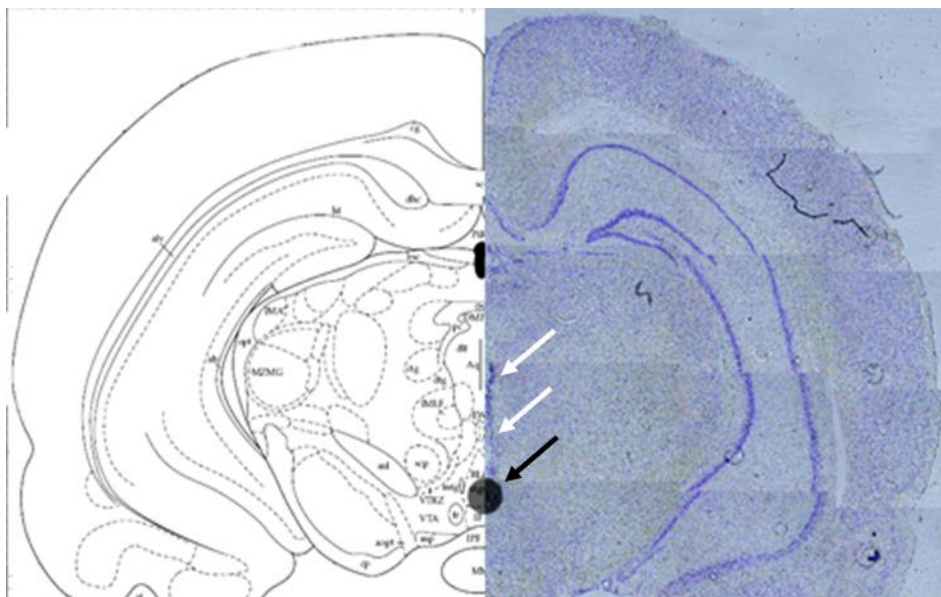


Рисунок 11 – Морфологический контроль позиционирования канюли. Канюлю помещали согласно координатам стереотаксического атласа: -5,3 мм AP, 8,4 мм DV. Черной стрелкой обозначено место инъекции, белыми стрелками обозначен трек от канюли. Левая часть: схематическое изображение мозга крыс в корональной плоскости (-5,3 мм AP) согласно атласу (Paxinos, Watson, 2013). Правая часть: соответствующий срез мозга, окрашенный по Нисслю.

клетки для прохождения восстановительного периода. При инъекции животным вынимали заглушку канюли, инъекционную канюлю помещали в направляющую (проекция + 1 мм, C313I; Plastics One, США) и вводили 0,75 мкг рекомбинантного BDNF человека (B3795; Sigma-Aldrich, США) с помощью шприца Hamilton (номинальный объем - 10 мкл), соединенного с канюлей посредством полиэтиленового капилляра (C313CT; Plastics One, США). Раствор объемом 0.5 мкл инъецировали посредством автоматического программируемого наноинжектора (Stoelting, США) в течение 5 мин, оставляя инъекционную канюлю вставленной в направляющую на 1 мин до и после инъекции. Животные контрольных групп получали равный объем растворителя – фосфатно-солевого буфера (PBS, phosphate-buffered saline). При оценке влияния BDNF на экспрессию спонтанного синдрома отмены животным делали однократную инъекцию BDNF в период отмены (через 16 ч после последней инъекции морфина). При исследовании влияния BDNF на выработку или воспроизведение УРПМ, индуцированной морфином, BDNF вводили однократно в срединную ВОП за одни сутки до или одни

сутки спустя фазы обусловливания, соответственно. Внутримозговое введение рекомбинантного BDNF в дозе 0,75 мкг проявляет функциональную активность. В частности, введение BDNF в указанной дозе в ВОП (Lu et al., 2004) или дорсолатеральный стриатум (Jeanblanc et al., 2009) способно модифицировать потребление кокаина или алкоголя, соответственно. Согласно данным литературы, концентрация BDNF в головном мозге взрослых крыс зависит от анатомического региона и составляет от единиц (Zhou et al., 1996; Katoh-Semba et al., 1997) до сотен (Radka et al., 1996) нг/г ткани. Таким образом, количество экзогенного BDNF, вводимого в настоящей работе, значительно превосходит его базальный эндогенный уровень.

#### *2.1.5. Введение миметика BDNF*

При исследовании роли сигналинга опосредованного BDNF в реализации положительного подкрепляющего эффекта алкоголя, а также манифестации абстинентных расстройств использовали миметик BDNF – 7,8-дигидроксифлавонон (7,8-ДГФ) (Liu et al., 2016). 7,8-ДГФ (sc-278634; Santa Cruz Biotechnology, США) вводили внутривентрикулярно в дозе 5 мг/кг (3 мл/кг) за 1 ч до каждого сеанса предъявления алкоголя при реализации модели ПД20%СВ (Табл. 11). Исходно 7,8-ДГФ растворяли в 100 % диметилсульфоксиде (ДМСО) далее посредством изотонического раствора NaCl (0,9 %) доводили конечную концентрацию ДМСО до 6,7 %. Растворитель (ДМСО (6,7 %) в изотоническом растворе NaCl (0,9 %)) в объеме 3 мл/кг вводили животным не получавшим 7,8-ДГФ. Были сформированы четыре экспериментальные группы: 1) группа «Контроль», которая имела постоянный доступ к двум емкостям с водой; 2) группа «Контроль + 7,8-ДГФ», представляющая собой контрольную группу, получавшую инъекции 7,8-ДГФ; 3) группа «Этанол», которой предоставлялся выбор 20% раствора алкоголя согласно описанной выше модели ПД20%СВ (Табл. 2); и 4) группа «Этанол + 7,8-ДГФ», которой вводили 7,8-ДГФ перед каждым сеансом предъявления алкоголя в модели ПД20%СВ. 7,8-ДГФ при системном введении в дозе 5 мг/кг активизирует TrkB в

головном мозге и проявляет функциональную активность, среди прочего оказывая влияние на потребление алкоголя и развитие тревожно-подобного поведения (Jang et al., 2010; Andero et al., 2011; Chang et al., 2016; Li et al., 2020; Wang et al., 2021).

### 2.1.6. Оценка спонтанного синдрома отмены морфина

В данной работе моделировали спонтанный синдром отмены морфин. Несмотря на то, что спонтанная абстиненция не такая интенсивная, как индуцированная антагонистами опиоидных рецепторов, она имеет большую длительность и, следовательно, дает больше оперативной возможности для фармакологической интервенции. Кроме того, спонтанная отмена в противоположность индуцированной имеет большую трансляционную ценность. Спонтанный синдром отмены оценивали через 38 ч после введения завершающей инъекции морфина (Табл. 10) в арене «открытое поле». Выраженность синдрома отмены оценивали в течение 5 мин по специфическим для грызунов признакам абстиненции: отряхивания по типу мокрой собаки, корчи, жевание, скрежет зубами, встряхивание передними лапами, писк при дотрагивании, диарея, птоз и диспноэ (Blasig et al., 1973; Константинопольский и соавт., 1992; Судаков и соавт., 1994), в модификации Rahman и соавторов (Rahman et al., 2002). Если было возможно, наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла, зависящего от специфичности признака (Rahman et al., 2002) (Табл. 12).

Таблица 12 – Признаки отмены морфина, регистрируемые через 38 ч после завершающей инъекции морфина

Признак абстиненции	Балл
Прыжки	2
Отряхивания по типу “мокрой собаки”	2
Корчи	2
Жевание	2
Скрип зубами	2
Встряхивание передними лапами	2
Диарея	1
Птоз	2
Диспноэ	2

### *2.1.7. Тест «открытое поле»*

Двигательную активность и тревожно-подобные нарушения поведения оценивали в тесте «открытое поле». Тестирование животных проводили в круглой арене белого цвета «Открытое поле для крыс» (TS0501-R; ООО «НПК Открытая Наука», Россия) диаметром 97 см и высотой стенок 42 см. Арена была поделена на три равных концентрических зоны (центр, середина и периферия). Освещенность арены составляла 500 люкс. Крыс помещали в центральную зону и позволяли исследовать арену в течение 5 мин. После каждого тестирования арену очищали 70 % раствором этилового спирта. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, а также число заходов в центр арены и время нахождения в центре. Поведение животных регистрировалось цифровой монохромной видеокамерой DMK 23GV024 GigE (The Imaging Source Europe GmbH, Германия). и анализировалось посредством программного обеспечения Ethovision XT11 (Noldus, Нидерланды).

### *2.1.8. Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»*

Для оценки тревожно-подобных нарушений поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» для крыс (TS0502-R3; ООО «НПК Открытая Наука», Россия) состояла из 4-х рукавов (50×14 см), крестообразно расходящихся от центральной площадки (14×14 см): двух открытых, имеющих бортик по периметру высотой 1 см, и перпендикулярно к ним расположенных двух закрытых рукавов, со стенками высотой 30 см по периметру и открытым верхом. Лабиринт был поднят на высоту 50 см от пола и установлен таким образом, что его открытые рукава освещались так же, как и вся экспериментальная комната, в то время как закрытые рукава – затемнены. Освещенность установки составляла 500 люкс. Животное помещали на центральную площадку, носом к открытому рукаву, и на протяжении 5 мин его поведение регистрировалось цифровой монохромной видеокамерой

DMK 23GV024 GigE (The Imaging Source Europe GmbH, Германия). После каждого тестирования установку очищали 70 % раствором этилового спирта. Для каждого животного в течение 5 минут регистрировали: число заходов и время, проведенное в открытых и закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, а также горизонтальную двигательную активность. Поведение животных анализировалось посредством программного обеспечения Ethovision XT11 (Noldus, Нидерланды).

### *2.1.9. Тест условной реакции предпочтения места*

Тест УРПМ проводили в автоматизированной установке, представляющей камеру, состоящую из двух равных по размеру (25 см × 25 см × 25 см) отсеков, различающихся по рисунку стенок (вертикальные или горизонтальные черные полосы на белом фоне), и текстуре пола (отверстия в пластиковом настиле (поливинилхлорид) или стальные прутья), соединенных проходом, позволяющим свободно перемещаться между отсеками при тестировании, который на период обучения проход был перекрыт. В начале эксперимента, за двое суток до начала обусловливания, проводили пре-тест в установке для УРПМ. Животных помещали в камеру и предоставляли возможность в течение 30 мин свободно перемещаться между отсеками, регистрируя в автоматическом режиме время нахождения в каждом из отсеков. Результаты пре-теста указывают на исходный уровень предпочтения одной из камер. В исследованной выборке животные не отдавали явного предпочтения какому-либо из отсеков (Рис. 32). Таким образом, при последующем назначении отсека, ассоциированного с введением морфина, индивидуальные фоновые показатели предпочтения, полученные при пре-тесте, не учитывались. В последующем случайным образом формировали экспериментальные группы: при исследовании роли BDNF в выработке УРПМ использовано 12 животных (6 – группа PBS, 6 – группа BDNF), при исследовании роли BDNF в воспроизведении УРПМ – 10 крыс (5 – группа PBS, 5 – группа BDNF). Затем в течение 8 дней животным попеременно однократно вводили морфин (4 раза - 10 мг/кг) или изотонический раствор NaCl (0,9 %) (4 раза). Схема эксперимента

представлена на Рис. 12. Непосредственно после инъекции животных помещали на 30 мин в один из ассоциированных с введением морфина или физиологического раствора отсеков камеры. В параллельной подгруппе ассоциация отсеков с введением морфина была заменена на противоположную. На вторые сутки после завершения фазы обучения проводили собственно тест УРПМ. Результаты данных пре-теста и теста представляли в виде абсолютных значений времени нахождения в отсеке, ассоциированном с введением морфина, и в отсеке, ассоциированном с введением физиологического раствора.

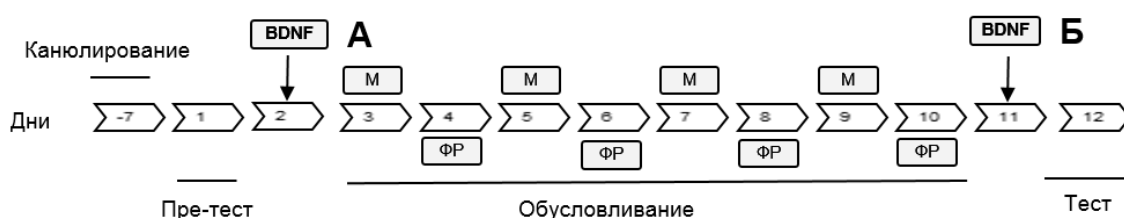


Рисунок 12 – Схема эксперимента УРПМ. За неделю до начала эксперимента крысам имплантировали канюли в срединную ВОП. После периода адаптации животных тестировали на исходное предпочтение одного из отсеков камеры для УРПМ (пре-тест). УРПМ вырабатывали в течение 8 сессий, чередуя внутрибрюшинное введение морфина (M) (10 мг/кг) или физиологического раствора (ФР), сочетая введение с условным обстановочным стимулом. Рекombинантный BDNF человека вводили однократно в срединную ВОП (0,75 мкг) перед фазой обусловливания (A) или перед тестированием УРПМ (Б).

## 2.2. Биохимическая и молекулярно-биологическая часть работы

Для проведения биохимической части работы животных декапитировали, вынимали головной мозг, промывали его в ледяном изотоническом растворе NaCl (0,9 %) и на льду выделяли области головного мозга, соответствующие ФК, гиппокампу и СМ. До проведения исследования образцы тканей хранились при -80 °С.



### 2.2.1. Активность NO-синтазы, концентрация нитратов и нитритов ( $NO_x^-$ ), содержание цГМФ

Активность NOC, концентрацию  $NO_x^-$  и цГМФ измеряли в растворимой фракции гомогенатов отделов мозга. Ткань отделов головного мозга гомогенизировали в 5 объемах буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 5 мМ ЭДТА, 1 мМ ФМСФ, 5 мг/мл пепстатина и 5 мг/мл апротинина. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 13000 g 4 °С, супернатанты хранились до использования при -80°С. При исследовании концентрации  $NO_x^-$  и цГМФ супернатанты были дополнительно депротеинизированы кипячением при 100 °С в течение 5 мин, и последующим осаждением денатурированного белка центрифугированием.

Активность NOC определяли с помощью радиометрического метода, регистрируя скорость накопления [ $^3H$ ]-L-цитруллина в реакции окисления [ $^3H$ ]-L-аргинина, катализируемой NOC (Bredt, Snyder, 1989 в модификации Онуфриева и соавт., 2002). При определении активности фермента реакцию инициировали добавлением супернатанта к 50 мМ HEPES, pH 7,2, содержащего 0,5 мкКи/мл [ $^3H$ ]-L-аргинина, 1 мкМ L-аргинина, 1 мМ  $CaCl_2$ , 5 мкМ ФАД, 5 мкМ ФМН, 0,2 мМ НАДФН и 0,05 мМ ТГБП. После 30 мин инкубации при 37°С образцы помещали на лед и добавляли охлажденную суспензию сильнокислотного катионита DOWEX 50WX8-400 ( $Na^+$ -форма) в 20 мМ HEPES, pH 7,4, содержащем 2 мМ ЭГТА, и инкубировали 60 мин. Радиоактивность [ $^3H$ ]-L-цитруллина в пробах после сорбции определяли на сцинтилляционном счетчике 1414 Winspectral, Wallac Oy, Финляндия. Активность фермента выражали в пмоль [ $^3H$ ]-L-цитруллина, накопленного за мин на мг белка в супернатанте.

Концентрацию  $NO_x^-$  определяли флюориметрическим методом, путем измерения интенсивности флюоресценции 2,3-диаминонафтотриазола, продукта реакции 2,3- диаминонафталина (ДАН) и нитрита в кислой среде (Misko et al., 1993; Lei et al., 1999). Перед основной реакцией проводили восстановление нитратов до нитритов, используя нитратредуктазу из *Aspergillus niger* (Grisham et al., 1996). Депротеинизированные при 100°С супернатанты мозга помещали в нитрит-

регенерирующую систему, содержащую 0,125 Ед/мл нитратредуктазы, 0,025 мМ НАДФН и 0,025 мМ ФАД, приготовленных на 20 мМ Трис-НСl рН 7,6 и инкубировали 30 мин при 37°C. Для окисления непрореагировавшего НАДФН, использовали систему лактатдегидрогеназа-пируват в концентрациях 150 Ед/мл и 10 мМ соответственно. Затем добавляли 0.62 N HCl, содержащую 0.032 мМ ДАН, и инкубировали 10 мин в темноте. Для стабилизации флюоресценции образовавшегося 2,3-диаминонафтотриазола добавляли NaOH так, чтобы его конечная концентрация составила 130 мМ. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлюориметре Hitachi F-3000, Hitachi Corp, Япония, при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 405 нм. Для расчета концентрации  $\text{NO}_x^-$  в мозге был использован стандартный раствор нитрата натрия в концентрациях от 0,1 до 2 мкМ. Концентрацию  $\text{NO}_x^-$  выражали в нмоль на мг белка.

Концентрацию цГМФ измеряли с помощью набора реактивов основанном на конкурентном иммуноферментном анализе согласно рекомендациям производителя (581021; Cayman Chemical, США). Концентрацию цГМФ выражали в пмоль на мг белка.

### *2.2.2. Обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция*

Для анализа экспрессии мРНК и микроРНК проводили ПЦР после этапа обратной транскрипции с регистрацией продуктов амплификации в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ). Общую РНК экстрагировали с помощью системы, содержащей гуанидин изотиоцианат, фенол и хлороформ, дополнительно используя спин-колонки в случае выделения общей РНК, содержащей микроРНК.

Общую РНК из образцов экстрагировали с помощью реагента ExtractRNA (BC032; Евроген, Россия). Чистоту и концентрацию РНК исследовали посредством измерения оптической плотности при 260 нм и 280 нм. Образцы, для которых отношение оптической плотности 260/280 не входило в диапазон между 1.8 и 2.1, исключали из исследования. Целостность РНК оценивали посредством электрофореза в агарозном геле (1.5 %). Для удаления примесей геномной ДНК

изолированная РНК была обработана DNase I (EN0521; Thermo Fisher Scientific, США). РНК (1 мкг) подвергали обратной транскрипции в течение 40 мин при 42 °С с помощью 50 Ед. обратной транскриптазы ProtoScriptII (M0368; NEB, США) в присутствии смеси 1 мкМ олиго(dT)15 и 1 мкМ случайного декануклеотида (SB001 и SB002, соответственно; Евроген, Россия) в качестве праймеров. ПЦР проводили в двух параллельных образцах в присутствии 5 пмоль синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров с помощью набора реактивов, содержащего Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, и интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR GREEN (PK147S; Евроген, Россия). Последовательности синтетических олигонуклеотидов, использованных в работе, представлены в Табл. 13. В качестве мРНК сравнения использовали мРНК соответствующие *gpS18* и *ACTB*.

Общую РНК, содержащую микроРНК, экстрагировали из образцов с помощью набора реактивов *mirVana* (AM1560; Ambion, США). При исследовании уровня микроРНК 1 мкг общей РНК, содержащей микроРНК, подвергали полиаденилированию при участии 1 Ед. поли(А)полимеразы (M0276; NEB, США). Полиаденилированную РНК, содержащую микроРНК (0.5 мкг), подвергали обратной транскрипции с помощью 50 Ед. обратной транскриптазы ProtoScriptII (M0368; NEB, США) и 5 мкМ синтетического олигонуклеотида (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTV-3') в качестве праймера (Wei et al., 2013). ПЦР проводили в двух параллельных образцах в присутствии 5 пмоль синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров с помощью набора реактивов, содержащего Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, и интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR GREEN (PK147; Евроген, Россия). Последовательности прямых праймеров для амплификации микроРНК были подобраны с помощью базы данных miRBase: the microRNA database ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), в качестве универсального обратного праймера использовали олигонуклеотид – 5'-GCTGTCAACGATACGCTACG-3' (Wei et al., 2013).

Последовательности праймеров, специфичных для малой РНК U6 (мишень сравнения для микроРНК), были взяты из работы Wei и соавторов (Wei et al., 2013).

Для проведения ПЦР РВ использовали термоциклер АНК-32 или АНК-М (ИАНП РАН и МГТУ им. Н.Э.Баумана, Россия). ПЦР проводили по следующей программе: 1. 10 с при 95 °С; 2. 10 с при 65 °С; 3. 40 с при 72 °С (50 циклов амплификации). Количество специфической мРНК или микроРНК было оценено посредством регистрации порогового цикла ( $C_t$ ) и последующего сравнительного анализа по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak, Schmittgen 2001).

Таблица 13 – Синтетические олигонуклеотиды использованные в ОТ-ПЦР РВ

Матрица	Последовательность 5' → 3' (прямая)	Последовательность 5' → 3' (обратная)	Источник
BDNF экзон I (NM_012513.4)	GCGTTGAGAAAGCT GCTTCAG	GAATGAGCGAGGTTA CCAATGA	Schmidt et al., 2012
BDNF экзон IV (NM_001270633.1)	TTCCAТAТCAATA ATTTAACTTCTTTGC	CTCTTACTATATATTT CCCCTTCTCTTCAGT	Schmidt et al., 2012
BDNF экзон VI (NM_001270630.1)	TTTGGGGCAGACGA GAAAGC	GGCAGTGGAGTCACA TTGTTGTC	Schmidt et al., 2012
BDNF экзон IX	CCATAAGGACGCGG ACTTGТAC	AGACATGTTTGCGGC ATCCAGG	Tsankova et al., 2004
короткая 3'-UTR BDNF	АCACTGACCATТАА AAGGGGAAGA	AGTTGTGCGCAAATG ACTGT	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)
длинная 3'-UTR BDNF (область 1)	TTAACCTGGAGCAG CTTTGGA	CATTTCCCATCATGCT GCACT	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)
длинная 3'-UTR BDNF (область 2)	TGTCTGTGGCCTTG TTCTCT	ACAATAGGCTTCTGAT GTGGTT	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)
TrkB (GeneBank: NM_012731.3)	TTAGGGCACACGGG CCAGAT	ATCTGCGACTGCGTCA GCTC	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)
rpS18 (NM_213557.1)	TTTTGGGGCCTTCG TGTCGG	CAGCAAAGGCCCAAA GACTCAT	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)
ACTB (NM_031144.2)	GGAGAAGATTTGGC ACCAC	AGGCATACAGGGACA ACAC	Primer-BLAST tool (Ye et al., 2012)

### 2.2.3. Иммунопреципитация хроматина

При исследовании взаимодействия транскрипционных факторов с регуляторными участками гена BDNF использовали метод иммунопреципитации хроматина, совмещенный с ПЦР РВ. Ткань отделов головного мозга измельчали на льду с помощью скальпеля. Для обеспечения сшивки белковых молекул с геномной ДНК кусочки ткани инкубировали в присутствии 1 % формальдегида (свежеприготовленного из параформальдегида) в PBS в соотношении 1:9 в течение 10 мин при комнатной температуре. Для остановки сшивки добавляли глицин до конечной концентрации 125 мМ и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, после чего кусочки ткани дважды отмывали охлажденным PBS и гомогенизировали на льду в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl pH 8,1, 1% SDS (додецилсульфат натрия), 10 мМ ЭДТА и коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440; Thermo Fisher Scientific, США). Далее обрабатывали в ультразвуковой бане на льду (20 циклов 15 сек обработка, 15 сек отдых; 20 циклов 30 сек обработка, 30 сек отдых). Нерастворенную фракцию удаляли с помощью центрифугирования (13000g, 20 мин при 4 °C). С помощью электрофореза в агарозном геле (1 %) было продемонстрировано, что полученный хроматин, содержит фрагменты ДНК 100-700 п.о.. Аликвоты полученного хроматина, содержащего 10-20 % от общего хроматина, использованного для иммунопреципитации сохраняли для проведения положительного контроля содержания ДНК матрицы области-мишени. При исследовании взаимодействия CREB и MeCP2 с промоторными областями гена BDNF в условиях спонтанного синдрома отмены морфина иммунопреципитацию хроматина проводили с помощью набора реактивов ChromaFlash One-Step ChIP Kit (P-2025-96; Epigentek Group Inc., США) согласно рекомендациям производителя посредством антител против CREB (sc-7978X; Santa Cruz Biotechnology, США (4 мкг)) и MeCP2 (sc-137070X; Santa Cruz Biotechnology, США (4 мкг)), а также неиммунных иммуноглобулинов IgG (sc-2025; Santa Cruz Biotechnology, США (4 мкг)) использованных в качестве отрицательного контроля для иммунопреципитации.

При исследовании взаимодействия CREB и EZH2 с промоторными областями гена BDNF, а также оценки пострансляционной модификации гистонов H3 в данных областях в условиях острой фазы алкогольной абстиненции иммунопреципитацию хроматина проводили согласно описанной ниже процедуре. Подготовленный хроматин разбавляли в 10 раз буфером 16,7 мМ Tris-HCl pH 8,1, содержащим 1,1 % Triton X100, 167 мМ NaCl, 0,01 % SDS, 1,2 мМ ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440, ThermoFischer Scientific, США). Иммунопреципитацию проводили на протяжении ночи при 4°C посредством антител против CREB (17-10131; EMD Millipore Corporation, США (2 мкг)), EZH2 (17-662; EMD Millipore Corporation, США (1 мкг)), ацетилированного гистона H3K9ac (17-658; EMD Millipore Corporation, США (2.5 мкг)) и триметилированного гистона H3K27me3 (17-622; EMD Millipore Corporation, США (2 мкг)). По завершении иммунопреципитации добавляли 20 мкл магнитных частиц, связанных с протеином A+G (16-663; EMD Millipore Corporation, США), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для предотвращения неспецифического связывания частицы предварительно блокировали в течение 30 мин при комнатной температуре в присутствии 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (A1391; AppliChem, Германия) и 0,2 мг/мл ДНК, выделенной из спермы лосося (15632011; Thermo Fisher Scientific, США). После иммунопреципитации частицы отмывали буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8,1, 1 % Triton X100, 0,1% SDS, 2 мМ ЭДТА сначала содержащим 150 мМ NaCl, затем 500 мМ NaCl. После чего ДНК-белковые комплексы элюировали инкубируя 30 мин при комнатной температуре в 80 мкл буфера 50 мМ Tris-HCl pH 8,1, 1% SDS, 10 мМ ЭДТА. В дальнейшем элюированные ДНК-белковые комплексы инкубировали при 65°C в течение 4 ч добавляя 0.25 мг/мл протеиназы K (P8102; NEB, США). ДНК была выделена с помощью реактива DNAzol (DN 217; Molecular Research Center, США). Уровень хроматина промоторных областей гена BDNF, связанного с транскрипционными регуляторами оценивали посредством ПЦР РВ с помощью синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров (Табл. 14). Содержание регуляторных областей гена BDNF в иммунопреципитированных образцах выражали в

процентном отношении относительно содержания целевой области ДНК в общей фракции хроматина.

Таблица 14 – Синтетические олигонуклеотиды использованные в ПЦР РВ после иммунопреципитации хроматина

Матрица (Промотор)	Последовательность 5' → 3' (прямая)	Последовательность 5' → 3' (обратная)	Источник
BDNF Экзон I	GCAGTTGGACAGTCA TTGGTAACC	ACGCAAACGCCCTCAT TCTG	Schmidt et al., 2012
BDNF Экзон IV	AACAAGAGGCTGTG ACACTATGCTC	CAGTAAGTAAAGGCTA GGGCAGGC	Schmidt et al., 2012
BDNF Экзон VI	TGGGTACACAGCGGC AGATAAAAAG	TAAGGGCCCGAACATA CGATTGG	Lubin et al., 2008

#### 2.2.4. Иммунопреципитация РНК

Для оценки взаимодействия белковых комплексов с транскриптом BDNF был использован метод иммунопреципитации РНК, совмещенный с ОТ-ПЦР РВ. Образцы отделов головного мозга были гомогенизированы в соотношении 1:40 в PBS, содержащем 0,5% Nonidet P-40, 2 мМ ДТТ, 5 мМ ЕЭДТА, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440; Thermo Fisher Scientific, США) и 50 Ед/мл ингибитора РНКаз (RNI0100; Силекс, Россия). Гомогенат центрифугировали 20 мин при 13000 g 4 °С, полученный супернатант использовали для иммунопреципитации. Растворимую фракцию смешивали с 20 мкл магнитных частиц связанных с протеином А+G (16-663; EMD Millipore Corporation, США), преинкубированных в течение 1 ч с 2 мкг кроличьих поликлональных антител к компоненту комплекса RISC - Argonaute 2 (Ago-2) (ab32381; Abcam, США), РНК-связывающему белку HuD (sc-25360; Santa Cruz Biotechnology, США) или неиммунных антител кролика IgG (sc-2027; Santa Cruz Biotechnology, США), и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для предотвращения неспецифического связывания частицы предварительно блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в присутствии 1 % бычьего сывороточного альбумина (A1391; AppliChem, Германия) и 0,5 % дрожжевой транспортной РНК

(10109517001; Roche, Швейцария). После иммунопреципитации частицы отмывали дважды буфером для гомогенизации. После чего частицы, содержащие РНК-белковые комплексы, инкубировали в гомогенизационном буфере, содержащем 0,2 мг/мл протеиназы К (P8102; NEB, США), и 1 % SDS при 50 °С в течение 10 мин. Общую РНК выделяли посредством набора реактивов mirVana (AM1560; Ambion, США). После этапа обратной транскрипции посредством набора реактивов (K1642; Fermentas, Литва), содержащего высокопроизводительную обратную транскриптазу Maxima, в присутствии смеси случайных гексапраймеров и олиго(dT)18 была проведена ПЦР для амплификации 3'-некодирующей области (3'-UTR, 3'-untranslated region) мРНК BDNF в присутствии специфических олигонуклеотидов в качестве праймеров, в качестве негативного контроля была использована последовательность в кодирующей области мРНК gpS18 (Табл. 4). Содержание транскрипта BDNF в иммунопреципитированных образцах выражали относительно неспецифической иммунопреципитации в присутствии неимунных IgG или в процентном отношении относительно содержания целевой мРНК в общей фракции РНК в образцах до иммунопреципитации.

#### 2.2.5. Иммуноблоттинг

Стандартная процедура иммуноблоттинга использовалась для полуколичественной регистрации белков. Ткань отделов головного мозга гомогенизировали в 10 объемах PBS, содержащего 0,5 % Nonidet P-40, 2 мМ ДТТ, 5 мМ ЭДТА, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440; Thermo Fisher Scientific, США). Гомогенат центрифугировали 20 мин при 13000 g 4 °С, супернатанты хранились до использования при -80 °С. Растворимую фракцию ткани, содержащую равное количество общего белка (10-20 мкг на дорожку), разделяли при постоянном напряжении 100 V в полиакриламидном геле (8-16 %, в зависимости от массы детектируемого белка) в присутствии SDS. Затем белки электрофоретически (100 V, 30 мин) были перенесены на мембрану PVDF (поливинилиденфторид) и блокированы посредством 2-5 % обезжиренного сухого



молока или 5 % бычьего сывороточного альбумина (A1391, AppliChem, Германия) в случае детекции фосфорилированных белков. После блокировки мембраны инкубировались в присутствии специфических первичных антител против BDNF [(ab72439; Abcam, США (1:400)) или (sc-546; Santa Cruz Biotechnology, США (1:200))], общего и фосфорилированного TrkB (ab51190; Abcam, США (1:500) и ab52191, Abcam, США (1:200), соответственно), PLG (sc-25546; Santa Cruz Biotechnology, США (1:500)), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) (sc-8979; Santa Cruz Biotechnology, США (1:1000)), tPA (sc-5241; Santa Cruz Biotechnology, США (1:2000)),  $\beta$ -актина (MA5-15739; Thermo Fisher Scientific, США (1:5000) или  $\beta$ -тубулина (MA5-16308; Thermo Fisher Scientific, США (1:40000)). После инкубации мембран в присутствии вторичных антител против IgG кролика или мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:2000), иммунореактивные белки детектировали посредством сканирования мембран с помощью сканера C-Digit (LI-COR Biosciences, США) в присутствии хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (34077; Pierce, США) и последующего денситометрического анализа посредством программного обеспечения TotalLab 2.00 (Nonlinear Dynamics Ltd., США). Искомый белок регистрировали с помощью специфических первичных антител по наличию полос плотности на соответствующем уровне молекулярной массы (относительно белковых маркеров молекулярной массы). При обсчете результатов содержание актина или тубулина использовали в качестве факторов нормализации.

#### *2.2.6. Иммуноферментный анализ*

Содержание белков BDNF в экстрактах ткани отделов головного мозга было исследовано посредством наборов реактивов для иммуноферментного анализа (CYT306, Millipore Corp., США) согласно рекомендациям производителя. Концентрация белка была рассчитана относительно калибровочной кривой, построенной с использованием известных концентраций BDNF (нижний порог детектирования 10 пг/мл). Концентрация представлена в виде пг/мг общего белка.

### 2.2.7. Содержание общего белка

Концентрацию общего белка в экстрактах ткани оценивали с помощью спектрофотометрического метода с использованием красителя Кумасси голубого (Bradford, 1976) или в случае, если в экстрактах присутствовали детергенты с использованием набора реактивов на основе бицинхониновой кислоты (23227, Pierce, США).

## 2.3. Статистическая обработка материала

Статистическую обработку и анализ результатов проводили при помощи пакета программ STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США) и Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA). Критерии Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса использовали для тестирования соответствия распределения значений переменных в исследованных выборках нормальному. Данные представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  ошибка среднего ( $SE$ ) либо в виде медианы (нижний квантиль, верхний квантиль) – Med (Q25, Q75). При расчете достоверности различий значений исследованных показателей между двумя экспериментальными группами использовали t-тест Стьюдента или U-тест Манна-Уитни для независимых выборок. При сравнении нескольких независимых выборок использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки для множественного сравнения средних или ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса и последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна или Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. При расчете достоверности различий между зависимыми выборками использовали ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних. При анализе влияния системного введения L-NAME и инъекций BDNF в ВОП на частоту встречаемости поведенческих признаков абстинентных нарушений использовали точный критерий Фишера (таблица 2×2). Корреляционный анализ проводили, рассчитывая коэффициент корреляции Спирмана или Пирсона. Различия считались достоверными при значениях  $p < 0,05$ .

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно цели и задачам исследования была реализована ранее описанная модель субхронической интоксикации морфином, которая приводит к выработке физической зависимости, о наличии которой могут свидетельствовать специфические для грызунов признаки опиной абстиненции после отмены интоксикации (Rahman et al., 2002). Ниже представлены результаты типичного эксперимента по моделированию синдрома отмены морфина у крыс. Через 38 ч после спонтанной отмены морфина животные демонстрируют наличие типичных признаков абстиненции у грызунов: прыжки, отряхивания по типу “мокрой собаки”, корчи, жевание, скрежет зубами, встряхивание передними лапами, диарея, птоз и диспноэ (Рис. 13, Табл. 15).

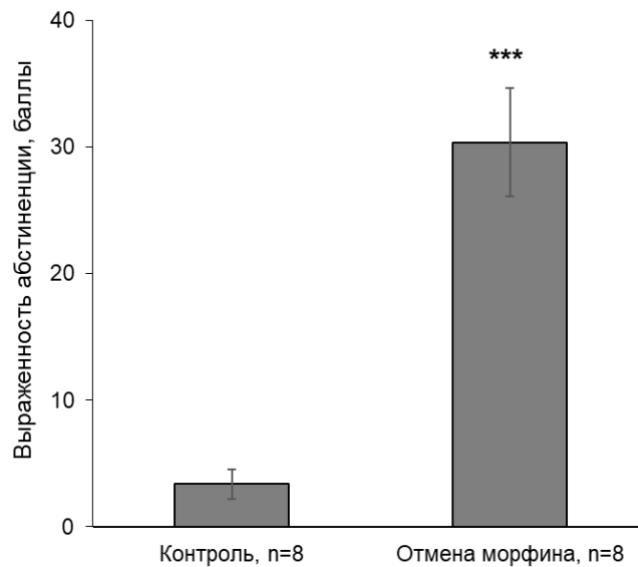


Рисунок 13 – Выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла (см. таблицу 12 и Rahman et al., 2002). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: \*\*\* -  $p < 0,0005$ . t- тест Стьюдента.

Согласно двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с повторными измерениями фактор «длительность отмены» ( $F_{(3,42)} = 11,496$ ,  $p = 1,2 \times 10^{-5}$ ), но не фактор «морфин» ( $F_{(1,14)} = 4.492$ ,  $p = 0,054$ ), оказывает эффект на массу тела животных. Кроме того, выявлено значимое взаимодействие данных факторов в отношении массы тела ( $F_{(3,42)} = 20,121$ ,  $p = 3,08 \times 10^{-8}$ ). Последующее множественное

сравнение средних выявило снижение массы тела по сравнению как со значениями в контрольной группе, так и внутри группы, получавшей морфин по сравнению с массой тела на более ранних сроках отмены, что также является характерным признаком абстиненции (Рис. 14).

Таблица 15 – Структура синдрома отмены морфина

Признак абстиненции (балл)	Частота встречаемости признака (число животных, продемонстрировавших признак)		Значение $p$ (Точный критерий Фишера)
	Контроль, $n=8$	Отмена морфина, $n=8$	
Прыжки (2)	0	5	0,026
Отряхивания по типу “мокрой собаки” (2)	0	4	0,077
Корчи (2)	1	5	0,119
Жевание (2)	3	6	0,315
Скрип зубами (2)	1	6	0,041
Встряхивание передними лапами (2)	1	8	0,001
Диарея (1)	1	3	0,569
Птоз (2)	2	5	0,315
Диспноэ (2)	1	7	0,010

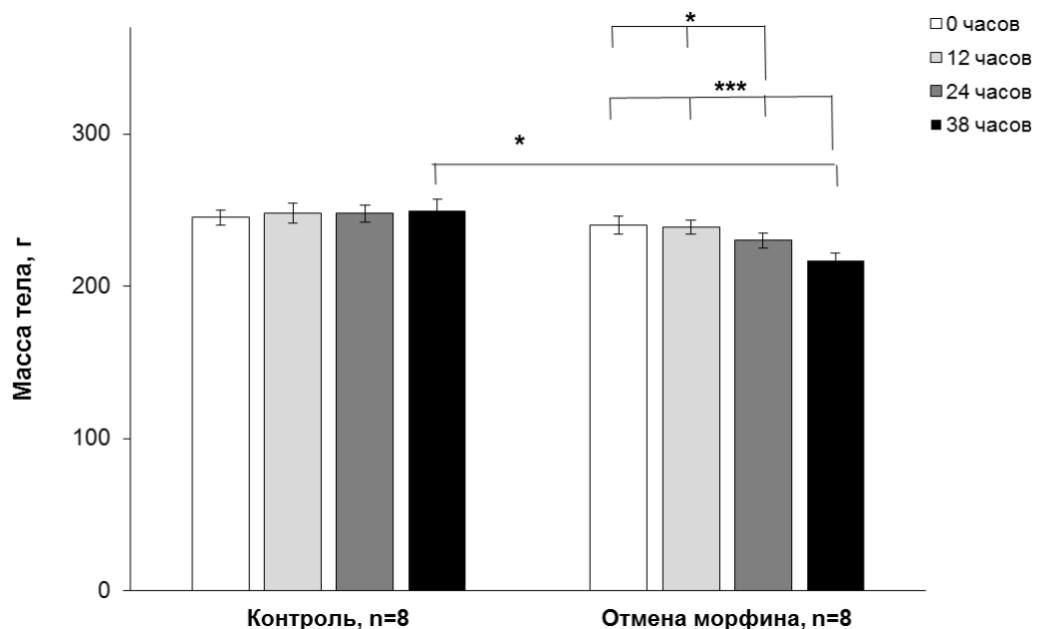


Рисунок 14 – Динамика массы тела животных при отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от указанной группы: \* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,0005$ . Двухфакторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

### **3.1. Особенности и потенциальные молекулярные механизмы экспрессии BDNF в ЦНС крыс при спонтанной отмене морфина.**

#### *3.1.1. Уровень мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина<sup>1</sup>*

На начальной стадии исследований была проведена оценка уровня мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Субхроническая интоксикация морфином также как и отмена морфина сопровождается пластическими изменениями во многих отделах головного мозга, при этом морфологические изменения в структурах, входящих в состав неокортекса, стриатума, гиппокампа и СМ подробно описаны и могут считаться основой формирования зависимости (Bogolevov, 1985; Sklair-Tavron et al., 1996; Robinson, Kolb, 1999; Robinson et al., 2002; Spiga et al., 2003; Spiga et al., 2005). Учитывая, что BDNF играет непосредственную роль в нейропластичности как в норме, так и при патологии можно предполагать, что экспрессия BDNF при отмене морфина может изменяться именно в этих структурах.

У млекопитающих ген BDNF имеет, по меньшей мере, 9 промоторов, расположенных в 5' области соответствующих экзонов (Aid et al., 2007). Наличие альтернативных промоторов в гене BDNF определяет гибкость и многогранность транскрипционной регуляции в ответ на наличие определенных стимулов, так известно, что каждый промотор активируется специфическими сигнальными каскадами (Metsis et al. 1993; Aid et al., 2007). По завершении альтернативного сплайсинга образуются экзон-специфические транскрипты, содержащие один из некодирующих экзонов (I – VIII) и один кодирующий экзон (IX), расположенные в 5' и 3' областях соответственно, так что каждый транскрипт кодирует одинаковый пептид (Cattaneo et al., 2016). Функциональная значимость тонкой транскрипционной регуляции остается загадкой, однако, известно, что транскрипты, содержащие определенные экзоны, имеют определенную

---

<sup>1</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2011).

пространственную локализацию внутри нейрона (Chiaruttini et al., 2008; Baj et al., 2011).

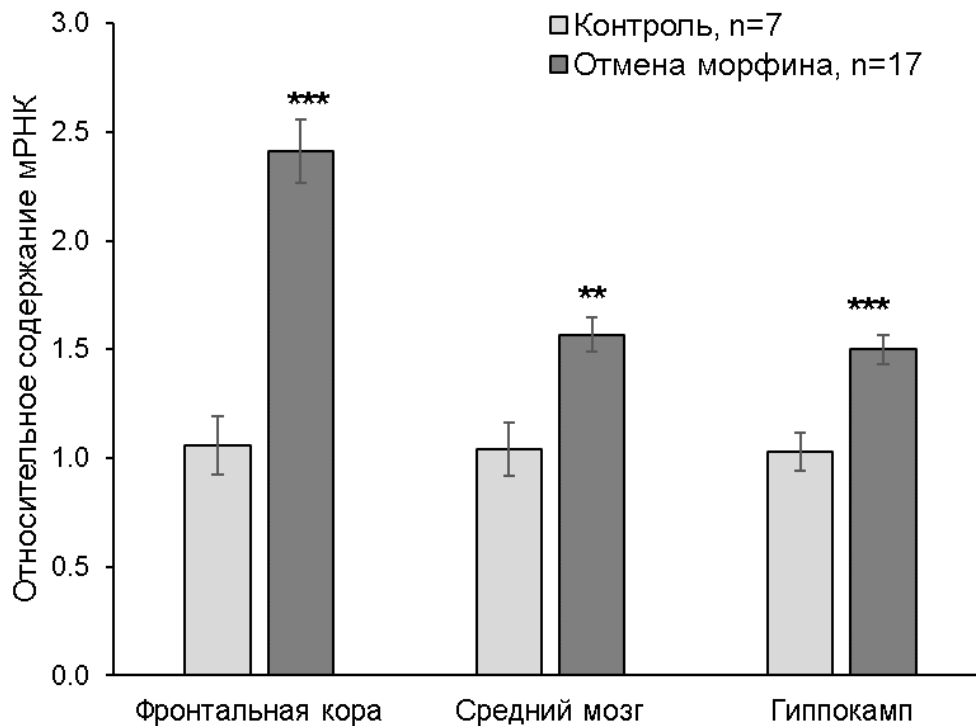


Рисунок 15 – Содержание мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0,0005$ . t-тест Стьюдента.

Транскрипты BDNF, содержащие экзон I, широко представлены в нервной ткани, однако, не экспрессируются в тканях не нейронального происхождения (Timmusk et al. 1993; Aid et al. 2007; Pruunsild et al. 2007). Уровень данного варианта мРНК значительно увеличивается в ответ на активацию нейронов (Metsis et al. 1993; Timmusk et al. 1993). Резонно полагать, что именно мРНК BDNF, содержащая экзон I, может увеличиваться в отделах головного мозга при манифестации синдрома отмены морфина. Таким образом, на первом этапе работы мы исследовали особенности экспрессии мРНК BDNF, содержащей экзон I, в ФК, гиппокампе и СМ. Стриатум не исследовали, поскольку мРНК BDNF экспрессируется на уровне, не позволяющем надежно детектировать его содержание (Altar et al., 1997). Оказалось, что спонтанная отмена морфина

сопровождалась значимым разной степени выраженности повышением уровня мРНК BDNF в ФК, гиппокампе и СМ (Рис. 15).

Субхроническое воздействие препаратов опиоидной группы и последующая их отмена сопровождается адаптационными процессами и изменением функционирования многих отделов головного мозга. Согласно данным литературы в манифестации собственно абстинентного синдрома при сформированной физической зависимости задействованы структуры входящие в состав СМ и неокортекса (Simonato, 1996; Williams et al., 2001; Welsch et al., 2020) тогда как гиппокамп играет роль в процессах обучения и памяти, связанных с циклическими процессами подкрепления и аверсии при формировании зависимости (Kutlu, Gould, 2016). В связи, с чем дальнейшие исследования были сфокусированы на ФК и СМ.

### *3.1.2. Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при интоксикации и спонтанной отмене морфина<sup>2</sup>*

Согласно литературным данным помимо мРНК BDNF, содержащей экзона I, наиболее реактивными экзонами в ответ на разнообразные стимулы являются транскрипты BDNF, содержащие экзона IV и VI (Lubin et al., 2008; Sadri-Vakili et al., 2010; Kabir et al., 2013; Licata et al., 2013; Duclot et al., 2013), содержание которых и было исследовано на следующем этапе. При спонтанной отмене морфина было подтверждено повышение экспрессии мРНК BDNF содержащей только экзон I в ФК и СМ, однако уровни экзона IV и VI оставались неизменными (Рис. 16В). Примечательно, что ни при острой (Рис. 16А), ни при субхронической интоксикации (Рис. 16Б) изменения уровня экзон-специфической мРНК BDNF не отмечалось.

---

<sup>2</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Peregud et al., 2015).

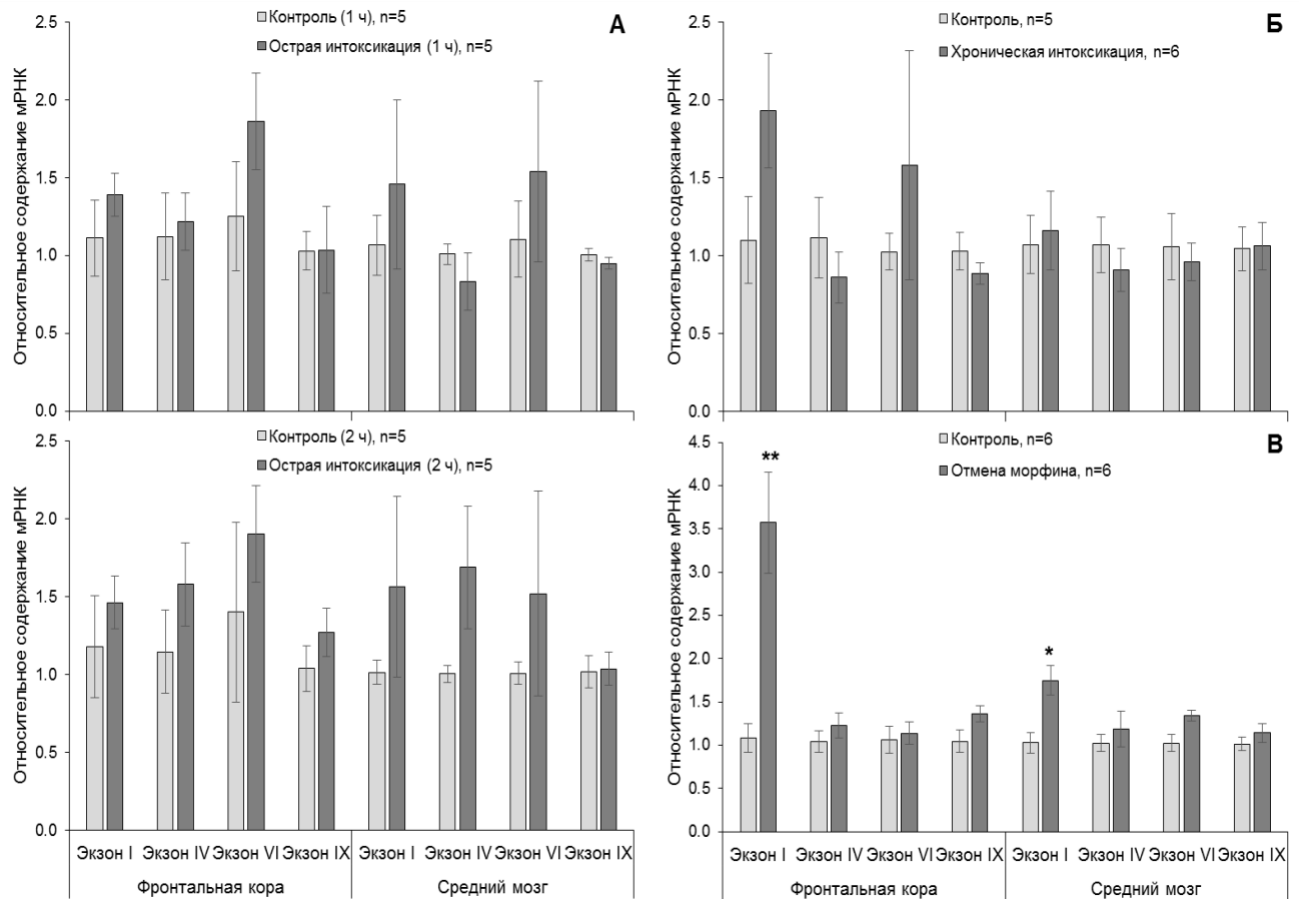


Рисунок 16 – Содержание экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при острой (А) и субхронической (Б) интоксикации и спонтанной отмене морфина (В). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ . t-тест Стьюдента.

Увеличение мРНК BDNF, содержащей экзон I, во время спонтанной отмены морфина наиболее вероятно отражает активацию транскрипции с соответствующего промотора. Индивидуальные промоторы гена BDNF имеют различную чувствительность по отношению к специфическим стимулам. В частности, промотор экзона I активируется в ответ на стимуляцию NMDA рецептора, а в основе транскрипции соответствующей мРНК лежит реконструкция хроматина и реорганизация репрессирующих и активирующих транскрипционных регуляторов на промоторе (Tian et al., 2009). Наиболее вероятно, что гиперстимуляция глутаматных рецепторов, описанная для состояния опийной отмены (Tanganelli et al., 1991; Rasmussen et al., 1995), предшествует увеличению



мРНК BDNF, содержащей экзон I. Взаимодействие между глутаматергической системой и BDNF хорошо описано и играет определенную роль в развитии различных психиатрических заболеваний, таких как депрессия (Гуляева, 2017). Таким образом, мы можем предположить, что уровень мРНК BDNF при отмене морфина регулируется на транскрипционном уровне.

В основе зарегистрированных изменений уровня мРНК BDNF, содержащей экзона I, в ЦНС при абстиненции могут лежать реализация как транскрипционных, так и посттранскрипционных механизмов. В дальнейшем были проведены исследования потенциального вклада данных процессов в изменения уровня BDNF в ФК и СМ при спонтанной отмене морфина на фоне сформированной зависимости.

### *3.1.3. Потенциальные транскрипционные механизмы экспрессии гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина<sup>3</sup>*

Транскрипционная активность гена BDNF в нервной ткани может определяться балансом взаимодействия транскрипционных факторов и ко-регуляторов транскрипции с промоторными областями гена, которые могут, как активировать транскрипцию, так и оказывать негативное влияние на данный процесс (Flavell, Greenberg, 2008; You, Lu, 2023). Так наиболее изученными регуляторами транскрипции BDNF являются транскрипционный фактор CREB и ко-регулятор транскрипции MeCP2. CREB, связываясь с регуляторными участками гена BDNF, инициирует его транскрипцию, тогда как MeCP2 оказывает негативный эффект на активность гена рекрутируя репрессорные комплексы (Bouille et al., 2012). Посредством иммунопреципитация хроматина мы исследовали взаимодействие данных регуляторов транскрипции с промоторами экзонов I, IV и VI гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Было установлено, что при отмене морфина наблюдалось увеличение уровня активной

---

<sup>3</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Peregud et al., 2015).

фосфорилированной формы CREB связанной только с промотором экзона I в ФК, тогда как в СМ увеличение уровня связываемости CREB не зависло от экзона (Рис. 17А). При этом в исследованных отделах головного мозга изменений уровня MeCP2 представленного на промоторах BDNF при отмене морфина не отмечалось (Рис. 17Б).

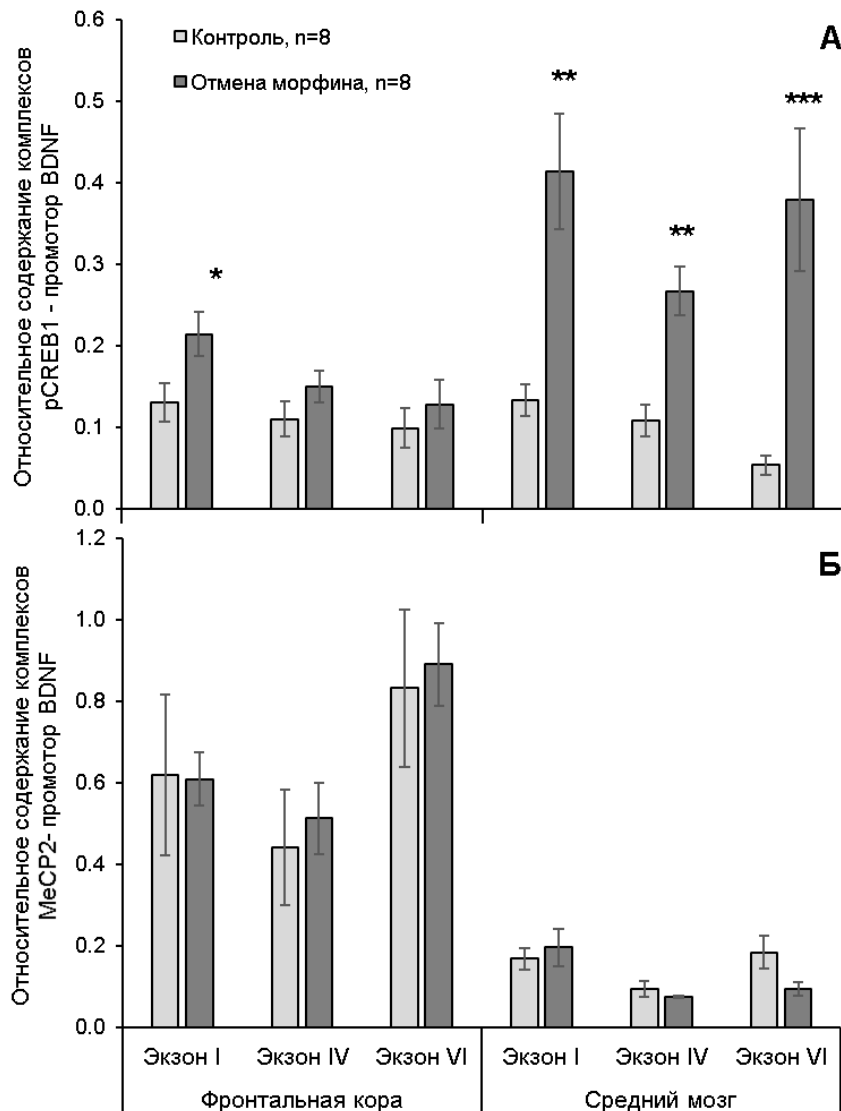


Рисунок 17 – Взаимодействие регуляторов транскрипции CREB (А) и MeCP2 (Б) с промоторами экзонов I, IV и VI гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0,0005$ . t-тест Стьюдента.

Регуляторные участки гена BDNF содержат консенсусные участки связывания для ряда транскрипционных факторов, которые обеспечивают экспрессию BDNF на уровне, соответствующем активности нервной ткани (West et al. 2014). В ФК и СМ увеличение уровня CREB связанного с промотором экзона I совпадает с увеличением уровня соответствующей мРНК BDNF. Учитывая, что в литературе описана регуляция промотора экзона I посредством CREB (Tabuchi et al. 2002), можно полагать что CREB, по крайней мере, отчасти обеспечивает экспрессию мРНК BDNF, содержащей экзон I, при отмене морфина.

#### *3.1.4. Потенциальные посттранскрипционные механизмы экспрессии BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина<sup>4</sup>*

После того как ген транскрибировался судьба мРНК определяется комплексом посттранскрипционных событий, которые кроме прочего могут включать регуляцию посредством микроРНК (Qureshi, Mehler, 2012). На следующем этапе мы оценивали возможное участие микроРНК в посттранскрипционной регуляции мРНК BDNF в мозге крыс, зависимых от морфина, при абстиненции. Есть несколько указаний на то, что действие опиатов действительно может быть опосредовано микроРНК. При воздействии опиатов отмечается повышение в культивируемых нейронах или *in vivo* в гиппокампе уровня микроРНК let-7 (He et al., 2010), miR-23b (Wu et al., 2009) и miR-339-3p (Wu et al., 2013), которые, напрямую связываясь с 3'-UTR  $\mu$ -опиоидного рецептора, снижают его экспрессию, что может модулировать толерантность к антиноцицептивному эффекту морфина. В рамках решения поставленной задачи уровень экспрессии мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при абстиненции был сопоставлен с уровнем микроРНК, которые потенциально могут регулировать мРНК BDNF посредством комплементарных участков связывания в 3'-UTR. МикроРНК включалась в исследование при соблюдении следующих условий: i) 3'-UTR мРНК BDNF

---

<sup>4</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2016 (a); Peregud et al., 2022 (a)).

содержит комплементарные сайты связывания для микроРНК, предсказанные по меньшей мере двумя алгоритмами; кроме того, согласно литературе ii) BDNF является экспериментально валидированной мишенью данной микроРНК и/ или экспрессия данной микроРНК в ЦНС изменяется при воздействии психоактивных веществ с выраженным потенциалом развития зависимости от них (алкоголь, кокаин, опиаты).

Таблица 16 – микроРНК потенциально способные регулировать BDNF при действии морфина

микроРНК	Алгоритм, предсказания комплементарных сайтов				Взаимодействие валидировано экспериментально	Изменение экспрессии при действии ПАВ
	mirDB	Miranda	PicTar	TargetScan		
miR-1	√	√	√	√	Varendi et al. 2014	Кокаин, прилежащее ядро ↑ (Eipper-Mains et al. 2011)
miR-10a	√	√	√	√		Алкоголь, гиппокамп ↑ (Prins et al. 2013)
miR-10b			√	√	Varendi et al. 2014	
miR-15b	√	√	√	√		Алкоголь, фронтальная кора ↑ (Lewohl et al. 2011)
miR-22			√	√	Muñoz-Gimeno et al. 2011	Кокаин, гиппокамп ↑ (Chen et al. 2013)
miR-103	√	√	√	√		Алкоголь, гиппокамп ↓ (Prins et al. 2013)
miR-129	√	√				Кокаин, гиппокамп ↑ (Chen et al. 2013)
miR-182	√	√	√	√	Li et al. 2016	Кокаин, прилежащее ядро ↑ (Eipper-Mains et al. 2011)
miR-190		√		√		Фентанил, гиппокамп ↓ (Zheng et al. 2010)
miR-191	√	√		√	Varendi et al. 2014	Кокаин, гиппокамп ↓ (Chen et al. 2013)
miR-206	√	√	√	√	Taroscick et al. 2014 Radzikinas et al. 2011 Tian et al. 2014 Lee et al. 2012 Miura et al. 2012	Алкоголь, фронтальная кора ↑ (Taroscick et al. 2013, 2014)
miR-210		√		√	Fasanaro et al. 2009	
miR-365		√		√		Морфин, фентанил, гиппокамп ↑ (Zheng et al. 2010)
miR-382			√	√		Кокаин, прилежащее ядро ↑ (Eipper-Mains et al. 2011) Алкоголь, прилежащее ядро ↓ (Li et al. 2013)
miR-410		√		√		Алкоголь, неокортекс ↑ (Gorini et al. 2013)
miR-495	√	√		√		Алкоголь, гиппокамп ↓ (Prins et al. 2013)
miR-497	√	√		√		Алкоголь, гиппокамп ↑ (Yadav et al. 2011)

МикроРНК, отвечающими данным требованиям оказались miR-1, miR-10a, miR-10b, miR-15b, miR-22, miR-103, miR-129, miR-182, miR-190, miR-191, miR-195, miR-206, miR-210, miR-365, miR-382, miR-410, miR-495, miR-497 (Табл. 16). Кроме того, исследовали микроРНК, которые не имеют сайтов связывания в мРНК BDNF, но активно вовлечены в функционирование нервной системы: miR-124, miR-132, miR-134, miR-212 (Im, Kenny, 2012). В использованных экспериментальных условиях нам не удалось надежно детектировать miR-1, miR-10a, miR-10b, miR-190 в образцах отделов головного мозга (неэффективная ПЦР, и/или значение  $C_t > 35$  циклов).

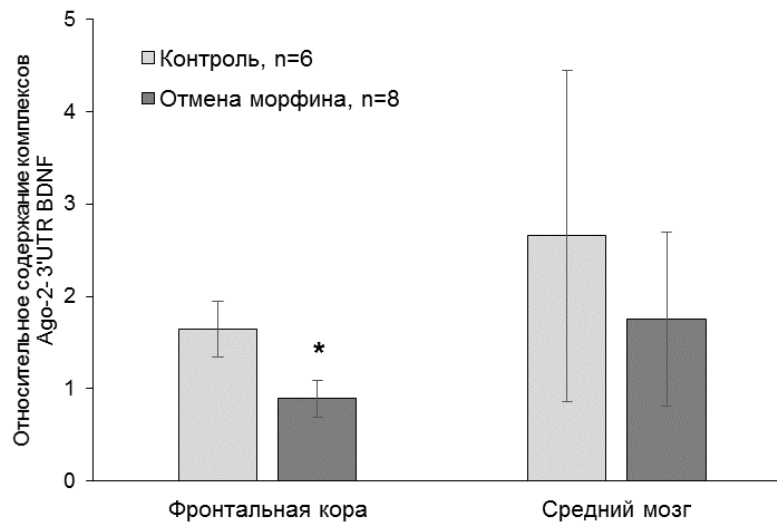


Рисунок 18 – Взаимодействие РНК-связывающего белка Ago-2 с 3'-UTR BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: \* -  $p < 0,05$ . t-тест Стьюдента.

Косвенным доказательством регуляции стабильности мРНК посредством микроРНК, могут являться разнонаправленные изменения уровня мРНК и комплексообразования компонентов белкового РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RISC, RNA-induced silencing complex), в частности, белка Argonaute 2 (Ago-2), с 3'-UTR мРНК мишени, в нашем случае BDNF. В связи с чем дополнительно оценивали взаимодействие Ago-2 с 3'-UTR мРНК BDNF. Установили, что при отмене морфина повышенный уровень мРНК BDNF в ФК

сопровождался снижением уровня микроРНК miR-206 (Табл. 17) и уровня Ago-2, связанного с 3'-UTR мРНК BDNF (Рис. 18). В СМ при абстиненции отмечалось снижение уровня miR-382 (Табл. 17), однако характер взаимодействия Ago-2 с 3'-UTR мРНК BDNF не изменялся (Рис. 18).

Таблица 17 – Содержание микроРНК, имеющих комплементарные участки связывания в 3'-UTR мРНК BDNF, во фронтальной коре и среднем мозге крыс после спонтанной отмены морфина

микроРНК	Относительное содержание микроРНК			
	Фронтальная кора		Средний мозг	
	Контроль, n=6	Отмена морфина, n=6	Контроль, n=6	Отмена морфина, n=6
miR-15b	1,03 ± 0,11	0,92 ± 0,10	1,01 ± 0,06	0,84 ± 0,09
miR-22	1,02 ± 0,09	0,92 ± 0,10	1,02 ± 0,09	0,99 ± 0,10
miR-103	1,02 ± 0,10	0,85 ± 0,05	1,01 ± 0,06	0,90 ± 0,05
miR-124	1,09 ± 0,22	0,78 ± 0,04	1,04 ± 0,12	0,87 ± 0,10
miR-129	1,04 ± 0,15	0,85 ± 0,07	1,02 ± 0,10	1,12 ± 0,11
miR-132	1,01 ± 0,06	1,00 ± 0,05	1,01 ± 0,06	1,07 ± 0,09
miR-134	1,15 ± 0,29	0,86 ± 0,12	1,07 ± 0,16	0,88 ± 0,11
miR-182	1,15 ± 0,28	0,44 ± 0,06	1,05 ± 0,15	0,87 ± 0,17
miR-191	1,01 ± 0,07	0,96 ± 0,08	1,00 ± 0,04	1,02 ± 0,07
miR-206	1,08 ± 0,21	<b>0,45 ± 0,10 *</b>	1,07 ± 0,16	0,80 ± 0,14
miR-210	1,08 ± 0,17	0,97 ± 0,05	1,01 ± 0,06	0,98 ± 0,08
miR-212	1,03 ± 0,11	0,72 ± 0,06	1,05 ± 0,16	0,96 ± 0,13
miR-365	1,01 ± 0,06	1,19 ± 0,27	1,02 ± 0,09	1,16 ± 0,13
miR-382	1,05 ± 0,13	0,91 ± 0,09	1,00 ± 0,04	<b>0,81 ± 0,06 *</b>
miR-410	1,10 ± 0,21	0,93 ± 0,07	1,02 ± 0,09	1,02 ± 0,11
miR-495	1,02 ± 0,10	1,13 ± 0,05	1,01 ± 0,05	0,95 ± 0,07
miR-497	1,14 ± 0,26	0,73 ± 0,12	1,15 ± 0,32	0,67 ± 0,11

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего. \* - достоверность различий от группы Контроль при  $p < 0,05$ . t-тест Стьюдента.

Учитывая, что ранее неоднократно было показано, что BDNF является прямой мишенью miR-206 (Radzikinas et al. 2011; Lee et al. 2012; Miura et al. 2012; Tian et al. 2014; Tarosick et al. 2014), с определенной долей уверенности можно полагать, что именно снижение уровня miR-206, и, как следствие, снижение RISC-опосредованной деградации BDNF может составлять механизм увеличения экспрессии BDNF при опиоидной абстиненции в ФК. До настоящего момента белок Ago-2 при опиоидной интоксикации был исследован лишь в немногих работах. В

частности, было продемонстрировано, что индуцированная отмена морфина (но не острая интоксикация) сопровождается снижением экспрессии белка Ago-2 в ВОП (García-Pérez et al., 2013 (а)). С другой стороны, было показано, что как острая, так и субхроническая интоксикация морфином сопровождается повышением уровня мРНК Ago-2, тогда как уровень белка Ago-2 снижается при субхронической интоксикации и повышается при индуцированной отмене, что может являться основой динамической регуляции экспрессии тирозингидроксилазы при зависимости от морфина (García-Pérez et al., 2013 (б)). Очевидно, что Ago-2 может играть существенную роль в процессах формирования зависимости. Так, Schaefer и соавторы установили, что мыши, нокаутированные по гену Ago-2, демонстрируют сниженную мотивацию к самовведению кокаина, что сопровождается изменением экспрессии ряда микроРНК в стриатуме, в том числе микроРНК, которые потенциально могут регулировать уровень BDNF (Schaefer et al., 2010).

Таким образом, мы выявили разнонаправленные изменения уровня мРНК BDNF, являющейся мишенью микроРНК, уровнем miR-206 и комплексообразования компонента RISC с мишенью, что может являться косвенным доказательством регуляции стабильности мРНК BDNF посредством микроРНК в условиях зависимости от опиатов. Можно предположить, что одним из механизмов повышения уровня мРНК BDNF в ФК может быть ослабление ее деградации посредством микроРНК. Экспериментальные данные о регуляции BDNF посредством микроРНК при опиоидной зависимости до настоящего момента не были описаны.

РНК-связывающие белки могут регулировать альтернативный сплайсинг, трансляцию, транспорт или стабильность мРНК мишени (Glisovic et al., 2008). Одним из РНК-связывающих белков, который регулирует мРНК BDNF является нейрон-специфический белок HuD (ELAV-like protein 4, также известный как Hu-antigen D). HuD взаимодействует с 3'-UTR мРНК BDNF, стабилизируя мРНК и способствуя эффективной трансляции локально в дендритах, что может играть важную роль в синаптогенезе (Allen et al., 2013; Vanevski, Xu, 2015).

Последовательности мРНК, содержащие пентамеры AUUUA (AU-богатые элементы), являются одними из консенсусных сайтов связывания HuD (Bronicki, Jasmin, 2013). Три области в 3'-UTR мРНК BDNF содержат такие последовательности: одна область представлена в коротком варианте 3'-UTR и две области в длинном варианте 3'-UTR (Рис. 19).

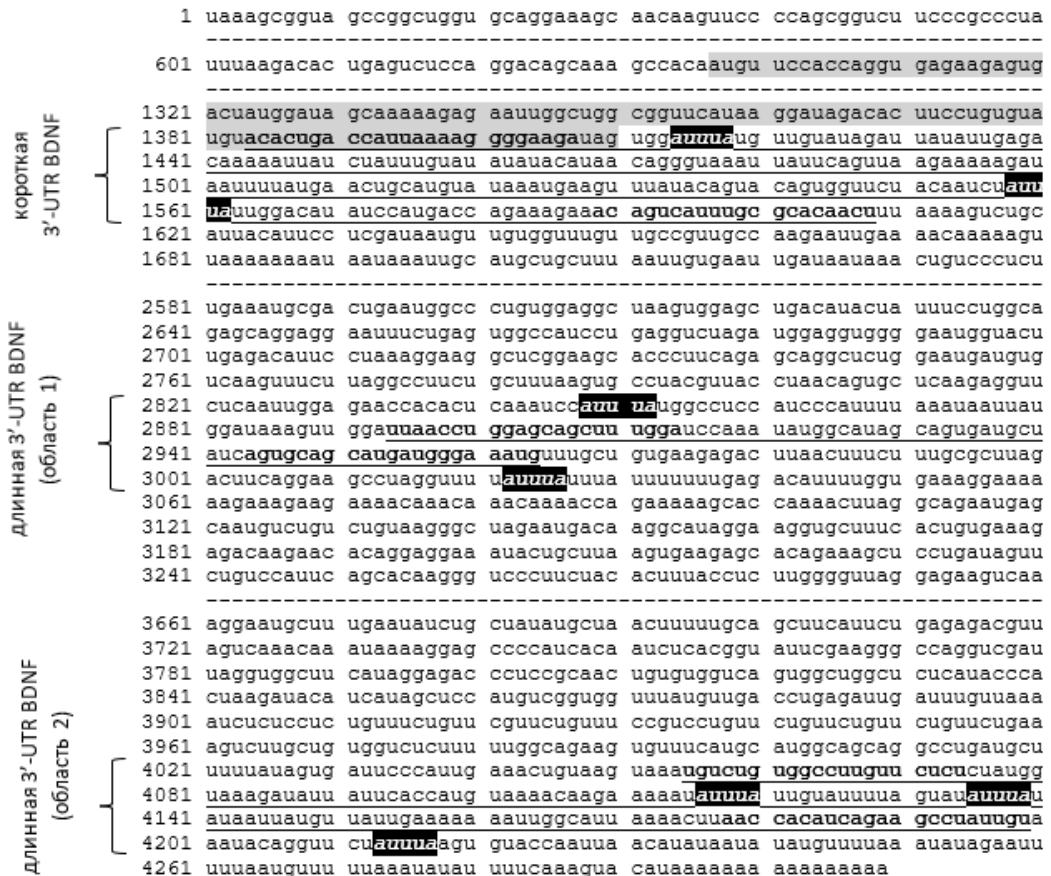


Рисунок 19 – Локализация сайтов связывания HuD в 3'-UTR мРНК BDNF крысы. Последовательность мРНК представлена согласно GenBank (NM\_012513.4). Пентамеры AUUUA выделены черным. Кодировочная последовательность (нуклеотиды 637-1410) выделена серым, 3'-UTR составляет последовательность нуклеотидов 1411-4309. Последовательности, выделенные подчеркиванием, были амплифицированы в исследованиях РНК иммунопреципитации.

Посредством иммунопреципитации РНК мы установили, что HuD преимущественно связывается с областями, содержащими AU-богатые элементы, локализованные в мРНК BDNF с длинной 3'-UTR (Рис. 20). Действительно согласно ряду исследований, HuD взаимодействует преимущественно длинной



формой 3'-UTR BDNF (Allen et al., 2013, Vanevski, Xu, 2015). Посредством комбинации биоинформационного подхода и иммунопреципитации РНК Vicario и соавторы продемонстрировали что 3'-UTR BDNF содержит эволюционно консервативные участки связывания для белков семейства Hu: в коротком варианте 3'-UTR (нуклеотиды 1–321 в 3'-UTR) и в длинном варианте 3'-UTR в регионах, соответствующих центральной (нуклеотиды 890–1510 в 3'-UTR) и терминальной (нуклеотиды 2339–2790 в 3'-UTR) областям (Vicario et al., 2015). В соответствии с данными литературы в представленной работе также было продемонстрировано, что HuD связывается преимущественно с центральным регионом 3'-UTR BDNF. При субхронической интоксикации морфином было выявлено снижение уровня HuD связанного с длинной 3'-UTR мРНК BDNF в ФК, но не СМ (Рис. 20). Содержание собственно коротких или длинных вариантов мРНК 3'-UTR BDNF в ФК и СМ не изменялось ни при интоксикации, ни при отмене морфина (Табл. 18).

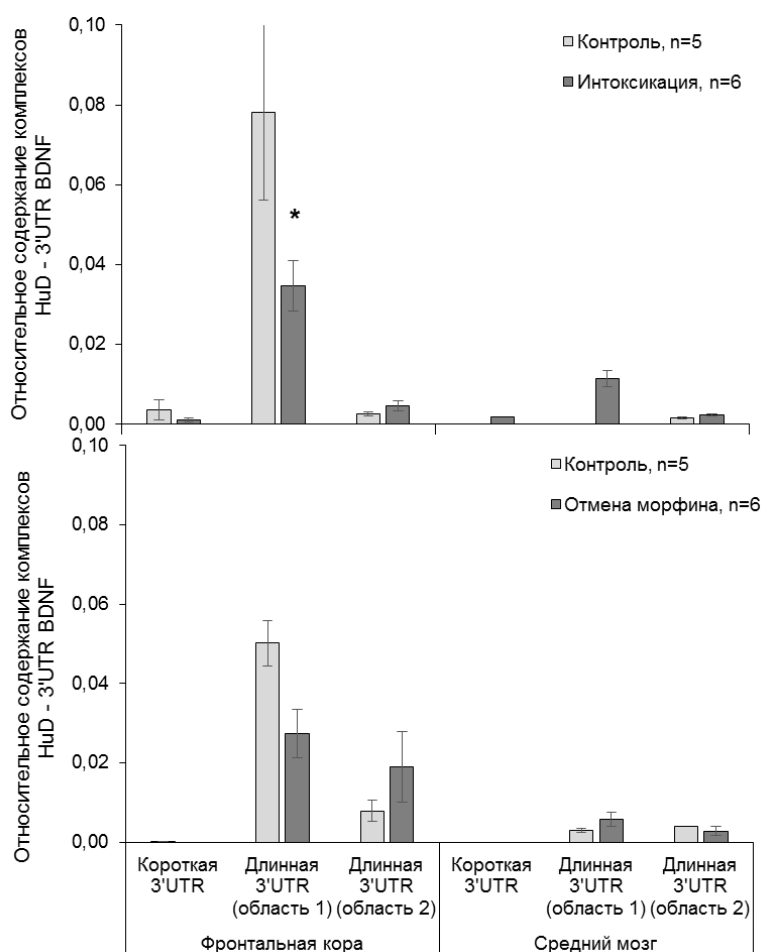


Рисунок 20 – Взаимодействие РНК-связывающего белка HuD с 3'-UTR BDNF в отделах головного мозга крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: \* -  $p < 0,05$ . t-тест Стьюдента.

Таблица 18 – Влияние интоксикации морфина и его отмены на содержание 3'-UTR мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс

Регион мозга	3'-UTR мРНК BDNF	Относительное содержание мРНК			
		Контроль, n=5	Интоксикация, n=6	Контроль, n=5	Отмена морфина, n=6
Фронтальная кора	Короткая	1,03 ± 0,11	0,78 ± 0,11	1,11 ± 0,23	1,10 ± 0,24
	Длинная 1	1,02 ± 0,10	0,99 ± 0,14	1,01 ± 0,06	1,12 ± 0,08
	Длинная 2	1,01 ± 0,09	1,01 ± 0,09	1,03 ± 0,13	0,96 ± 0,14
Средний мозг	Короткая	1,17 ± 0,41	0,64 ± 0,07	1,03 ± 0,15	0,93 ± 0,66
	Длинная 1	1,06 ± 0,19	1,08 ± 0,13	1,18 ± 0,41	1,17 ± 0,35
	Длинная 2	1,04 ± 0,14	1,09 ± 0,08	1,02 ± 0,12	1,11 ± 0,35

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего.

Взаимодействие HuD с 3'-UTR BDNF регулирует стабильность и трансляцию либо транспорт и внутриклеточную локализацию соответствующей мРНК. Стабилизация мРНК является одним из следствий взаимодействия HuD с длинной формой 3'-UTR BDNF, что в последующем сопровождается увеличением экспрессии BDNF как *in vitro*, так и *in vivo* (Lim, Alkon, 2012; Allen et al., 2013). Учитывая, что согласно литературным данным HuD является позитивным регулятором мРНК BDNF (Lim, Alkon, 2012), мы предполагали, что повышение мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене будет сопровождаться повышением уровня HuD, связанного с 3'-UTR мРНК BDNF. Напротив, результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о разнонаправленном изменении данных показателей в ФК. Регуляция трансляции BDNF в дендритах, опосредованная HuD зависит от нейрональной активности и фосфорилирования HuD протеин киназой C: в условиях покоя HuD тормозит трансляцию конструкторов, содержащих длинную форму 3'-UTR BDNF, тогда как при стимуляции нейронов сайты фосфорилирования опосредуют локальную трансляцию (Vanevski, Xu, 2015). Важно, что увеличение уровня BDNF опосредованное HuD противодействует повреждению нейронов как показано на животных моделях нейропатии (Sanna et al., 2016) и повреждении нервов (Sanna et al., 2017). Известно, что HuD может регулировать пространственную локализацию мРНК BDNF внутри нейрона. В частности, его связывание с мРНК BDNF,

содержащей длинную 3'-UTR, обеспечивает локализацию мишени в теле нейрона, тогда как ослабление взаимодействия обеспечивает локализацию в дендритах (Vicario et al., 2015). Кроме того, известно, что мРНК с длинной 3'-UTR представлены в дендритах, где играет важную роль в дендритогенезе и поддержании долговременной потенциации (An et al., 2008). В свою очередь, основываясь на данных литературы, мы предполагаем, что при интоксикации и спонтанной отмене морфина, HuD не участвует в регуляции стабильности мРНК BDNF, а скорее модулирует ее локализацию в отростках нейронов.

### 3.1.5. Сопоставление изменений содержания мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс с уровнем соответствующего белка<sup>5</sup>

На следующем этапе мы исследовали согласованность изменения уровней мРНК и белка BDNF. Согласно проведенным исследованиям, оказалось, что изменения на уровне мРНК не всегда сопровождаются соответствующими изменениями на уровне белка. Данные результатов, полученные с помощью иммуноферментного анализа, не выявили изменений уровня BDNF в отделах головного мозга, в которых повышался уровень их мРНК (Табл. 19).

Таблица 19 – Содержание белка BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина (результаты ИФА)

Отдел мозга	Содержание белка BDNF, пг/мг общего белка	
	Контроль, n=6	Отмена морфина, n=7
Фронтальная кора	497 ± 153	407 ± 171
Гиппокамп	1884 ± 551	1481 ± 571
Средний мозг	1265 ± 173	1286 ± 423

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего.

<sup>5</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Peregud et al., 2016; Peregud et al., 2022 (a)).

Белок BDNF транслируется в виде про-формы, который подвергается ограниченному протеолизу, в результате чего образуется зрелый BDNF (Gray, Ellis, 2008). Учитывая, что использованный набор для иммуноферментного анализа не позволяет дифференцированно детектировать формы BDNF далее был проведен анализ содержания форм BDNF в отделах мозга посредством иммуноблоттинга. Было установлено, что в ФК, но не в СМ повышался уровень как про-формы, так и зрелого BDNF (Рис. 21), что согласуется с соответствующими изменениями на уровне мРНК. Более того повышение уровня BDNF на уровне белка специфично для абстиненции, поскольку при субхронической интоксикации достоверных изменений обнаружено не было (Рис. 21).

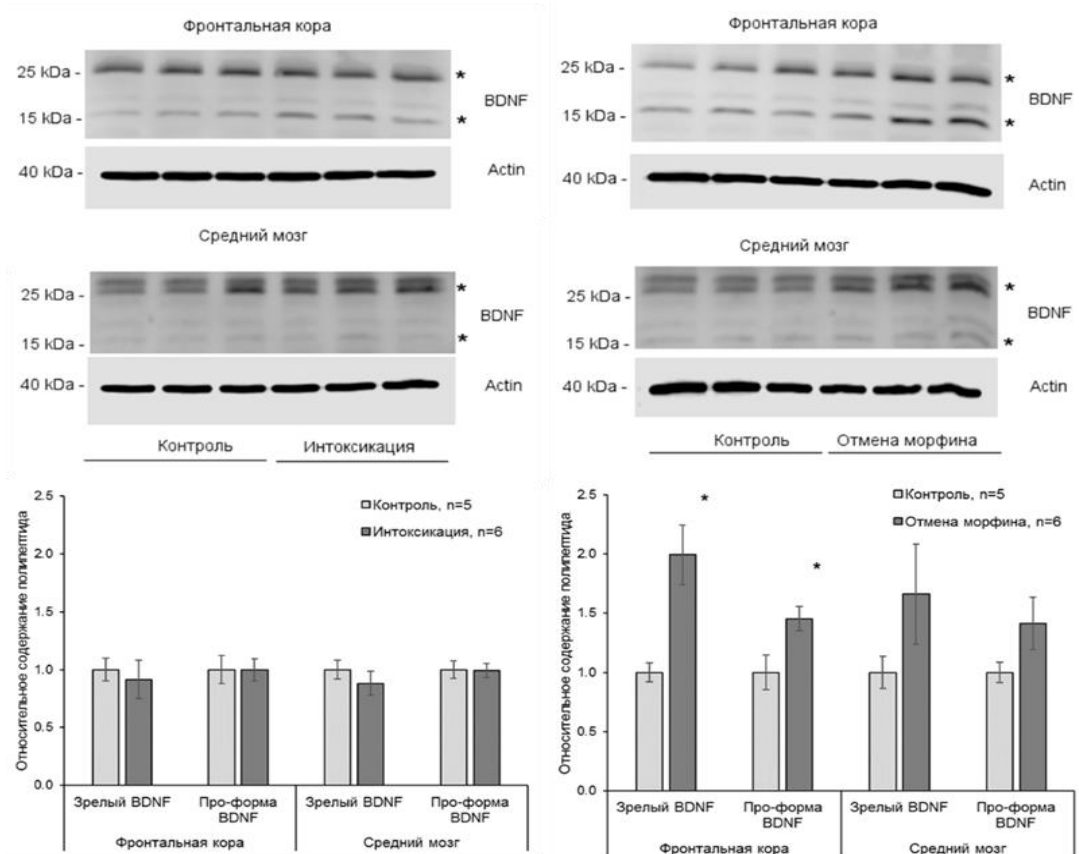


Рисунок 21 – Содержание BDNF на уровне белка во фронтальной коре и среднем мозге крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Верхняя панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. \* - области оптической плотности, соответствующие про-форме BDNF ( $\geq 25$  кДа) и зрелой форме BDNF ( $\geq 15$  кДа), использованные для анализа. Нижняя панель: денситометрический анализ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: \* -  $p < 0,05$ . t-тест Стьюдента.

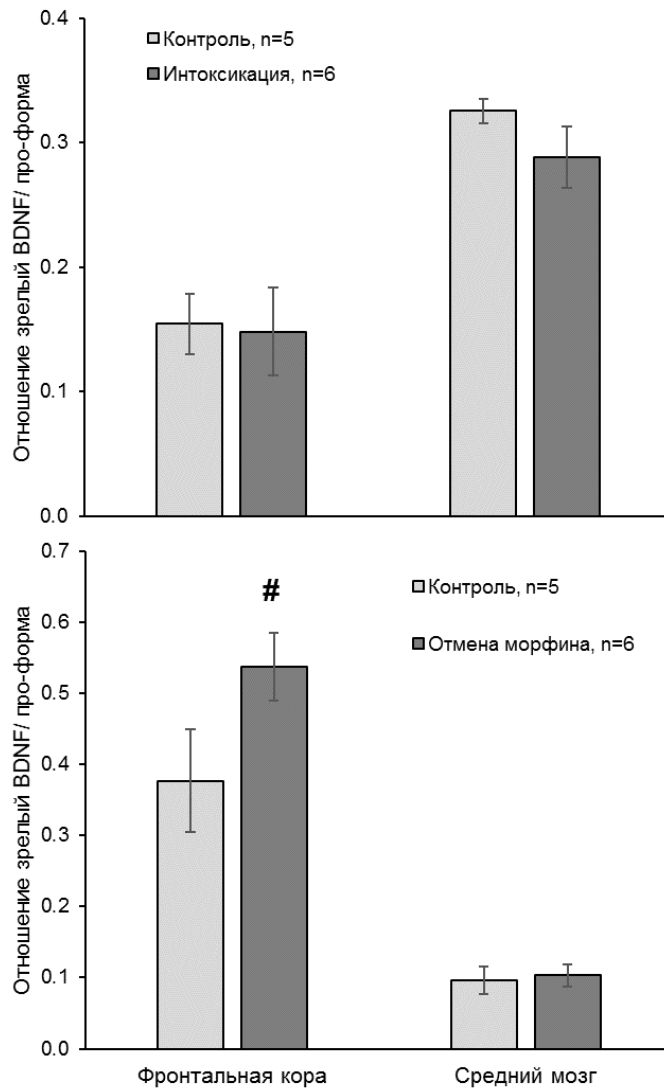


Рисунок 22 – Отношение зрелый белок BDNF/про-форма во фронтальной коре и среднем мозге крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: # -  $p < 0,1$ . t-тест Стьюдента.

Анализ отношения зрелого белка BDNF к про-форме – показатель, который может отражать интенсивность процессинга пептида, не выявил значимых изменений, однако, стоит отметить, во ФК при отмене значения данного показателя повышаются при этом, не достигая статистической значимости (Рис.

22). Полученные результаты отчасти подтверждают данные полученные Vachis и соавторами (2017), которые продемонстрировали увеличение зрелого белка BDNF и про-формы в ФК не только при спонтанной отмене морфина, но и при субхронической интоксикации. Korrel и соавторы (2015) установили, что мРНК BDNF, содержащая экзон I, имеет стартовый кодон AUG, который определяет более эффективную трансляцию белка по сравнению с трансляцией со стартового кодона, расположенного в мРНК BDNF, содержащей экзон IX. Таким образом, по-видимому, повышение мРНК BDNF, содержащей экзон I, предшествует повышению BDNF на уровне белка при отмене морфина специфично в ФК.

Транслированный пептид BDNF подвергается процессингу, что определяет спектр его дальнейшей физиологической активности. Как было указано выше мы установили, что как зрелый белок, так и про-форма увеличиваются при отмене

морфина в ФК, что может, с одной стороны, свидетельствовать об интенсификации трансляции, с другой стороны, указывать на активный процессинг в данных условиях. Одной из протеолитической систем, обеспечивающих внеклеточное созревание BDNF, является активатор (tPA, plasminogen activator, tissue) тканевого плазминогена (PLG, plasminogen), который обеспечивает протеолиз PLG до плазмина (Pang et al., 2004; Gray, Ellis, 2008).

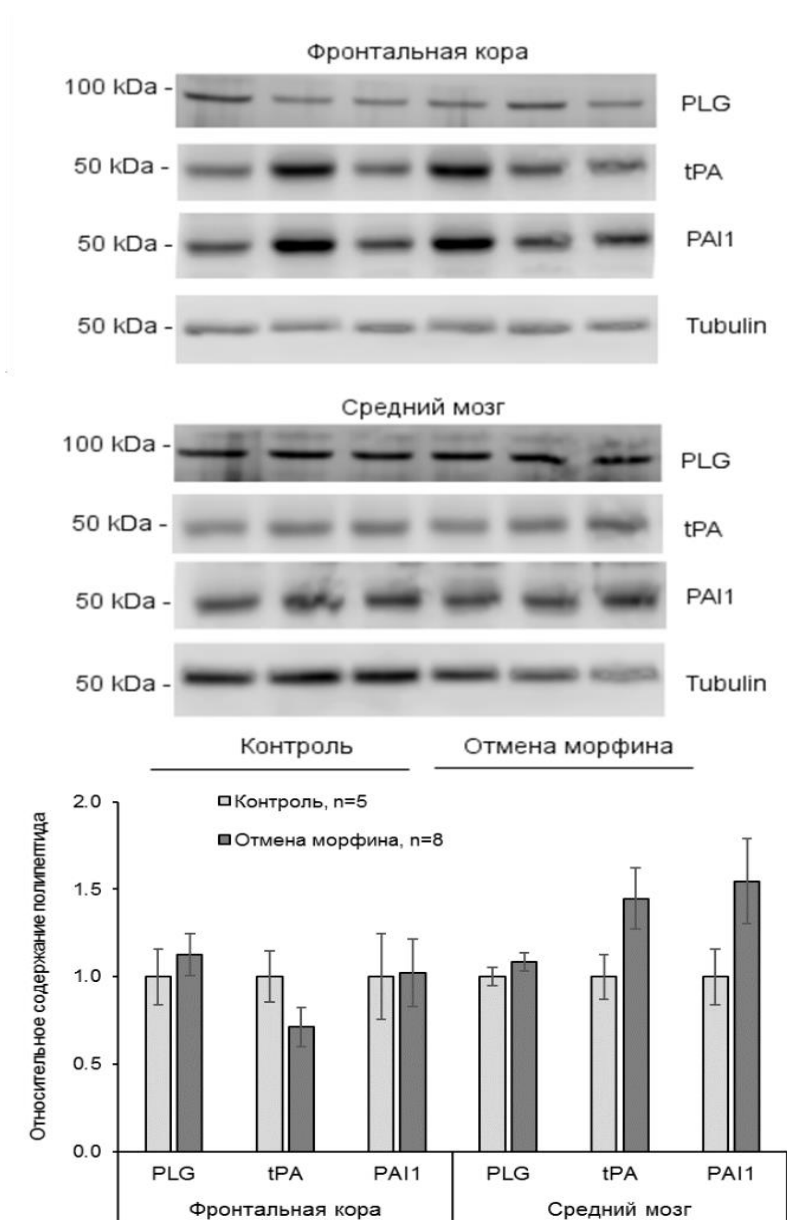


Рисунок 23 – Содержание протеолитического фермента - тканевого плазминогена (PLG), а также его регуляторов активатора тканевого плазминогена (tPA, plasminogen activator, tissue) и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Верхняя панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. Нижняя панель: денситометрический анализ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

В связи с чем была предпринята попытка оценить содержание PLG, а также его регуляторов: активатора tPA, и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) в ФК и СМ крыс при спонтанной отмене морфина. Установить значимых количественных изменений компонентов данной системы при отмене морфина не удалось (Рис. 23). Однако, учитывая ограниченность использованного подхода к оценке протеолитической системе (количественная вместо качественной оценки) не доказывает, что PLG не задействован в изучаемый процесс. Кроме того, нужно учитывать, что другие протеазы, которые обеспечивают созреванию BDNF, например, внеклеточные металлопротеазы (Lee et al., 2001; Mizoguchi et al., 2011) могут опосредовать ограниченный протеолиз BDNF в условиях опиоидной абстиненции. Bachis и соавторы детально исследовали процессинг BDNF при действии морфина (Bachis et al., 2017). В данном исследовании было установлено, что активность tPA контролирует эффективность созревания пептида BDNF при интоксикации и спонтанной отмене морфина (Bachis et al., 2017).

Результаты, представленные в первой части работы свидетельствуют о том, что при опиоидной абстиненции отмечается повышение экспрессии BDNF, в основе чего могут лежать как транскрипционные, так и посттранскрипционные процессы. Поскольку подавляющая часть аналогичных данных не представлены в мировой литературе полученные результаты могут быть расценены как новые и приоритетные. Тем не менее установление того факта что уровень BDNF при отмене морфина изменяется не говорит о его функциональной вовлеченности в абстинентные расстройства. В дальнейшем мы попытались исследовать функциональную роль BDNF и его взаимосвязь с нитрергической системой в условиях отмены морфина.

### **3.2. Взаимосвязь оксида азота и сопряженных нейрохимических систем с абстинентными нарушениями**

Ранее было установлено, что острая и субхроническая интоксикация, а также отмена морфина способны оказывать влияние на параметры, характеризующие состояние нитрергической системы, такие как активность NOC и концентрацию стабильных метаболитов NO – нитратов и нитритов ( $\text{NO}_x^-$ ) в отделах головного мозга (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006). Более того было установлено, что данные показатели регион-специфично коррелируют с тяжестью спонтанного синдрома отмены морфина (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006). Продолжая предыдущие исследования, анализировали взаимосвязь изменений параметров системы NO в отделах головного мозга с нарушениями поведения, характеризующего эмоциональный статус при отмене морфина. Кроме того, исследовали взаимосвязь нейрохимических систем, сопряженных с NO с выраженностью абстиненции.

#### *3.2.1. Активность нитрергической системы в гиппокампе коррелирует с изменениями поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной абстиненции<sup>6</sup>*

Известно, что отмена морфина сопровождается нарушениями эмоционального статуса, в частности, среди прочих отклонений при абстиненции может отмечаться увеличение тревожности (Schultheis et al., 1998). Учитывая, что опиаты вызывают долговременные структурно-функциональные изменения в ЦНС, сохраняющиеся длительное время в случае отмены, можно полагать, что при отсроченной абстиненции нарушения эмоционального статуса также могут сохраняться, однако, подобных исследований ранее проведено не было. В связи с чем далее

---

<sup>6</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2007).



анализировали поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной отмене, а также взаимосвязь показателей данного типа поведения с активностью нитрергической системы. Результаты активности NOC и концентрации  $\text{NO}_x^-$  в отделах головного мозга вошли в диссертационное исследование (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006); в настоящей работе анализировали взаимосвязь данных нейрхимических показателей с поведением в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной отмене, которое было изучено на этих же животных, но указанные результаты не были представлены в диссертационном исследовании (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006). Отмена морфина не сопровождалась изменением двигательной активности в приподнятом крестообразном лабиринте (Рис. 24). Было установлено, что спустя 6 дней, но не 3 дня после отмены морфина крысы чаще посещали открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта (Рис. 25B) и дольше в них находились (Рис. 25A), кроме того, меньше времени проводили в закрытых рукавах по сравнению с соответствующей контрольной группой (Рис. 25B). Ранее было установлено, что активность NOC повышалась к 3-му дню, а концентрация  $\text{NO}_x^-$  к 6-му дню отмены, при этом изменения наблюдались только в гиппокампе (Перегуд Д.И. (дисс. канд. мед. наук), 2006). Проведенный впоследствии корреляционный анализ продемонстрировал наличие взаимосвязи между концентрацией  $\text{NO}_x^-$ , но не активности NOC в определенных отделах мозга и поведением животных в приподнятом крестообразном лабиринте при отсроченной отмене (Табл. 20). В частности, спустя 6 суток после отмены морфина концентрация  $\text{NO}_x^-$  в гиппокампе на уровне тенденции со временем нахождения в открытых рукавах ( $r=0,650$  при  $p=0,058$ ), кроме того, была выявлена обратная корреляция со временем нахождения в закрытых рукавах ( $r=-0,767$  при  $p=0,016$ ).

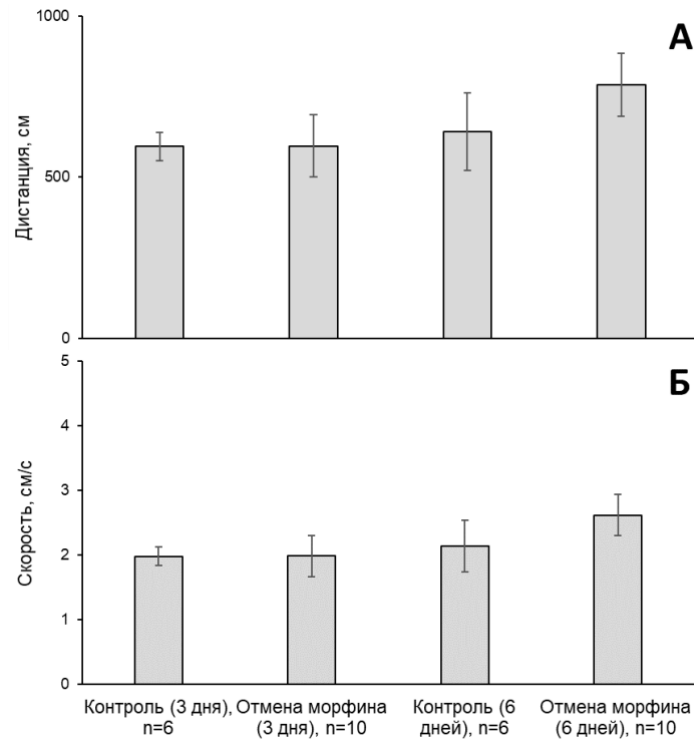


Рисунок 24 – Двигательная активность крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в период отсроченной отмены морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

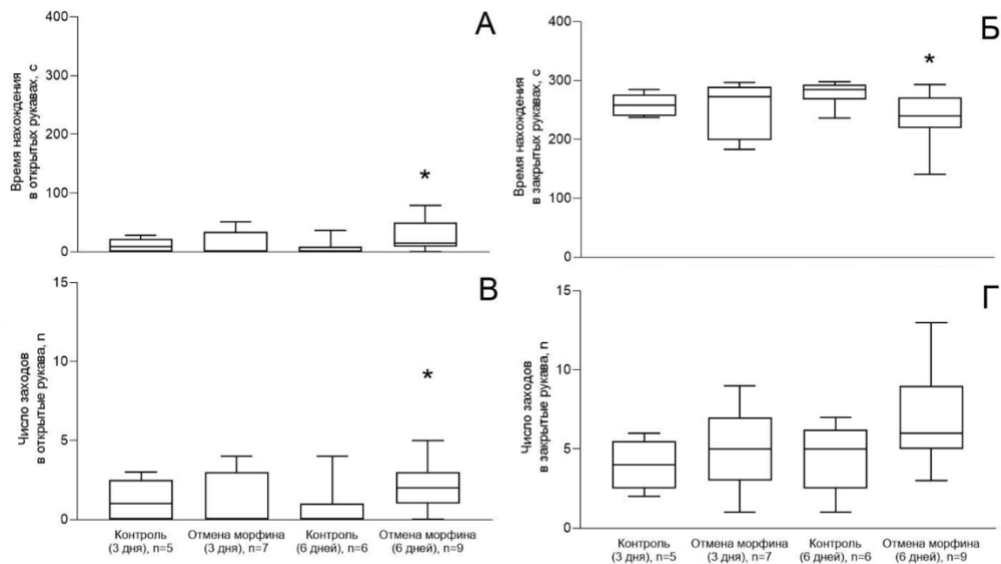


Рисунок 25 – Поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в период отсроченной отмены морфина. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке. \* - достоверность различий от соответствующего контроля  $p < 0,05$ . U-тест Манна-Уитни.

Таблица 20 – Корреляции поведения крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в период отсроченной отмены морфина и показателей активности нитрергической системы в отделах головного мозга

Отдел мозга	Биохимический показатель	Показатель поведения	Значения коэффициента корреляции, $r$ ( $p$ )	
			Отмена морфина (3 дн), $n=10$	Отмена морфина (6 дн), $n=10$
Фронтальная кора	Концентрация $\text{NO}_x^-$ , нмоль/мг	Время нахождения (открытые рукава), с	0,447 (0,314)	0,119 (0,779)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	-0,198 (0,670)	-0,143 (0,736)
		Число заходов (открытые рукава)	0,447 (0,314)	0,158 (0,709)
		Число заходов (закрытые рукава)	0,045 (0,923)	-0,417 (0,304)
	Активность NOC, пмоль/мг × мин	Время нахождения (открытые рукава), с	0,010 (0,983)	0,000 (1,000)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	0,126 (0,788)	0,024 (0,955)
		Число заходов (открытые рукава)	0,010 (0,983)	0,073 (0,864)
		Число заходов (закрытые рукава)	-0,018 (0,969)	-0,246 (0,558)
Гиппокамп	Концентрация $\text{NO}_x^-$ , нмоль/мг	Время нахождения (открытые рукава), с	0,493 (0,261)	0,650 (0,058)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	-0,179 (0,702)	-0,767 (0,016)
		Число заходов (открытые рукава)	0,493 (0,261)	0,564 (0,113)
		Число заходов (закрытые рукава)	0,036 (0,939)	0,187 (0,629)
	Активность NOC, пмоль/мг × мин	Время нахождения (открытые рукава), с	-0,394 (0,382)	-0,100 (0,798)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	0,536 (0,215)	0,033 (0,932)
		Число заходов (открытые рукава)	-0,394 (0,382)	-0,351 (0,355)
		Число заходов (закрытые рукава)	-0,523 (0,229)	-0,119 (0,760)
Средний мозг	Концентрация $\text{NO}_x^-$ , нмоль/мг	Время нахождения (открытые рукава), с	0,020 (0,967)	0,050 (0,898)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	-0,143 (0,760)	0,000 (1,000)
		Число заходов (открытые рукава)	0,020 (0,967)	-0,009 (0,983)
		Число заходов (закрытые рукава)	0,216 (0,641)	-0,587 (0,096)
	Активность NOC, пмоль/мг × мин	Время нахождения (открытые рукава), с	-0,670 (0,100)	0,000 (1,000)
		Время нахождения (закрытые рукава), с	0,464 (0,294)	-0,167 (0,668)
		Число заходов (открытые рукава)	-0,670 (0,100)	-0,068 (0,861)
		Число заходов (закрытые рукава)	-0,432 (0,333)	0,060 (0,879)

Зачастую отмена морфина у грызунов характеризуется усилением тревожно-подобного поведения в приподнятом крестообразном лабиринте (Schulteis et al., 1998). Тем не менее наши данные согласуются с результатами работ, в которых также выявили что мыши как при индуцированном (Hodgson et al., 2008) так и спонтанном синдроме (Buckman et al., 2009) отмены морфина проводят больше времени и чаще посещают открытые рукава лабиринта, что может свидетельствовать об изменении эмоционально-стрессовой реакции в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отмене морфина. Наряду с участием в формировании различных типов поведения, гиппокамп является отделом головного мозга, вовлеченным в развитие тревожного состояния (Bremner, 2004). Кроме того, известно, что NO также участвует в регуляции состояния тревожности у крыс. Так системное введение нитроаргинина (ингибитор NOC) приводит к снижению числа заходов и времени нахождения в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (De Oliveira et al., 1997), что может свидетельствовать об анксиолитических свойствах NO. В работе Monzon и соавторов (2001) указывается на увеличение уровня тревожности в условиях внутригиппокампальной инъекции нитроаргинина. Результаты этих работ могут косвенно свидетельствовать о том, что увеличение содержания NO, возможно, приводит к снижению уровня тревожности у крыс. Таким образом, снижение тревожности при отсроченной абстиненции сопровождается повышенным уровнем  $\text{NO}_x^-$  в гиппокампе, при этом корреляционные отношения с показателями поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» позволяет предположить NO может противодействовать некоторым проявлениям нарушения поведения при абстиненции.

### *3.2.2. Концентрация цГМФ в отделах головного мозга коррелирует с тяжестью спонтанного синдрома отмены морфина<sup>7</sup>*

Являясь вторичным посредником NO, запускает внутриклеточные сигнальные каскады, тем самым инициируя клеточный ответ на определенные стимулы, что в конечном итоге обеспечивает физиологическую реакцию. Растворимая ГЦ является прямой мишенью для NO. NO образует нитрозильные комплексы с гемовым железом, входящим в активный центр данного фермента, что вызывает значительную активацию ГЦ (Garthwaite, Boulton, 1995). ГЦ в свою очередь катализирует образование цГМФ, который является внутриклеточным посредником, регулирующим многочисленные внутриклеточные процессы. Ранее было установлено, что селективный ингибитор ГЦ купирует проявления синдрома отмены морфина у крыс, тем самым данная работа демонстрирует функциональную значимость цГМФ в реализации физической зависимости от опиатов (Sullivan et al., 2000). С другой стороны, ранее не исследовалось насколько концентрация цГМФ в отделах ЦНС может отражать выраженность зависимости от морфина. Далее был проведен эксперимент по оценке концентрации цГМФ в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина в зависимости от тяжести синдрома отмены.

Были выявлены корреляционные отношения между концентрацией цГМФ в отделах головного мозга и выраженностью абстиненции. Значения концентрации цГМФ в ФК образуют достоверную обратную корреляцию с суммарной величиной выраженности синдрома отмены ( $n=24$ ,  $r=-0,477$ ,  $p=0,018$ ). При этом значения концентрации цГМФ в СМ образуют прямые корреляционные отношения с выраженностью синдрома отмены, которые, однако, не достигали статистической значимости ( $n=24$ ,  $r=0,332$ ,  $p=0,113$ ). Концентрация цГМФ в гиппокампе не была связана с выраженностью отмены ( $n=24$ ,  $r=0,037$ ,  $p=0,865$ ). Таким образом, выявленные корреляционные отношения между содержанием цГМФ в отделах головного мозга и выраженностью синдрома отмены морфина, свидетельствуют о

---

<sup>7</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2008).

том, что у животных с разной степенью выраженности абстинентных расстройств, а, следовательно, и опиной зависимости концентрация цГМФ в отделах мозга изменяется по-разному.

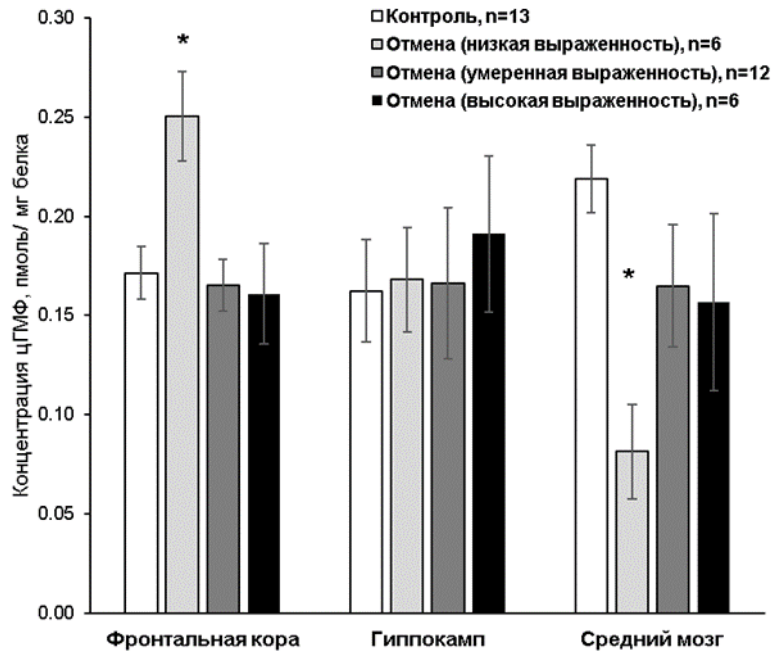


Рисунок 26 – Концентрация цГМФ во фронтальной коре и среднем мозге крыс взаимосвязан с тяжестью абстинентных расстройств. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. \* - достоверность различий от группы контроль при  $p < 0,05$ . Однофакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Учитывая, что в силу индивидуальных особенностей у отдельных животных физическая зависимость от опиатов формируется в неодинаковой степени, животных опытной группы были условно разделены на три подгруппы на основании различной выраженности синдрома отмены. В первую подгруппу вошли шесть животных со слабовыраженным синдромом отмены (тяжесть синдрома отмена в виде суммы баллов, присвоенных двигательным и вегетативным признакам абстиненции, составила  $6,5 \pm 1,2$ ). Во вторую подгруппу вошли двенадцать животных с умеренно-выраженным синдромом отмены морфина (тяжесть синдрома отмена составила  $12,6 \pm 2,5$  баллов), тогда как третью подгруппу составили шесть крыс с сильно-выраженной абстиненцией (тяжесть синдрома отмена составила  $27,7 \pm 7,1$  баллов). Согласно результатам ANOVA и последующего теста Тьюки для множественного сравнения средних оказалось, что в подгруппе

крыс с наименее выраженным синдромом отмены концентрация цГМФ в ФК выше, а в СМ ниже, чем у животных контрольной группы (Рис. 26). Тогда как в гиппокампе данный показатель не различался между группами (Рис. 26).

Ранее исследования взаимосвязи между концентрацией цГМФ в отделах головного мозга и выраженностью опиной абстиненции не проводилось. Более того уровень цГМФ при отмене опиатов и опиоидов оценивался в единичных работах, в которых продемонстрировано повышение цГМФ в отделах ЦНС при абстиненции (Volicer et al., 1977; Bhargava, Cao, 1997). Посредством фармакологических агентов, способных модулировать уровень цГМФ, была продемонстрирована его потенциальная роль. Так Sullivan и соавторы (2000) установили, что селективный ингибитор ГЦ ODQ купирует проявления синдрома отмены морфина у крыс. С другой стороны, введение силденафила, ингибитор фосфодиэстеразы 5 типа, которое должно сопровождаться увеличением уровня цГМФ также снижает выраженность отмены морфина у мышей (Mahmoodi et al., 2014). Учитывая противоречивость функциональных исследований, а также вовлеченность каскада NO/цГМФ в фундаментальные физиологические процессы, сложно однозначно оценить вклад данного каскада в реализацию отмены морфина. Согласно настоящему исследованию при спонтанном синдроме отмены изменения уровня цГМФ происходили регион-специфично и отмечались только у животных с низкой выраженностью абстиненции. Возможно, установленные изменения связаны с компенсаторными механизмами устойчивости животных к действию опиатов и манифестации синдрома отмены. Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, позволяют полагать что регион-специфические изменения уровня цГМФ могут составлять часть механизма, направленного на ослабление абстинентных расстройств поведения.

### 3.3. Взаимодействие NO и BDNF в отделах головного мозга крыс в условиях спонтанной отмены морфина

#### 3.3.1. Функциональная роль NO в манифестации спонтанного синдрома отмены морфина у крыс<sup>8</sup>

Согласно результатам, которые описаны выше, отдельные компоненты сигнального каскада, сопряженного с NO, могут быть взаимосвязаны с тяжестью абстинентных нарушений у крыс. Тем не менее описанные закономерности являются лишь косвенным указанием того, что NO может быть регулятором опиоидной абстиненции. На следующем этапе, посредством фармакологического воздействия мы предприняли попытку оценить прямую роль NO в данном процессе. Согласно ранговому критерию Краскела-Уоллиса ( $H_{(3,36)}=26,81$ ;  $p<0,0001$ ) введение L-NAME в период морфинизации оказывает достоверное влияние на суммарную выраженность абстиненции (Рис. 27).

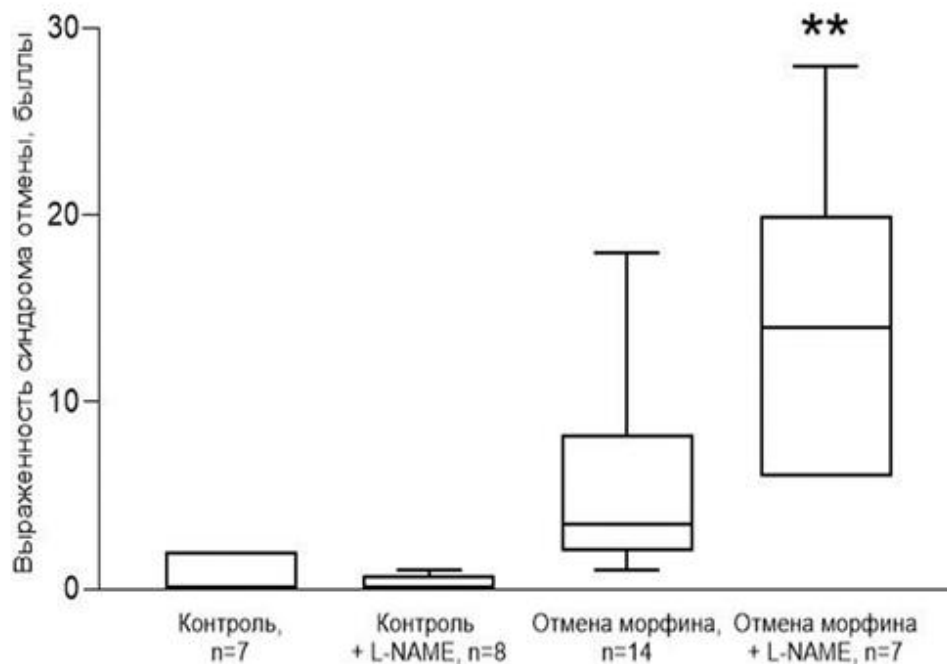


Рисунок 27 – Влияние системного введения ингибитора NO-синтазы L-NAME в период морфинизации на выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке. \*\* - достоверность различий от группы Отмена морфина при  $p=0,005$ . Ранговый ANOVA Краскела-Уоллиса и тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

<sup>8</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2013 (a); Peregud et al., 2016).



Последующее проведение теста Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони показало, что при введении L-NAME выраженность спонтанного синдрома отмены значительно увеличивается (Рис. 27). Структура спонтанного синдрома отмены морфина после системного введения ингибитора NO-синтазы L-NAME в период морфинизации представлена на Табл. 21. После 36 ч спонтанной отмены морфина отмечалось падение массы тела, что является типичным признаком абстиненции, однако системное введение L-NAME не оказывало влияния на динамику массы тела при отмене морфина (Табл. 22).

Таблица 21 – Структура спонтанного синдрома отмены морфина после системного введения ингибитора NO-синтазы L-NAME в период морфинизации

Признак абстиненции	Частота встречаемости признака (число животных, продемонстрировавших признак)			
	Контроль (n=7)	Контроль + L-NAME (n=8)	Отмена морфина (n=14)	Отмена морфина + L-NAME (n=7)
Отряхивания по типу “мокрой собаки”	1	0	1	3
Корчи	1	0	8	6
Жевание	0	0	2	1
Скрип зубами	0	0	1	2
Встряхивание передними лапами	0	0	4	3
Писк при дотрагивании	0	0	9 *	1
Диарея	0	2	1	1
Птоз	0	0	3	4
Диспноэ	0	0	6	5

Примечание. Достоверность различий от группы Контроль: \* - $p < 0,01$ . Точный критерий Фишера.

Таблица 22 – Влияние системного введения ингибитора NO-синтазы L-NAME в период морфинизации на динамику массы тела в период отмены морфина

Группа	Масса тела, г		
	Перед морфинизацией	12 ч отмены	36 ч отмены
Контроль, n=7	233 ± 5	257 ± 8	258 ± 8
Контроль + L-NAME, n=8	238 ± 4	257 ± 4	256 ± 4
Отмена морфина, n=14	229 ± 4	242 ± 5	216 ± 4 <sup>**</sup> , <sup>xxxx</sup>
Отмена морфина + L-NAME, n=7	233 ± 5	244 ± 10	217 ± 9 <sup>*</sup> , <sup>xxxx</sup>

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,005$ - достоверность различий от измерений перед морфинизацией. <sup>xxxx</sup> -  $p < 0,0005$  достоверность различий от измерений после 12 ч отмены. Факторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Данные литературы относительно роли NO в формировании зависимости и манифестации опиоидной абстиненции опиатов неоднозначны. С одной стороны, указывается на то, что повышенная активность сигнального каскада NO является причиной формирования зависимости (Dehpour et al., 2000; Aricioglu et al., 2004; Abdel-Zaher et al., 2006) или, напротив, предотвращать развитие зависимости (Dambisya, Lee, 1996). С другой стороны, сигнальный каскад NO может и не играть никакой роли в формировании зависимости от опиатов (Ozek et al., 2003) или ослаблять лишь некоторые признаки зависимости (Majeed et al., 1994; Bhargava, 1995). В экспериментах на мышах Dambisya и Lee, посредством активации или ингибирования синтеза NO введением L-аргинина или L-NAME и L-NMMA в период формирования зависимости или перед провокацией отмены показали, что NO может играть роль как в формировании толерантности и зависимости, так и манифестации абстинентных расстройств (Dambisya, Lee, 1996). В частности, повышение уровня NO во время интоксикации морфином ослабляет зависимость, что совпадает с результатами нашей работы (Dambisya, Lee, 1996).

Таким образом, результаты прямого исследования роли NO в манифестации синдрома отмены морфина подтверждают предположение о способности данного

каскада ослаблять выраженность абстиненции, основанное на обратной корреляции содержания компонентов каскада и проявлений отмены.

### *3.3.2. NO регулирует содержание и активность BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина<sup>9</sup>*

Учитывая, что согласно полученным результатам, компоненты сигнальных каскадов, опосредуемых как NO, так и BDNF взаимосвязаны с абстинентными расстройствами при спонтанной отмене морфина, мы предположили, что эти системы могут сопряженно функционировать при абстиненции. Данное предположение тем более вероятно, что о взаимодействии NO и BDNF в нейропластических известно из литературы (Biojone et al., 2015). Установив, что ингибирование синтеза NO на протяжении субхронической интоксикации морфином, сопровождается усилением абстинентных расстройств, мы предположили, что данный эффект может быть связан с его способностью модулировать уровень BDNF и/или его рецептора в ЦНС. Действительно, было установлено, что повышение уровня мРНК BDNF (Экзон I) и соответствующего рецептора TrkB в ФК (Рис. 28А), а также мРНК BDNF гиппокампе (Рис. 28Б) и СМ (Рис. 28В) зарегистрированное при спонтанной отмене снижалось в условиях ингибирования NOS.

Полагая, что в данном случае, биологическую функцию выполняет белок, а не мРНК нейротрофинов, важно понять, насколько выявленные изменения содержания транскриптов согласуются с соответствующими изменениями на уровне белков. Было установлено, что NO способен регулировать содержание белка BDNF и активность его рецептора TrkB в ФК при спонтанной отмене морфина.

---

<sup>9</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Peregud et al., 2016).

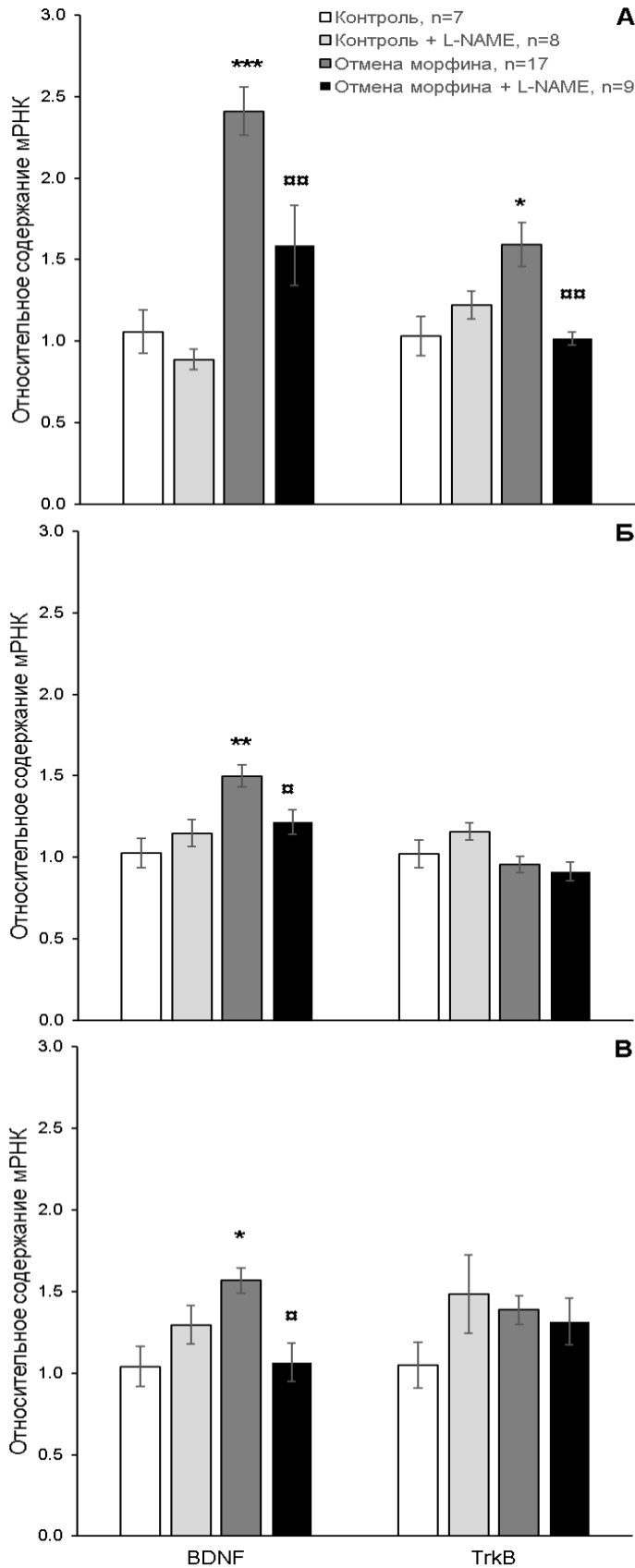


Рисунок 28 – Влияние введения ингибитора NO-синтазы – L-NAME при формировании зависимости от морфина на содержание мРНК BDNF, а также рецептора TrkB во фронтальной коре (А), гиппокампе (Б) и среднем мозге (В) при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0,0005$  - достоверность различий от контрольной группы; □ -  $p < 0,05$ , □□ -  $p < 0,005$  - достоверность различий от группы отмена морфина. Двухфакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

В частности, ингибирование NOC предотвращает повышение уровня зрелого, но не про-формы BDNF в ФК (Рис. 29А), что может свидетельствовать о вовлеченности NO в процессы протеолитического созревания BDNF, но не трансляции или стабильности. Об активности протеолиза BDNF позволяет судить такой показатель как отношение содержания зрелого пептида к про-форме. С

определенной степенью допущения наше предположение, может соответствовать действительности: при том, что отмена морфина не оказывала влияния на данный показатель ингибирование NOC сопровождалось снижением отношения

содержания зрелого пептида к про-форме, однако изменения не достигали статистической значимости (Рис. 29Б). Представляется необходимым отметить, что по результатам данной серии экспериментов (Рис. 29А), нам удалось верифицировать результаты независимого эксперимента, согласно которым мы также установили, что при спонтанной отмене морфина содержание зрелого пептида и про-формы BDNF в ФК повышается при спонтанной отмене морфина (Рис. 21).

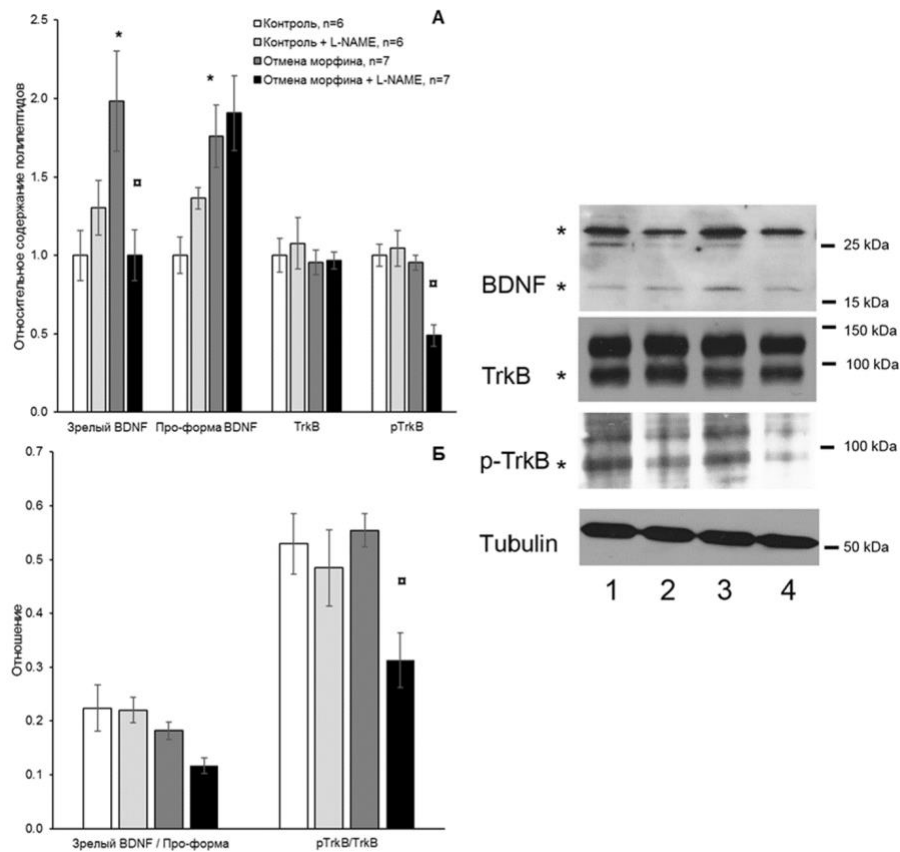


Рисунок 29 – Влияние введения ингибитора NO-синтазы – L-NAME при формировании зависимости от морфина на содержание BDNF, а также рецептора TrkB на уровне белков во фронтальной коре при спонтанной отмене морфина. Левая панель: денситометрический анализ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$  - достоверность различий от контрольной группы;  $\square$  -  $p < 0,05$  - достоверность различий от группы отмена морфина. Двухфакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних. Правая панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. \* - области оптической плотности, использованные для анализа.

Активность зрелого пептида BDNF определяется его способностью связываться с рецептором TrkB, что запускает ряд внутриклеточных сигнальных каскадов (Kowiański et al., 2018). TrkB принадлежит к классу рецепторов обладающих тирозин-киназной активностью, который в ответ на связывание лиганда активируется в процессе аутофосфорилирования остатков тирозина, расположенных в каталитическом домене (Kowiański et al., 2018). Таким образом, мы исследовали влияние NO на содержание как общего TrkB, так и активной фосфорилированной формы pTrkB в ФК при спонтанной отмене морфина. При том что ни отмена морфина, ни L-NAME не оказывали влияние на содержание обеих форм TrkB (Рис. 29А), ингибирование NOS при формировании зависимости сопровождалось снижением активной формы TrkB при отмене морфина (Рис. 29Б). Также было установлено, что ни отмена морфина, ни NO не оказывают влияние на уровень белка BDNF в гиппокампе и СМ (Рис. 30).

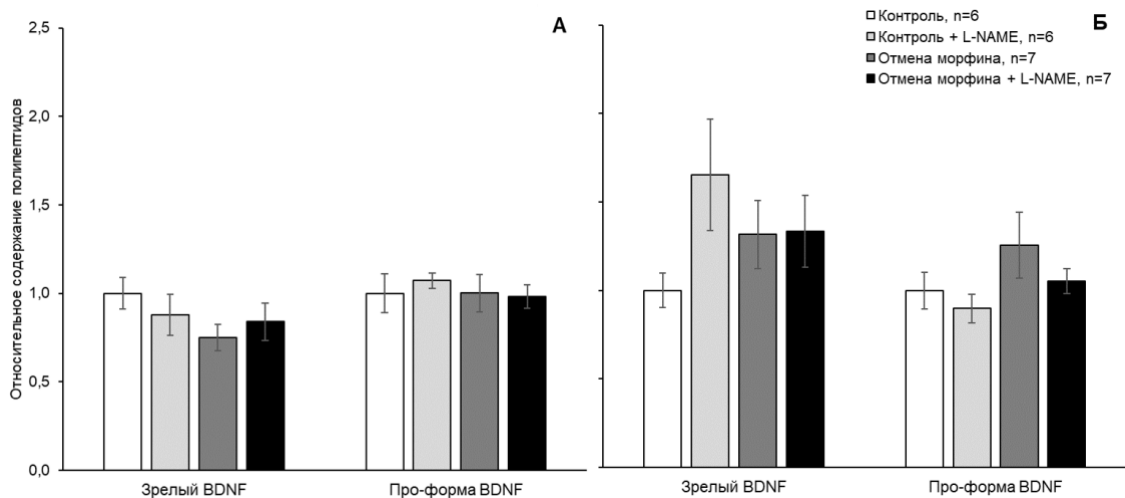


Рисунок 30 – Влияние введения ингибитора NO-синтазы – L-NAME при формировании зависимости от морфина на содержание BDNF в гиппокампе (А) и среднем мозге (Б) при спонтанной отмене морфина. Денситометрический анализ данных иммуноблоттинга. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

Введение L-NAME в процессе формирования зависимости способно модулировать содержание мРНК BDNF и его рецептора, а также процессинг BDNF на уровне пептида и активность рецептора TrkB в отделах головного мозга крыс. NO известен своей способностью регулировать экспрессию генов как напрямую (Dhakshinamoorthy et al., 2007) так и опосредованно (Gallo, Iadecola 2011). В основе

способности NO регулировать интенсивность транскрипции лежит активация сигнального каскада ГЦ/цГМФ/протеинкиназа G и посттрансляционная модификация белков посредством S-нитрозилирования (Contestabile 2008). NO может активировать протеазы участвующие в процессинге BDNF - плазмин (Karmohapatra et al., 2007) и матриксную металлопротеиназу 9 (Gu et al., 2002), что может предшествовать созреванию белка при отмене морфина, тогда как L-NAME предотвращает увеличение зрелого BDNF и снижает активность нижележащего рецептора. Примечательно, что как плазмин (Nemoto et al. 2013), так и металлопротеиназа 9 (Liu et al. 2010) вовлечены в развитие зависимости от морфина. Кроме того, описана возможность посттрансляционной модификации BDNF посредством нитрования и S-нитрозилирования, которая может изменять его аффинность к TrkB и как следствие снижать влияние BDNF на развитие нейронных связей и эффективность синаптической передачи сигнала (Biojone et al. 2015). Таким образом, влияние на продукцию NO может позволить контролировать опосредованную BDNF регуляцию синаптической пластичности.

Таким образом, мы установили, что сигнальные каскады, опосредованные NO, могут запускать молекулярные процессы, которые способны в некоторой степени нивелировать абстинентные нарушения при спонтанной отмене морфина. При этом BDNF, может быть, одним из субстратов в данных условиях. Можно заключить, что способность NO ослаблять абстиненцию проявляется за счет его влияния на экспрессию BDNF на уровне мРНК, а также на созревание белка BDNF и последующей активации TrkB.

### 3.3.3. Влияние инъекции BDNF в ВОП на проявления спонтанной отмены морфина<sup>10</sup>

Мы получили данные, согласно которым ингибирование синтеза NO на протяжении морфинизации приводит к снижению уровня BDNF, повышенного в ФК, гиппокампе и СМ крыс при абстиненции, что сопровождается усилением проявлений абстиненции. Напротив, можно предположить, что локальное повышение уровня BDNF может противодействовать механизмам, лежащим в основе экспрессии опиной абстиненции. В основе реализации синдрома отмены морфина лежат нейрохимические и структурно-функциональные сдвиги, наблюдаемые во многих областях головного мозга, включающие как мезокортиколимбические, так и стволовые структуры (Koob et al., 1992; Christie et al., 1997). Среди прочих структур, являющихся анатомическим субстратом опиной абстиненции, особо выделяют локус СМ – ВОП, в которой отмечаются выраженные нейроадаптивные изменения в условиях субхронической интоксикации опиатами, что может лежать в основе абстинентных расстройств при отмене (Berhow et al., 1995; 1996; Sklair-Tavron et al., 1996; Radke et al., 2011; Mazei-Robison, Nestler, 2012; Doyle, Mazei-Robison, 2021). В связи с чем, для проверки гипотезы мы оценивали влияние введения рекомбинантного BDNF в срединную ВОП в период отмены морфина на поведенческие проявления абстиненции. Результаты проведения факторного анализа ANOVA выявили достоверный эффект введения морфина ( $F_{1, 10}=18,5$ ;  $p=0,002$ ) и BDNF ( $F_{1, 10}=6,1$ ;  $p=0,033$ ), но не взаимодействия данных факторов ( $F_{1, 10}=3,6$ ;  $p=0,088$ ) в отношении суммарной выраженности проявлений абстиненции, которая снижалась под действием BDNF (Рис. 31). Структура спонтанного синдрома отмены морфина после введения BDNF представлена на Табл. 23. На характерный признак опиной абстиненции у грызунов - снижение массы тела, введение BDNF влияние не оказывало (Табл. 24).

---

<sup>10</sup> - результаты опубликованны в соавторстве (Перегуд и соавт., 2013 (6)).



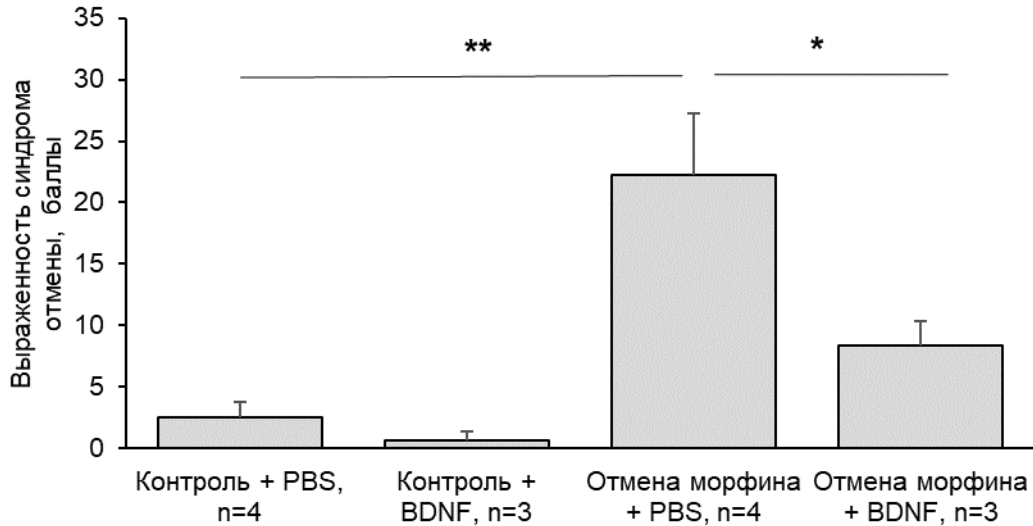


Рисунок 31 – Влияние однократной инъекции BDNF в срединную ВОП на выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий между указанными группами: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ . Двухфакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Результаты подтверждают выдвинутое предположение о способности BDNF ослаблять выраженность синдрома отмены. В доступной литературе нет описания роли BDNF в манифестации отмены морфина полученных при центральном введении модуляторов сигналинга BDNF. Тем не менее результаты настоящей работы согласуются с данными литературы, полученными при системном введении веществ, способных модулировать данный каскад (Khalil-Khalili et al., 2018; Колик и соавт. 2020). Так однократное системное введение антагониста рецептора TrkB – ANA-12 перед индукцией абстиненции налоксоном усиливает общую выраженность синдрома отмены морфина у крыс, но не выраженность отдельных признаков абстиненции (Khalil-Khalili et al., 2018). В свою очередь, однократное введение низкомолекулярного миметика 4-й петли BDNF - соединения ГСБ-106 снижало суммарный индекс индуцированного синдрома отмены морфина у крыс, а также выраженность таких признаков абстиненции как диарея, скрип зубами, отряхивания по типу мокрой собаки, птоз, пилоэрекция и ринорея (Колик и соавт. 2020).

Таблица 23 – Структура спонтанного синдрома отмены морфина после инъекции BDNF в ВОП

Признак абстиненции	Частота встречаемости признака (число животных продемонстрировавших признак)			
	Контроль + PBS, n=4	Контроль + BDNF, n=3	Отмена морфина + PBS, n=4	Отмена морфина + BDNF, n=3
Отряхивания по типу “мокрой собаки”	0	0	3	2
Корчи	0	0	4*	1
Жевание	0	1	3	1
Скрежет зубами	0	0	4*	0 ×
Встряхивание передними лапами	3	0	3	1
Писк при дотрагивании	0	0	2	2
Диарея	0	0	1	0
Птоз	0	0	3	1
Диспноэ	0	0	3	2

Примечание. \* достоверность различий от группы Контроль + PBS × - достоверность различий от группы Отмена морфина + PBS,  $p < 0,05$ . Точный критерий Фишера.

Экспериментальные данные свидетельствуют, что ВОП опосредует некоторые негативные аспекты отмены опиатов, в частности тревожность (Radke et al., 2011). В то же время соматические нарушения при абстиненции связывают преимущественно с такими областями, как околотоводопроводное серое вещество и ГП (Williams et al., 2001). Считается, что ГП является одним из отделов ЦНС, ответственных за манифестацию соматических признаков абстиненции (Maldonado et al., 1992), в том числе и скрежета зубами, снижение интенсивности которого мы зарегистрировали при введении BDNF. По меньшей мере, половина популяции нейронов ВОП являются дофаминергическими (Margolis et al., 2006). В связи с чем можно предположить, что способность BDNF купировать синдром отмены, зарегистрированная в настоящей работе, опосредована изменением активности

дофаминергических нейронов ВОП, которые в свою очередь оказывают влияние на другие области, ответственные за манифестацию соматических признаков синдрома отмены, в первую очередь – ГП. Ранее было продемонстрировано, что неселективный агонист дофаминергических рецепторов апоморфин значительно снижает такие соматические проявления синдрома отмены опиатов, как скрежет зубами, корчи и отряхивания по типу мокрой собаки (Argy et al., 1977). В свою очередь BDNF способен повышать активность дофаминергических нейронов СМ (Shen et al., 1994). Действительно, известно о наличии афферентных влияний дофаминергических нейронов ВОП на ГП (Ornstein et al., 1987), а также о способности дофамина снижать активность норадренергических нейронов ГП (Guiard et al., 2008). Таким образом, мы предполагаем, что введение BDNF в ВОП при отмене морфина активирует дофаминергические нейроны этой области мозга, которые, в свою очередь, оказывают тормозное влияние на нейроны ГП, высокая активность которых характерна для синдрома отмены морфина (Rasmussen et al., 1990). Предполагается, этим, по крайней мере, отчасти, можно объяснить способность BDNF ослаблять абстиненцию, продемонстрированную в настоящей работе.

Таблица 24 – Динамика массы тела в период отмены морфина

Группа	Масса тела, г		
	Перед морфинизацией	12 ч отмены	36 ч отмены
Контроль + PBS, n=4	299 ± 3	311 ± 6	309 ± 6
Контроль + BDNF, n=3	310 ± 5	309 ± 5	307 ± 12
Отмена морфина + PBS, n=4	315 ± 13	300 ± 15	267 ± 14 ***
Отмена морфина + BDNF, n=3	304 ± 10	281 ± 12	246 ± 11 ***

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего. \*\*\* - достоверность различий от измерений перед морфинизацией и после 12 ч отмены при  $p < 0,0005$ . Факторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

### 3.3.4. Влияние инъекции BDNF в ВОП на выработку и воспроизведение условной реакции предпочтения места, ассоциированной с введением морфина<sup>11</sup>

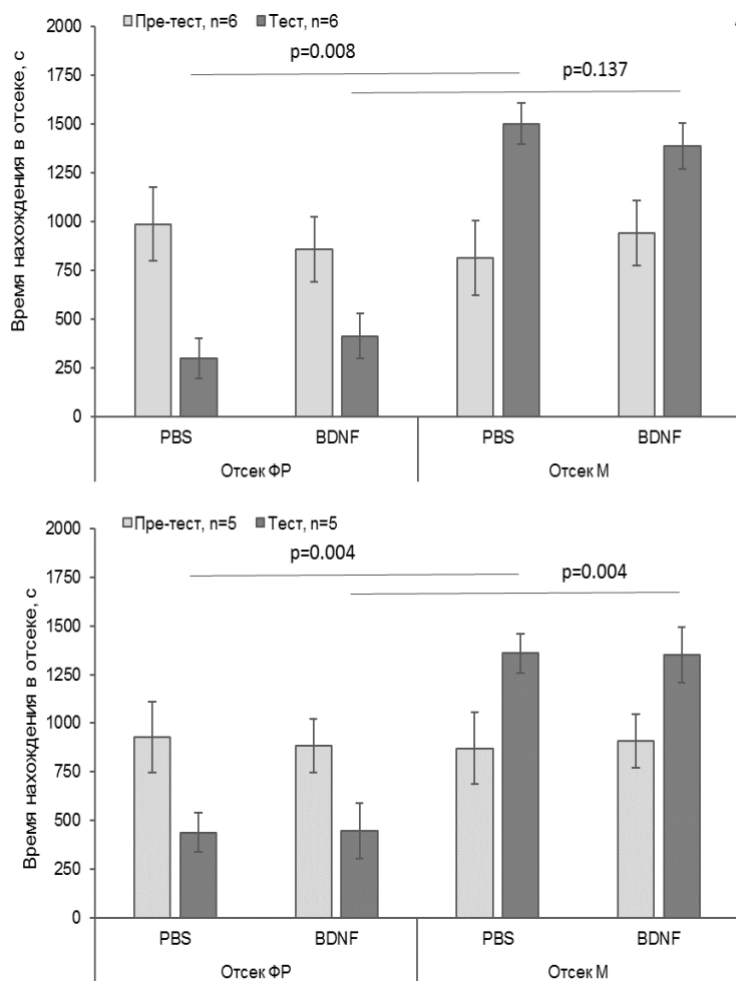


Рисунок 32 – Влияние однократной инъекции BDNF в срединную ВОП на поведение крыс в тесте УРПМ, индуцированной введением морфина. Представлено время нахождения в отсеке, ассоциированном с введением морфина (Отсек М) и отсеке, ассоциированном с введением физиологического раствора (Отсек ФР). Проводили регистрацию базального уровня предпочтения места (перед обусловливанием, пре-тест – светлые столбцы) и предпочтение места после обусловливания морфином (тест – темные столбцы). BDNF (0,75 мкг) или PBS вводили однократно в ВОП перед обусловливанием (А) или после обусловливания (Б). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Факторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Помимо способности вызывать зависимость, которая выражается абстинентными расстройствами после отмены, опиаты оказывают выраженное положительное подкрепление, что имеет критическое значение в клинике зависимости. На заключительном этапе исследования мы предприняли попытку выяснить ограничивается ли функциональная роль BDNF в реализации фармакологических эффектов опиатов влиянием на абстиненцию. Для этого исследовали роль BDNF в выработке и воспроизведении УРПМ, индуцированной морфином. Данная модель широко используется в оценке способности препаратов

<sup>11</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Перегуд и соавт., 2016(б)).

оказывать положительное подкрепление. УРПМ, наряду с моделью самовведения, является основным методическим подходом в исследовании аддиктивных свойств психоактивных веществ. УРПМ может рассматриваться в контексте классического условно-рефлекторного обучения по И.П. Павлову, в котором безусловный стимул (психоактивное вещество) сочетается с условным обстановочным стимулом (Bardo, Bevins, 2000). Во время теста УРПМ животные проводили статистически достоверно больше времени в отсеке, ассоциированном с введением морфина, по сравнению с отсеком, ассоциированным с введением физиологического раствора, что свидетельствует о подкрепляющем действии морфина (Рис. 32). Однократная инъекция BDNF в ВОП перед, но не после обусловливания, частично снижает время пребывания в отсеке, ассоциированном с введением морфина, и повышает время нахождения в отсеке, ассоциированном с введением физиологического раствора, но при этом разница времени пребывания в разных отсеках не достигает статистической значимости (Рис. 32А). Несмотря на то, что выявленный эффект BDNF не был выраженным можно утверждать, что введение BDNF в ВОП ослабляет подкрепляющие свойства морфина. Наши результаты отчасти согласуются с данными, полученными Коо и соавторами (Коо et al., 2012) а также Deng и соавторами (Deng et al., 2022), согласно которым BDNF в латеральной части ВОП подавляет положительный подкрепляющий эффект морфина у мышей. Так, ингибирование активности BDNF, опосредованной рецептором TrkB в латеральной ВОП мышей, увеличивает способность морфина стимулировать активность дофаминергических нейронов в этой области и положительный подкрепляющий эффект морфина, связанный с наличием проекций нейронов ВОП в прилежащее ядро (Коо et al., 2012). Тогда как однократная билатеральная инъекция BDNF в ВОП мышам перед фазой обучения УРПМ, индуцированной введением морфина, предотвращало положительный подкрепляющий эффект морфина (Коо et al., 2012). Увеличение экспрессии BDNF в ВОП посредством аденоассоциированного вируса у мышей также подавляет положительный подкрепляющий эффект морфина (Deng et al., 2022). С другой стороны, Vargas-Perez и соавторы (2009) продемонстрировали, что введение BDNF в ВОП крысам стимулирует

положительное подкрепление в основе чего лежит опосредованная дофамином передача нервного импульса. Основным анатомическим субстратом подкрепления, оказываемого опиатами, и мотивации употребления опиатов, является ВОП (Wise, 1989; Ting-A-Kee, van der Kooy, 2012; Fields, Margolis, 2015). Тем не менее мы не можем исключать того, что BDNF в других отделах ЦНС также может быть вовлечен в механизмы положительного подкрепления, оказываемого опиатами. В доказательство этого есть работы, в которых установлено, что BDNF в таких структурах как амигдаллярный комплекс (Zhang et al., 2014), прилежащее ядро (Koo et al., 2014; Jorjani et al., 2021) и ПФК (Jorjani et al., 2021) также определяет подкрепляющие свойства опиатов.

Таким образом, учитывая ограничения полученных результатов, с определенной степенью допущения можно полагать, что BDNF в ВОП может предотвращать выработку УРПМ, индуцированной морфином.

### **3.4. Функциональная роль BDNF в регуляции потребления алкоголя и алкогольной абстиненции**

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, свидетельствуют, что при отмене морфина отмечается повышение экспрессии BDNF в отделах мозга, что может лежать в основе ослабления абстиненции. Возникает вопрос – насколько выявленные закономерности могут быть специфичны для манифестации именно опиной абстиненции? Ответ может дать исследование аналогичных параметров при абстиненции психоактивного вещества с отличной от опиатов фармакологической природой. На заключительном этапе исследования мы оценивали особенности экспрессии BDNF в отделах ЦНС крыс при отмене алкоголя, а также изучали возможный вклад данного каскада в некоторые аспекты действия алкоголя: мотивации к потреблению и проявления отмены.

### 3.4.1. Взаимосвязь экспрессии BDNF с паттерном потребления этанола<sup>12</sup>

Посредством предоставления прерывистого доступа в условиях свободного выбора к 20% раствору этилового спирта совместно с водой (выбор между двумя емкостями) на 24 ч в течение 20 сеансов (на каждый следующий день спирт заменялся водой) (ПД20%СВ) была реализована модель чрезмерного потребления алкоголя (Carnicella, Ron, Barak; 2014). В ходе реализации данной модели грызуны демонстрируют способность постепенно повышать уровень потребляемого этанола, достигая относительно высокого уровня потребления (до 10 г/кг в сутки). Согласно расчету корреляционных отношений между порядковым номером сеанса предъявления этанола и уровнем потребляемого этанола для каждого животного нами было установлено, что часть исследованной популяции демонстрирует положительную корреляцию между показателями, что соответствует постепенному повышению потребления этанола характерного для данной модели. При этом вторая часть животных не соответствовала данному критерию. Учитывая гетерогенность уровня потребляемого этанола в исследованной выборке были выделены 2 группы: 1) крысы, которые демонстрируют стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП, n=11) и 2) крысы, которые потребляют постоянно высокий уровень спирта (постоянно высокое потребление - ПВП, n=13) (Рис. 33А). Так, согласно ANOVA с повторными измерениями был выявлен эффект сеанса потребления  $F_{(19,380)}=5,737$ ,  $p=1,2 \times 10^{-12}$ , но не эффект паттерна потребления  $F_{(1,20)}=0,117$ ,  $p=0,736$  на уровень потребляемого этанола. Однако было выявлено взаимодействие сеанса потребления и паттерна потребления этанола  $F_{(19,380)}=3,906$ ,  $p=1,2 \times 10^{-7}$  на уровень потребляемого спирта. Последующий *post hoc* анализ показал, что в группе ПП, но не ПВП, уровень потребления спирта после первых 4-х сеансов значительно ниже уровня потребления после сеансов 10-20 (Рис. 33А). В частности, потребление этанола после сеансов предъявления 1 и 2 был ниже по сравнению с сеансами 10-20 ( $p < 0,0005$ ), тогда как после сеансов 3 и 4 крысы потребляли меньше этанола по

<sup>12</sup> - результаты опубликованны в соавторстве (Перегуд и соавт., 2019; Peregud et al., 2021).

сравнению с сеансами 10-16 ( $p < 0,05$ ) и 17-20 ( $p < 0,005$ ) (Рис. 33А). Как и ожидалось при анализе данных относительно предпочтения спирта воде в группах ПП и ПВП, ANOVA с повторными измерениями выявил подобные эффекты: эффект сеанса потребления  $F_{(19,380)}=9,315$ ,  $p < 1 \times 10^{-9}$  и отсутствие эффекта паттерна потребления  $F_{(1,20)}=0,001$ ,  $p=0,971$ . Также было выявлено взаимодействие факторов сеанса потребления и паттерна потребления этанола  $F_{(19,380)}=4,901$ ,  $p=2,4 \times 10^{-10}$  на уровень предпочтения спирта воде (Рис. 33Б). Подобно потреблению этанола, post hoc анализ различий уровня предпочтения этанола показал, что в группе ПП, но не ПВП, предпочтение после первых пяти сеансов ниже уровня предпочтения последующих сеансов (Рис. 33Б). Так предпочтение этанола после сеансов 1-4 было ниже по сравнению с сеансами 6, 7 и 9 ( $p < 0,05$ ), а также с сеансами 10-20 ( $p < 0,0005$ ). Кроме того, предпочтение этанола после сеанса 5 было ниже по сравнению с сеансами 16-20 ( $p < 0,05$ ). Несмотря на различный паттерн потребления алкоголя в начале реализации модели ПД20%СВ, данные показатели к ее окончанию не различались между экспериментальными группами.

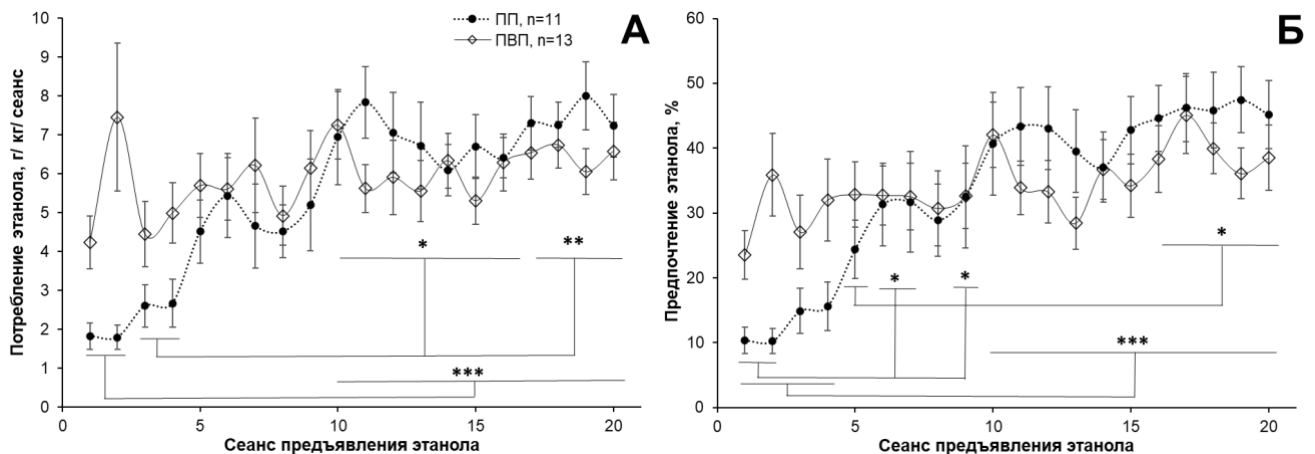


Рисунок 33 – Гетерогенность потребления раствора этилового спирта (А) и предпочтения спирта воде (Б) в модели ПД20%СВ. Крысы демонстрировали стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП) или потребляли спирт на постоянно высоком уровне (постоянно высокое потребление - ПВП). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий внутри группы ПП: \*\*\* -  $p < 0,0005$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \* -  $p < 0,05$ . Факторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.



Постепенное повышение потребления этанола и его предпочтения воде с увеличением числа предъявлений выбора между этанолом и водой является характерной чертой модели ПД20%СВ (Carnicella et al., 2014), однако потребление в конкретной популяции грызунов гетерогенно и некоторые животные не демонстрируют данного признака. К примеру, субпопуляция крыс Fischer (Mill et al., 2013) и Wistar (Momeni, Roman, 2014) потребляющих этанол на высоком уровне в модели прерывистого доступа к алкоголю в условиях свободного выбора повышало потребление с течением времени, тогда как животные, потребляющие этанол на низком уровне, не демонстрировали повышения потребления. На ранней стадии модели ПД20%СВ крысы обычно потребляют низкое количество этанола (<2,5 г/кг в течение 24 ч); однако к 3-4 неделе данной процедуры они постепенно увеличивают потребление достигая более высоких значений (5-6 г/кг в течение 24 ч) и предпочтения раствора этанола воде около 50% (Carnicella et al., 2014). Согласно данному исследованию лишь часть крыс Wistar демонстрирует повышение потребления характерное для ПД20%СВ, тогда как остальные животные потребляют этанол на постоянно высоком уровне. По всей видимости аутбредные крысы Wistar использованные в данной работе могут иметь генетические особенности, определяющие паттерн потребления алкоголя в условиях свободного выбора. Действительно, Wise (1974; 1975) описал, что крысы Wistar из разных питомников по-разному потребляли алкоголь в модели прерывистого доступа к алкоголю в условиях свободного выбора, независимо от времени года. Важно, что паттерн потребления практически идентичный выявленному в настоящем исследовании был описан в модели ПД20%СВ и для крыс-самцов Long-Evans (Ehinger et al., 2021).

На следующем этапе исследования оценивали взаимосвязь паттерна потребления алкоголя в модели чрезмерного потребления алкоголя и изменения экспрессии BDNF в отделах головного мозга, а также потенциальные механизмы, лежащие в основе экспрессии. Был проведен анализ уровня экзон-специфических вариантов мРНК BDNF, содержащих экзоны I, IV, VI и IX в отделах головного мозга крыс (ФК, гиппокамп, СМ) на третьи сутки после реализации модели

ПД20%СВ. Согласно однофакторному анализу ANOVA при отмене чрезмерного потребления этанола изменения экспрессии наблюдаются только в гиппокампе и только в отношении мРНК BDNF, содержащей экзон VI ( $F_{(2,29)}=4,300$ ,  $p=0,024$ ). Последующий *post hoc* анализ показал, что изменения уровня мРНК BDNF, содержащей экзон VI, отмечались только в группе ПП, значения в которой были выше, чем в группах контроль и ПВП (Рис. 34Б). В ФК и СМ изменений уровня экзон-специфической мРНК BDNF не отмечалось (Рис. 34А, 34В). Ранее Stragier и соавторы (2015) также исследовали эпигенетические основы регуляции экспрессии BDNF у мышей на модели постоянного доступа к алкоголю в условиях свободного выбора. Авторы продемонстрировали, что мРНК BDNF, содержащая экзон VI, но не I и IV, а также белок BDNF увеличиваются в гиппокампе после реализации выбранной модели, что отчасти согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании (Stragier et al. 2015 (a)). Экспрессия гена BDNF инициируемая с промотора экзона VI находится под контролем ряда нейротрансмиттеров. Так в гиппокампе и ПФК уровень мРНК BDNF, содержащей экзон VI, значительно снижен у крыс с нокаутированным геном транспортера серотонина, что сопряжено с увеличением уровня метилирования ДНК в соответствующем промоторе (Molteni et al., 2010). В астроцитах неокортекса стимулируемая дофамином экспрессия мРНК BDNF, содержащей экзон VI, зависит от активности транскрипционного фактора CREB (Koppel et al., 2018). Кроме того, в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что трансляция мРНК BDNF, содержащей экзон VI, репрессируется в ответ на стимуляцию рецепторов BDNF, метаботропных глутаматных рецепторов первой группы и ионотропных глутаматных рецепторов; напротив, трансляция мРНК BDNF, содержащей экзон VI, индуцируется норадреналином и дофамином, а также комбинацией серотонина и норадреналина (Vaghi et al., 2014).

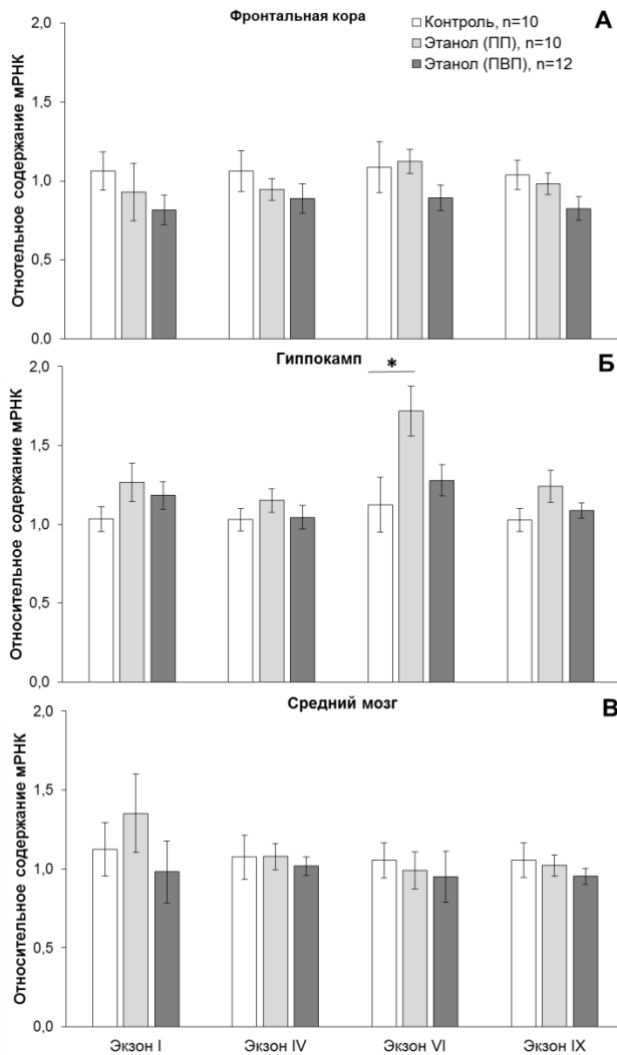


Рисунок 34 – Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс зависит от паттерна потребления этанола в условиях свободного выбора. На основании гетерогенности уровня потребляемого спирта в использованной выборке были выделены 2 группы животных: крысы, демонстрировавшие стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП) или потреблявшие спирт на постоянно высоком уровне (постоянно высокое потребление - ПВП) в модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$ : достоверность различий от группы Контроль. Факторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Предполагалось, что изменения уровня BDNF в отделах ЦНС на модели ПД20%СВ будут сопоставлены с изменениями уровня BDNF в отделах ЦНС после однократного внутрибрюшинного введения этанола в дозе 2.5 г/кг спустя 24 ч после введения. Установили, что острая интоксикация сопровождалась снижением уровня мРНК BDNF, содержащих экзон VI и общий экзон IX, в гиппокампе (Рис. 35Б). При этом экспрессия мРНК BDNF, содержащей экзоны I и IV, в гиппокампе не изменялась (Рис 35Б). При острой интоксикации значимых изменений вариантов мРНК BDNF в ФК и СМ зарегистрировать не удалось (Рис. 35А, 35В, соответственно). Острое воздействие этанола на содержание экзон-специфических мРНК BDNF в ЦНС до настоящего момента не исследовалось. Тем не менее ранее было установлено, что однократно введенный этанол способен изменять уровень мРНК BDNF, содержащей экзон I в гиппокампе, амигдале, прилежащем ядре стриатума, ПФК и ВОП крыс; при этом характер изменений зависит от дозы и времени, прошедшего

после интоксикации (Raivio et al., 2012). Таким образом, очевидно, что острая интоксикация может репрессировать BDNF, в основе чего, вероятно, лежит торможение транскрипционной активности регуляторных участков гена BDNF. Так известно, что в нейронах белок эпигенетической регуляции транскрипции MeCP2 оказывает репрессивное действие в отношении экспрессии мРНК BDNF, содержащей экзон VI (Rousseaud et al., 2015). Кроме того, глюкокортикоидный рецептор, обладающий активностью транскрипционного фактора, также ингибирует экспрессию мРНК BDNF, содержащей экзон VI (Chen et al., 2017).

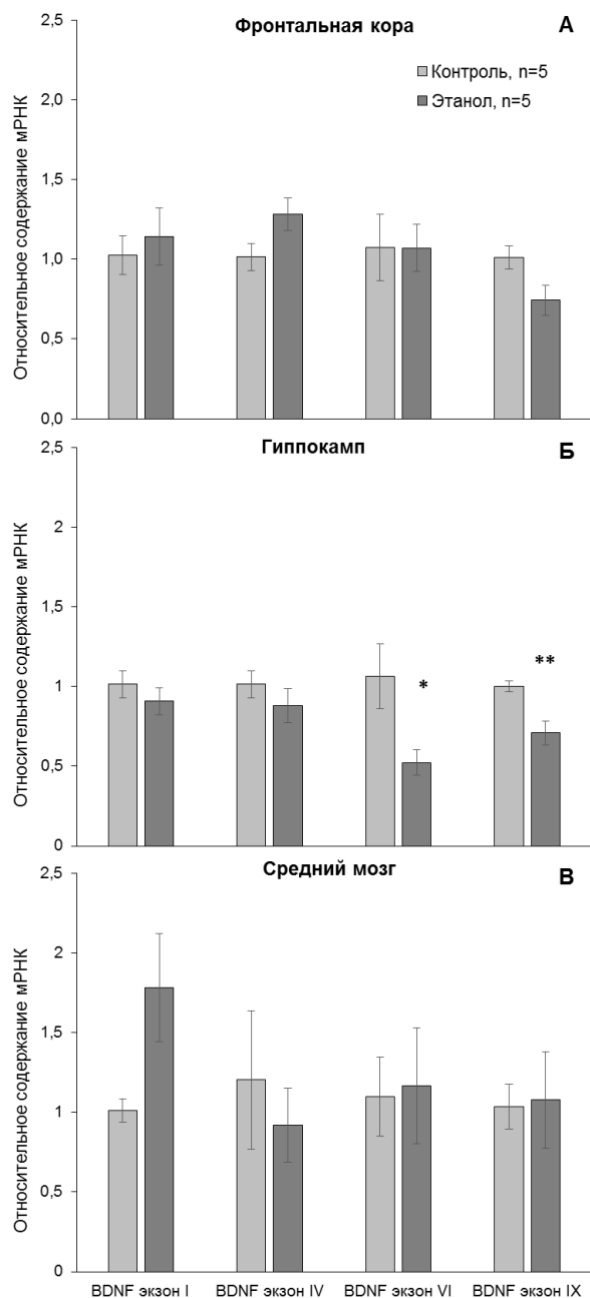


Рисунок 35 – Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс после острой алкогольной интоксикации. Этиловый спирт вводили однократно внутривенно в дозе 2,5 г/кг, отделы головного мозга исследовали спустя одни сутки после введения. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Достоверность различий между группами: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ . t-тест Стьюдента.

На следующем этапе мы сопоставили изменения уровня мРНК BDNF, зарегистрированные в гиппокампе крыс, демонстрирующих повышающееся потребление этанола на модели ПД20%СВ с соответствующими изменениями на уровне белка BDNF. Согласно однофакторному ANOVA принадлежность к экспериментальной группе не оказывало влияния на содержание BDNF ни в одном из исследованных отделов головного мозга: ФК ( $F_{(2,29)}=2,436$ ,  $p=0,105$ ), гиппокампе ( $F_{(2,29)}=2,833$ ,  $p=0,075$ ) и СМ

( $F_{(2,29)} = 0,312$ ,  $p = 0,734$ ) (Рис. 36). Несоответствие уровня мРНК белку хорошо известное явление. Так ранее было продемонстрировано, что экспрессия BDNF в зрительной коре крыс на уровне мРНК и белка изменяются не всегда согласовано как в процессе постнатального развития, так и в ответ на зрительную стимуляцию (Торреа et al., 2001). Сравнительный анализ транскриптома и протеома показывает, что на глобальном уровне *in vivo* мРНК необязательно коррелирует с уровнем соответствующих белковых продуктов (Ghazalpour et al. 2011). После того как произошла транскрипция мРНК дальнейшая судьба белка определяется многофакторными механизмами на посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях (Vogel, Marcotte, 2012).

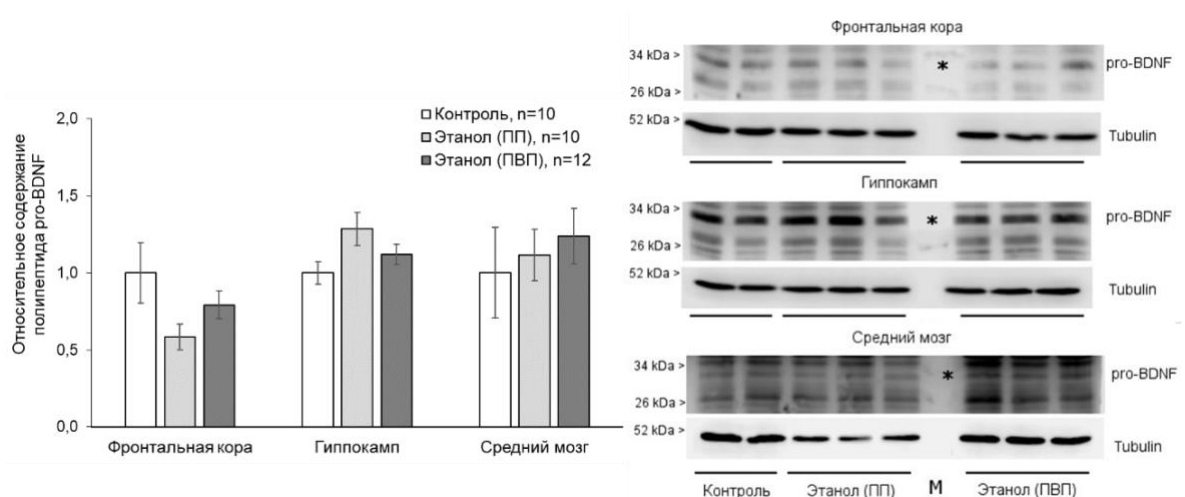


Рисунок 36 – Содержание белка BDNF в отделах головного мозга крыс при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. На основании гетерогенности уровня потребляемого спирта в использованной выборке были выделены 2 группы животных: крысы, демонстрировавшие стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП) или потреблявшие спирт на постоянно высоком уровне (постоянно высокое потребление - ПВП) в модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. Правая панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. \* - области оптической плотности, использованные для анализа.

Учитывая, что в гиппокампе были выявлены экзон-специфические изменения экспрессии BDNF на транскрипционном уровне на следующем этапе, был проведен анализ взаимодействия транскрипционных регуляторов и посттрансляционные модификации гистонов в районе регуляторных участков гена BDNF. В частности,

посредством проведения иммунопреципитации хроматина в гиппокампе был установлен паттерн взаимодействия транскрипционных факторов – регуляторов экспрессии BDNF (активирующего CREB и ингибирующего EZH2) с регуляторными участками гена BDNF (промоторы экзонов I, IV и VI), а также были выявлены особенности гистонового кода в данных локусах (активирующие и ингибирующие посттрансляционные модификации гистона H3 в регуляторных участках гена BDNF – ацетилированный лизин в положении 9 (H3K9ac) и триметилированный лизин в положении 27 (H3K27me3) соответственно). Согласно однофакторному ANOVA содержание H3K9ac изменялось в гиппокампе спустя трое суток после реализации модели чрезмерного потребления этанола в районе промотора экзона I  $F_{(2,29)} = 4,234$ ,  $p = 0,024$  и в районе промотора экзона VI  $F_{(2,29)} = 3,354$ ,  $p = 0,050$  (Рис. 37В). Согласно последующему *post hoc* анализу оказалось, что уровень H3K9ac сопровождающего активацию транскрипции в локусах промоторов экзона I и VI гена BDNF повышается в группе ПП по сравнению с контрольной группой (Рис. 37В). Ацетилирование гистона H3 в соответствующем промоторе может лежать в основе экспрессии мРНК BDNF, содержащей экзон VI, в гиппокампе, что связано с регуляцией устойчивости к стрессу у грызунов (Duclot, Kabbaj, 2013). Полученные результаты также частично совпадают с данными литературы, когда повышение экспрессии мРНК BDNF, содержащей экзон I, в гиппокампе мышей после реализации модели постоянного доступа к алкоголю в условиях свободного выбора сопровождается повышением уровня ацетилированного гистона H3 в районе соответствующего промотора (Stragier et al. 2015 (a)). Кроме того, согласно однофакторному ANOVA содержание H3K27me3 изменялось в гиппокампе спустя трое суток после реализации модели чрезмерного потребления этанола в районе промотора экзона VI  $F_{(2,29)} = 5,079$ ,  $p = 0,012$  (Рис. 37Г). Неожиданным фактом оказался тот результат, что уровень H3K27me3 в промоторе экзона VI гена BDNF сопровождающего репрессию транскрипции также повышается в гиппокампе группы ПП по сравнению с контролем (Рис. 37Г). Изменения уровня транскрипционных регуляторов CREB и EZH2, представленных

в регуляторных участках гена BDNF в гиппокампе выявлено не было (Рис. 37А, 37Б).

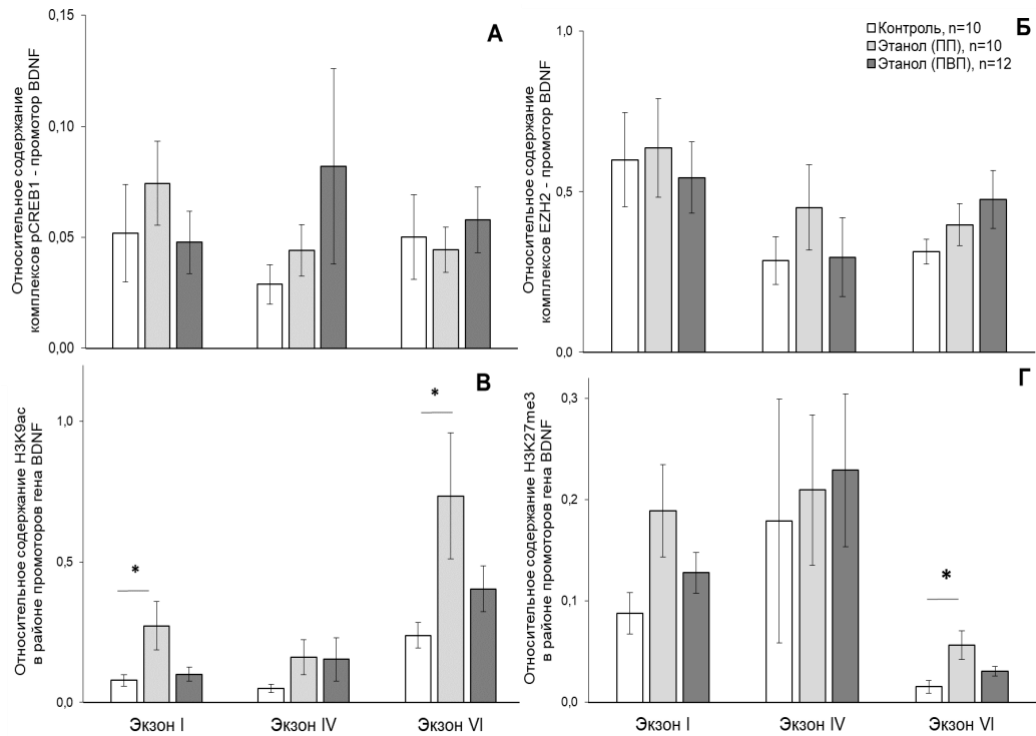


Рисунок 37 – Взаимодействие активатора CREB (А) и репрессора EZH2 (Б) транскрипции с регуляторными участками гена BDNF и особенности гистонового кода (активирующие и ингибирующие посттрансляционные модификации гистона H3: ацетилированный (H3K9ac) (В) и триметилированный (H3K27me3) (Г) соответственно) в данных локусах в гиппокампе крыс спустя трое суток после реализации модели ПД20%СВ. На основании гетерогенности уровня потребляемого спирта в использованной выборке были выделены 2 группы животных: крысы демонстрировавшие стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП) или потреблявшие спирт на постоянно высоком уровне (постоянно высокое потребление - ПВП) в модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего. \* -  $p < 0,05$ : достоверность различий от группы Контроль. Факторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Примечательно, что согласно представленным результатам, экспрессия BDNF изменяется только в гиппокампе. Атрофические нарушения в гиппокампе характерны для лиц, злоупотребляющих алкоголем (Toriwala et al., 2017), и связаны с соответствующими когнитивными расстройствами. Действительно ранее было продемонстрировано, что BDNF взаимосвязан с когнитивными расстройствами у лиц, зависимых от алкоголя (Han et al., 2015). Как показано в

экспериментах на грызунах, повышение уровня BDNF в гиппокампе носит адаптивный характер и может противодействовать когнитивным и психоэмоциональным нарушениям при субхроническом действии алкоголя (Briones, Woods, 2013; Stragier et al., 2015 (б)).

Можно заключить, что в острой фазе алкогольной абстиненции изменения экспрессии BDNF в гиппокампе происходят за счет транскрипционной регуляции активности экзона VI при этом направление изменений зависят от паттерна потребления раствора этанола в условиях свободного выбора. Таким образом, отмена морфина и алкогольная абстиненция характеризуются регион-специфическими особенностями экспрессии BDNF как на уровне транскрипции, так и на постраскрипционном уровне.

### *3.4.2. Функциональная роль BDNF в регуляции мотивации к потреблению алкоголя и манифестации проявлений алкогольной абстиненции<sup>13</sup>*

Роль сигналинга опосредованного BDNF в реализации положительного подкрепляющего эффекта алкоголя (уровень потребляемого спирта), а также манифестации абстинентных расстройств исследовали посредством внутрибрюшинного введения миметика BDNF – 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДФФ; Liu et al., 2016) за 1 ч перед каждым сеансом предъявления алкоголя в модели ПД20%СВ.

Согласно ANOVA с повторными измерениями сеанс предъявления этанола оказывал значительный эффект на уровень потребления ( $F_{(19,342)}=2,497$ ,  $p=0,0006$ ) и предпочтения алкоголя воде ( $F_{(19,342)}=4,539$ ,  $p=3\times 10^{-9}$ ) (Рис. 38А и 38Б, соответственно). Кроме того, согласно корреляционному анализу, сеанс предъявления находился в положительных корреляционных отношениях с уровнем потребления этанола как в группе которой предъявлялся только этанол ( $r=0,567$ ;  $p=0,009$ ) так и в группе, которая предварительно перед предъявлением получала

---

<sup>13</sup> - результаты опубликованы в соавторстве (Peregud et al., 2022 (б)).



7,8-ДГФ ( $r=0,613$ ;  $p=0,004$ ). Кроме того, сеанс предъявления находился в положительных корреляционных отношениях с уровнем предпочтения этанола воде как в группе которой предъявлялся только этанол ( $r=0,685$ ;  $p=0,0009$ ) так и в группе, которая предварительно перед предъявлением получала 7,8-ДГФ ( $r=0,754$ ;  $p=0,0001$ ). Что свидетельствует о постепенном повышении уровня потребления, соответствуя задаче данной модели – формированию мотивации к чрезмерному потреблению алкоголя. Несмотря на то что абсолютные значения уровня потребления этанола в группе получавшей 7,8-ДГФ были выше, согласно ANOVA с повторными измерениями эффект введения 7,8-ДГФ на уровень потребления не достигал статистической значимости, однако прослеживалась тенденция достижения эффекта ( $p<0,1$ ) ( $F_{(1,18)}=3,814$ ,  $p=0,067$ ) (Рис. 38А). Аналогичные результаты получены и в отношении предпочтения этанола ( $F_{(1,18)}=4,308$ ,  $p=0,052$ ) (Рис. 38Б). Взаимодействие эффектов сеанса предъявления и введения 7,8-ДГФ в отношении как потребления этанола так и предпочтения этанола воде также не были статистически достоверны ( $F_{(19,342)}=0,677$ ,  $p=0,842$ ) и ( $F_{(19,342)}=0,632$ ,  $p=0,881$ ), соответственно. Таким образом, можно заключить, что 7,8-ДГФ повышает потребление этанола и предпочтение спирта воде в модели ПД20%СВ на уровне тенденции (Рис. 38).

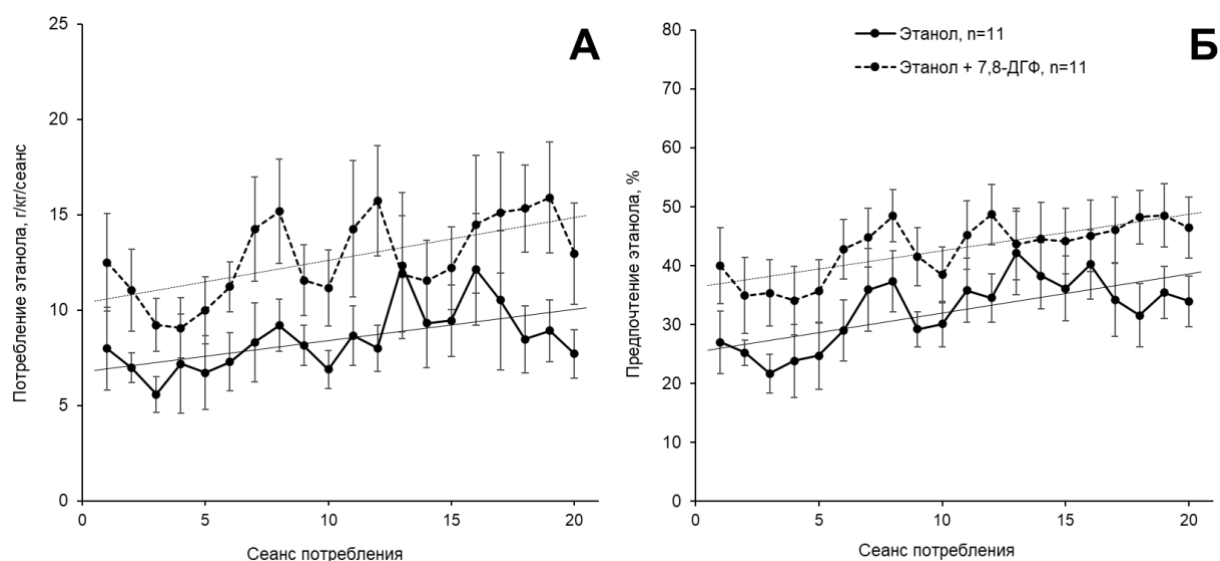


Рисунок 38 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) на потребление 20% раствора этанола (А) и предпочтение спирта воде (Б) в модели прерывистого доступа в условиях свободного выбора. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

Согласно данным литературы, считается, что сигнальные каскады инициируемые BDNF препятствуют чрезмерному потреблению алкоголя в условиях свободного выбора (Ron, Berger, 2018). В связи с чем мы полагали, что субхроническое введение 7,8-ДГФ могло бы модифицировать потребление алкоголя в модели ПД20%СВ, однако полученные результаты не подтвердили предположение. В соответствии с полученными в настоящем исследовании результатами Briones и Woods (2013) не выявили эффекта ежедневного введения 7,8-ДГФ на потребление алкоголя в модели, когда свободный выбор предоставлялся на протяжении 12 дней на 30 мин в темную фазу суток. Тем не менее ранее на схожей модели ПД20%СВ было продемонстрировано, что однократное внутрибрюшинное введение 7,8-ДГФ ослабляет уровень чрезмерно потребляемого этанола крысами после отмены (Li et al., 2020). Аналогично, как острое, так и субхроническое системное введение низкомолекулярного миметика 2-й петли BDNF ГТС-201 снижало выраженность алкоголь-депривационного эффекта (чрезмерно потребляемый уровень этанола после отмены потребления 10 % спирта в условиях свободного выбора) у самок, но не у самцов беспородных крыс (Колик и соавт., 2021). По всей видимости эффект 7,8-ДГФ на потребление спирта в условиях свободного выбора может зависеть от режима его введения, модели потребления алкоголя, а также временных рамок, в пределах которых происходит регистрация потребляемого спирта.

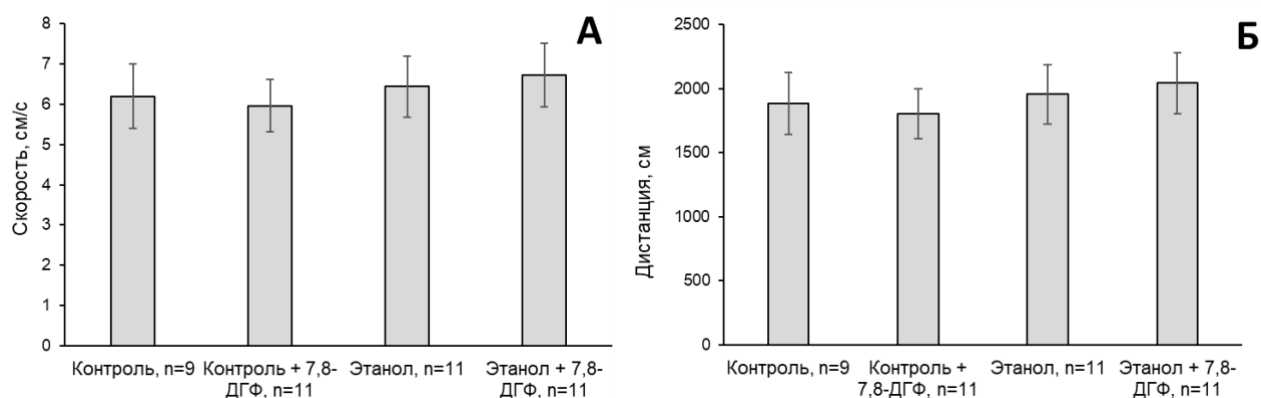


Рисунок 39 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) на двигательную активность в тесте «открытое поле» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

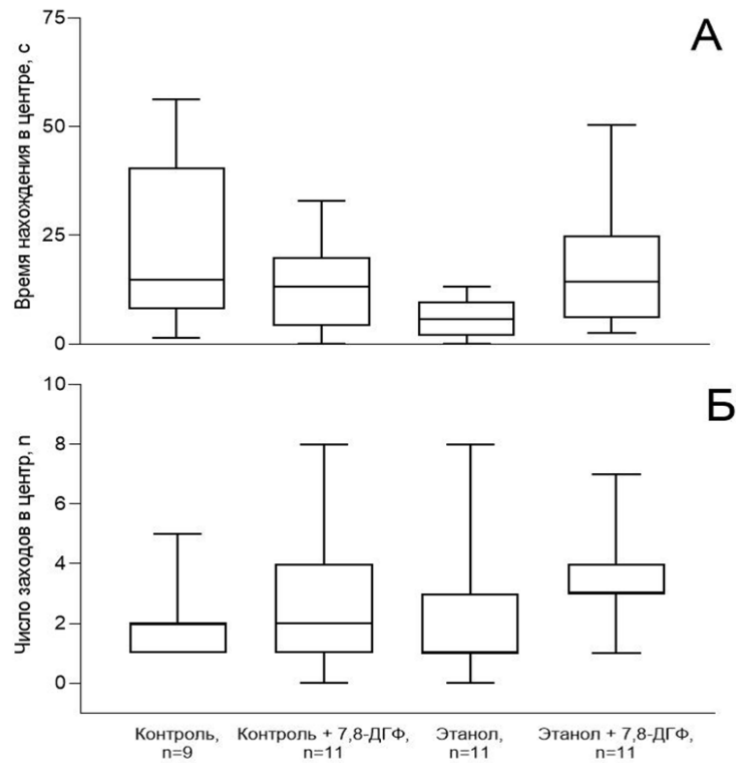


Рисунок 40 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) на тревожно-подобное поведение в тесте «открытое поле» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке.

Спустя сутки после реализации модели чрезмерного потребления алкоголя мы исследовали поведение крыс в тесте «открытое поле». Согласно результатам факторного ANOVA ни введение 7,8-ДГФ ни доступ к алкоголю, так же как их сочетанное действие не оказывают влияния на скорость передвижения и пройденную дистанцию в тесте «открытое поле» (Рис. 39). Согласно ранговому критерию Краскела-Уоллиса введение 7,8-ДГФ на протяжении реализации модели ПД20%СВ оказывает влияние на время нахождения в центральной зоне арены на уровне тенденции ( $H_{(3,38)}=7,712$ ,  $p=0,052$ ) (Рис. 40А). При этом различий числа заходов в центральную зону арены установлено не было ( $H_{(3,38)}=4,422$ ,  $p=0,219$ ) (Рис. 40Б). Тем не менее при том, что абсолютные значения времени нахождения в центре арены в группе, имеющей доступ к алкоголю ниже значений в остальных группах как минимум в 2,5 раза (Рис. 40А), последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна для не выявил достоверных

различий между экспериментальными группами. Можно полагать что, согласно тесту, «открытое поле» доступ к алкоголю в модели чрезмерного потребления вызывает тревожно-подобное поведение в острой фазе алкогольной абстиненции, что может нивелироваться введением 7,8-ДГФ на протяжении алкоголизации, однако эффекты не являются достаточно выраженными.

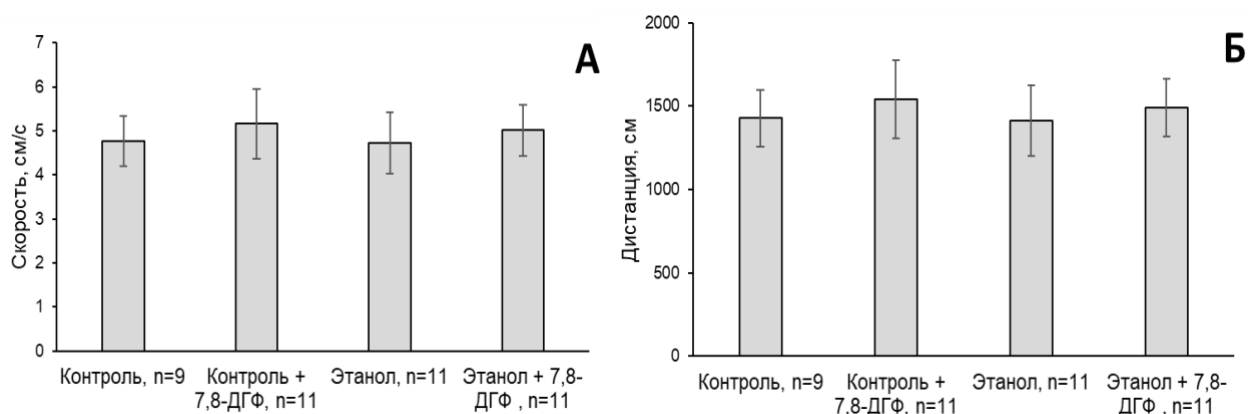


Рисунок 41 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) на двигательную активность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  ошибка среднего.

На вторые сутки по окончании модели исследовали поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Согласно результатам факторного ANOVA ни введение 7,8-ДГФ ни доступ к алкоголю, так же как их сочетанное действие не оказывают влияния на скорость передвижения, а также пройденную дистанцию в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (Рис. 41). Согласно результатам рангового ANOVA Краскела-Уоллиса предварительное введение 7,8-ДГФ на протяжении алкоголизации оказывает значимое влияние на время нахождения в открытых ( $H_{(3,38)}=9,436$ ,  $p=0,024$ ) (Рис. 42А), но не закрытых ( $H_{(3,38)}=5,039$ ,  $p=0,169$ ) (Рис. 42Б). (Рис. 42Б)) рукавах лабиринта в острой фазе алкогольной абстиненции. При том, что абсолютные значения времени нахождения в открытых рукавах в группах получавших 7,8-ДГФ независимо от доступа к алкоголю выше значений в группах не получавших 7,8-ДГФ как минимум в 2 раза (Рис. 42А) последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна не выявил достоверных различий между экспериментальными

группами. Различия числа заходов в открытые ( $H_{(3,38)}=4,279$ ,  $p=0,233$ ) (Рис. 42В) и закрытые рукава ( $H_{(3,38)}=0,248$ ,  $p=0,969$ ) (Рис. 42Г) лабиринта между экспериментальными группами отсутствуют. Можно заключить что, согласно тесту «приподнятый крестообразный лабиринт» введение 7,8-ДФ перед каждым предъявлением выбора между раствором этанола и воды в модели ПД20%СВ само по себе «снижает» тревожно-подобный статус в острой фазе алкогольной абстиненции независимо от алкоголизации, однако, выявленные эффекты не являются достаточно выраженными.

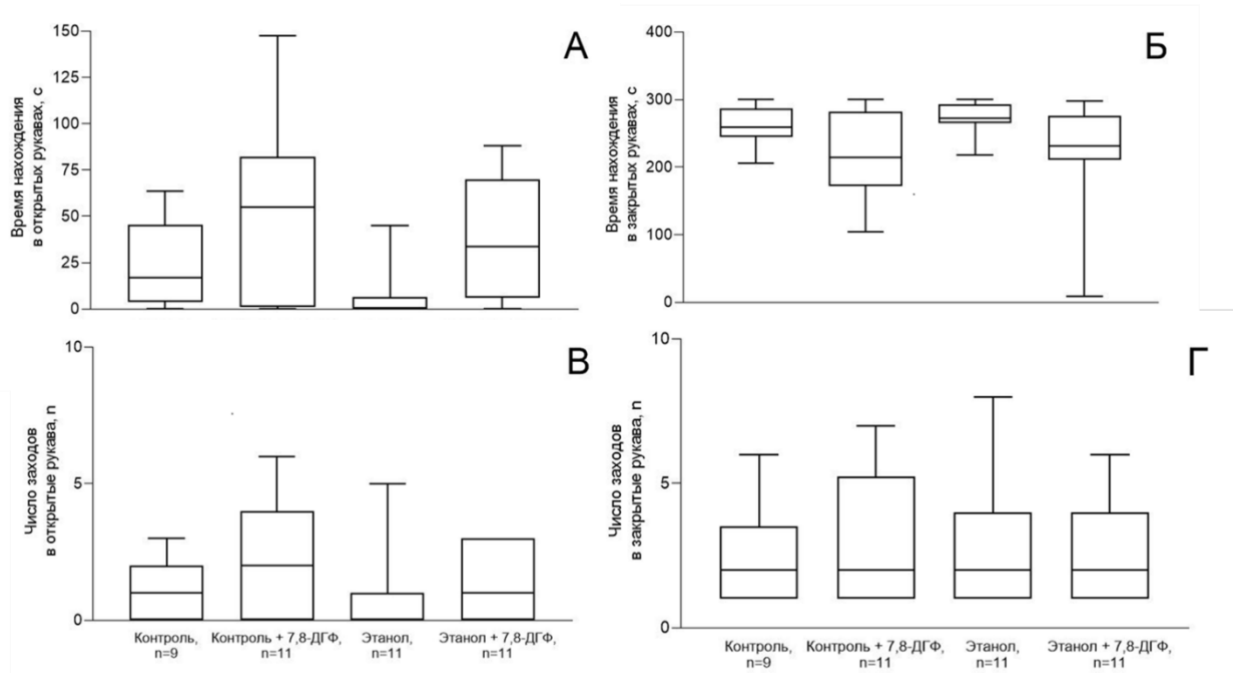


Рисунок 42 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДФ) поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке.

Системное введение 7,8-ДФ способно ослаблять тревожно-подобное состояние у грызунов в экспериментальных моделях включая потребление алкоголя в условиях свободного выбора. Chang и соавторы (2016) показали что введение 7,8-ДФ на протяжении 4 недель ослабляет тревожно-подобное поведение в приподнятом Т-образном лабиринте, индуцированное хроническим стрессом (Chang et al., 2016). Кроме того, однократная инъекция 7,8-ДФ ослабляет тревожно-подобное поведение у мышей в тестах «открытое поле» и «приподнятый

крестообразный лабиринт» на второй день абстиненции после реализации модели ПД20%СВ (Wang et al., 2021).

Согласно данным, полученным в настоящем исследовании формальных статистически достоверных различий тревожно-подобного поведения между животными, имевшими доступ к алкоголю и имевшими доступ к алкоголю и получавших 7,8-ДФ выявлено не было. Тем не менее абсолютные значения времени проведенного в центре открытого поля (Рис. 40А) и открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (Рис. 42А) в группе имевшей доступ к алкоголю в модели ПД20%СВ по меньшей мере в 2 раза ниже по сравнению с контрольной группой, а также группой животных имевших доступ к алкоголю и получавших 7,8-ДФ. Более того попарное сравнение с помощью U-теста Манна-Уитни времени проведенного в центре открытого поля (Рис. 40А) и открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (Рис. 42А) показало что величина данных показателей выше в группе имевшей доступ к алкоголю в модели ПД20%СВ по сравнению с контрольной группой животных ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о увеличении интенсивности тревожно-подобного поведения в острой фазе алкогольной абстиненции. Таким образом, прослеживалась очевидная тенденция достижения эффекта 7,8-ДФ в отношении тревожно-подобного поведения в период абстиненции после реализации модели ПД20%СВ.

Тревожность – это типичное аффективное расстройство на фоне синдрома отмены алкоголя (Koob, Volkow, 2010; Ron, Barak, 2016). Более того развитие тревожно-подобного поведения после потребления алкоголя может быть сопряжено с изменением экспрессии BDNF (Xu et al., 2021). Однако, некоторые группы исследователей продемонстрировали, что потребление алкоголя в условиях свободного выбора не оказывает влияние на тревожно-подобное поведение. Предоставление доступа в условиях свободного выбора к 10 % раствору алкоголя на 4 ч в темную фазу суток в течение 12 дней не оказывает влияние на число заходов в центр открытого поля спустя 8 дней после отмены (Briones, Woods, 2013). Также не было зарегистрировано изменений поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» ни спустя сутки (George et al., 2012), ни спустя 1 неделю

(Nelson et al., 2018) после отмены процедуры ПД20%СВ. Аналогично, непрерывный доступ к алкоголю в условиях свободного выбора (3-10% раствор этанола на протяжении 3 недель) не оказывает влияние на поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (Stragier et al., 2015 (б)). По всей видимости развитие тревожно-подобного состояния в контексте абстиненции после потребления алкоголя в условиях свободного выбора, а также эффект оказываемый 7,8-ДГФ представляет собой комплексный процесс, зависящий от экспериментальных условий (например, видовая принадлежность животных, модель потребления алкоголя, исследуемый период абстиненции, а также режим введения 7,8-ДГФ).

Таким образом, исследования функциональной роли стимуляции сигналинга BDNF посредством субхронического введения миметика 7,8-ДГФ на протяжении модели ПД20%СВ продемонстрировали, что, как и в случае с отменой морфина стимуляция частично ослабляет проявления алкогольной абстиненции, однако не оказывает выраженного влияния на мотивацию к потреблению этанола.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, можно заключить, что результаты настоящего исследования выявили особенности и потенциальные механизмы экспрессии BDNF при отмене морфина, кроме того, показано взаимодействие, а также функциональная роль в реализации абстинентных расстройств компонентов сигнальных каскадов, опосредуемых NO и BDNF. В частности, при отмене морфина в отделах ЦНС отмечается повышение уровня мРНК BDNF. По всей видимости, в основе установленного факта лежит активация транскрипции с промотора экзона I гена BDNF. Данный регуляторный участок является одним из наиболее реактивных в условиях нейрональной активности (Metsis et al. 1993; Aid et al., 2007). Среди прочих он содержит консенсусные участки связывания для многих транскрипционных факторов, включая CREB (Tabuchi et al., 2002), увеличение связывания, которого мы зарегистрировали. Стимуляция NMDA рецепторов запускает транскрипцию с экзона I, в основе этого лежат структурные изменения хроматина и реорганизация репрессирующих и активирующих транскрипционных регуляторов, представленных в соответствующем регуляторном участке гена BDNF (Tian et al., 2009). Вероятно, что гиперстимуляция глутаматных рецепторов, описанная для опиоидной абстиненции (Tanganelli et al., 1991; Rasmussen et al., 1995), предшествует увеличению мРНК BDNF содержащей экзон I. Кроме того, в настоящей работе было установлено, что NO регулирует содержание мРНК BDNF при отмене морфина. Учитывая, что NO является крайне реакционноспособной молекулой, его влияние на содержание BDNF может осуществляться напрямую или опосредованно за счет транскрипционных или посттранскрипционных механизмов. Литературные данные свидетельствуют, что в нейронах сигнальный каскад NO/цГМФ способен регулировать как экспрессию BDNF (Kurauchi et al., 2011), так и его секрецию (Hsieh et al., 2010). Влияние NO на экспрессию гена BDNF в условиях зависимости от морфина ранее не было описано.

Судьба транскрибированной мРНК BDNF может определяться противодействующими процессами, которые могут регулировать как ее деградацию так стабилизацию, а также внутриклеточную локализацию или



эффективность последующей трансляции. Результаты, представленные в настоящей работе, показали, что увеличенное содержание мРНК BDNF при отмене морфина сопровождается, напротив, снижением уровня микроРНК, которые имеют потенциальные участки связывания в 3'-UTR мРНК BDNF (miR-206 в ФК и miR-382 в СМ), а также снижением взаимодействия Ago-2 и HuD с 3'-UTR мРНК BDNF. Если снижение уровня комплексов микроРНК/Ago2, системы репрессирующей мРНК BDNF (Numakawa et al., 2011), наиболее вероятно предшествует стабилизации и повышению уровня BDNF, то снижение уровня взаимодействия позитивного регулятора мРНК BDNF – HuD (Lim, Alkon, 2012), представляется сложным ассоциировать с его влиянием на уровень BDNF. Учитывая, что HuD также может регулировать локализацию мРНК внутри нейрона (Vicario et al., 2015), мы полагаем, что снижение взаимодействия HuD с 3'-UTR мРНК BDNF может определять внутриклеточный транспорт транскрипта при интоксикации в отличие от абстиненции. До настоящего времени нет экспериментальных данных описывающих посттранскрипционную регуляцию мРНК BDNF в ЦНС посредством микроРНК или РНК-связывающих белков.

Увеличение мРНК BDNF, зарегистрированное в ФК, СМ и гиппокампе при отмене морфина, но не при субхронической интоксикации сопровождалось соответствующими изменениями на уровне как зрелого, так и про-формы белка BDNF только в ФК. Полученные результаты отчасти согласуются с работой Vachis и соавторов (Vachis et al., 2017), в которой было продемонстрировано, что уровень BDNF увеличивается в ФК как при интоксикации, так и при отмене. Наши данные могут свидетельствовать о том, процессы транскрипции и трансляции при отмене морфина могут быть разобщены, а их эффективность определяются регионом мозга. Кроме того, установлено, что ингибирование синтеза NO при интоксикации предотвращает повышение зрелого, но не про-формы белка BDNF при отмене морфина, что свидетельствует о том, что NO может напрямую или опосредованно регулировать процессинг, но не трансляцию BDNF. В настоящей работе было установлено, что введение ингибитора NOS при формировании зависимости от морфина не только предотвращает повышение экспрессии BDNF и активацию

TrkB, но и сопровождается усилением абстинентных расстройств при спонтанной отмене морфина. Таким образом, мы представили доказательства того, что NO ослабляет проявления отмены, что отчасти может быть опосредовано его способностью регулировать экспрессию и последующую физиологическую активность BDNF. Притом что известно о взаимном влиянии NO и BDNF в ЦНС (Biojone et al., 2015), ассоциация данных сигнальных систем в условиях отмены опиатов ранее не была описана.

Интересно, что в отличие от достаточно простого ответа на опииную абстиненцию со стороны BDNF, показатели, характеризующие активность сигнальных каскадов, которые опосредуются NO, имели разнонаправленный характер в зависимости от исследованного отдела мозга. В частности, повышенная при отсроченной отмене морфина концентрация  $\text{NO}_x^-$  в гиппокампе связана со снижением тревожности. Кроме того, у животных с низкой выраженностью в отличие от животных с высокой выраженностью спонтанного синдрома отмены концентрация цГМФ в ФК была повышена, а в СМ снижена.

Согласно полученным результатам изменения экспрессии BDNF при алкогольной и опиинной абстиненции различны. Так было установлено, что в острой фазе алкогольной абстиненции изменения экспрессии BDNF в гиппокампе происходят за счет транскрипционной регуляции экзона VI, при этом направление изменений зависят от паттерна потребления этилового спирта. Экспрессия BDNF, инициируемая с промотора экзона VI, находится под контролем ряда нейромедиаторов, например, дофамина (Koppel et al., 2018) и серотонина (Molteni et al., 2010). Учитывая, что при отмене алкоголя отмечается депрессия дофаминергической нейромедиаторной системы (Dahchour, Ward, 2022), маловероятно, что дофамин играет значимую роль в регуляции экспрессии BDNF в наших экспериментальных условиях. В то же время противоречивость данных литературы относительно активности серотонинергической системы в период алкогольной абстиненции (Belmer et al., 2016) также препятствует однозначным предположениям относительно связи серотонина и изменения уровня BDNF. Таким образом, отмена морфина и алкогольная абстиненция характеризуются

регион-специфическими особенностями экспрессии BDNF на уровне транскрипции. Кроме того, есть схожие эффекты: как и в случае с отменой морфина стимуляция сигналинга BDNF частично ослабляет проявления алкогольной абстиненции.

Важным результатом представленной работы является установление того факта, что локальное введение BDNF в ВОП в период отмены морфина способно частично ослаблять суммарную выраженность поведенческих проявлений абстиненции. Необходимо отметить, что ранее подобные результаты описаны не были.

Формирование патологической зависимости от психоактивных веществ характеризуется специфическими адаптивными процессами в мезокортиколимбических отделах ЦНС, которые зависят от фармакодинамических свойств вещества и временными рамками его воздействия (Korpi et al., 2015). Характерной морфологической особенностью субхронической интоксикации опиатами является нарушение синаптогенеза (снижение количества ветвей дендритов и плотности шипиков дендритов) в неокортексе (Robinson, Kolb, 1999; Li et al., 2007), а также выраженная в той или иной степени атрофия (снижение величины площади и периметра) дофаминергических нейронов ВОП (Skclair-Tavron et al., 1996; Russo et al., 2007; Mazei-Robison, Nestler, 2012; Shi et al., 2015; Doyle, Mazei-Robison, 2021). Важно, что как спонтанная, так и индуцированная налоксоном отмена субхронического введения морфина, но не субхроническая интоксикация сама по себе, сопровождаются снижением величины площади и периметра тела дофаминергических нейронов ВОП (Spiga et al., 2003). Тем не менее биологические основы морфологических нарушений при формировании зависимости и манифестации абстиненции до настоящего времени окончательно не выяснены. Резонно полагать, что дефицит трофической регуляции может лежать в основе указанных нарушений при опиной абстиненции, что в свою очередь может определять некоторые проявления синдрома отмены. Иными словами, при отмене морфина следовало бы ожидать снижение содержания и/или активности нейротрофинов в отделах головного мозга. Однако, результаты, проведенного исследования не выявили дефицита нейротрофинов при отмене морфина,

напротив, было установлено повышение уровня BDNF. Более того, введение BDNF в ВОП ослабляло проявления абстиненции.

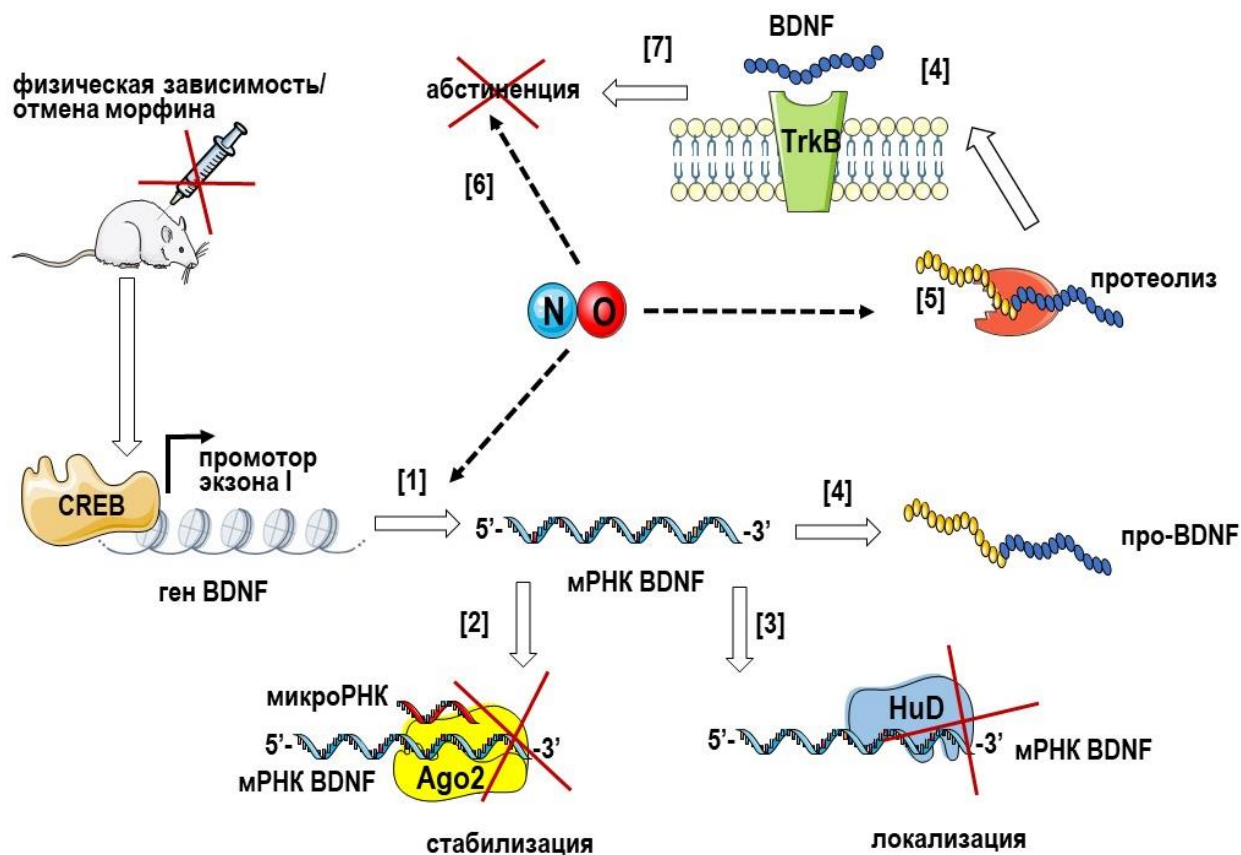


Рисунок 43 – Рабочая схема взаимодействия нейрохимических систем NO и BDNF при отмене морфина. Отмена морфина сопровождается активацией транскрипции BDNF с промотора экзона I: транскрипционный фактор CREB и NO регулируют данный процесс [1]. В условиях абстиненции транскрибированная мРНК BDNF может быть стабилизирована за счет торможения ее деградации, опосредованной микроРНК [2], а внутриклеточная локализация мРНК BDNF может регулироваться РНК-связывающими белками, например, HuD [3]. При отмене морфина повышается уровень зрелого белка BDNF и его про-формы [4]. NO может оказывать влияние на процессы созревания белка BDNF [5]. NO и компоненты его сигнальных каскадов ассоциированы с тяжестью абстиненции, причем ингибирование синтеза NO сопровождается усилением выраженности синдрома отмены морфина [6], что может быть связано со способностью NO оказывать влияние на уровень BDNF [1, 5]. BDNF в ВОП ослабляет абстиненцию [7].

Повышение уровня BDNF и, как следствие, активация внутриклеточных каскадов запускает определенную транскрипционную программу, которая среди прочих включает гены, связанные с зависимостью от морфина (Koshimizu et al.,

2021). Примечательно, что ранее было показано, что специфическое повышение мРНК BDNF, содержащей экзон I, в нейронах сопровождается увеличением экспрессии генов ответственных за рост дендритов и фактически стимулирует дендритогенез (Savell et al., 2019; Bach et al., 2023). Таким образом, с определенной долей допущения можно заключить, что выявленные закономерности экспрессии и активности BDNF в условиях спонтанной отмены морфина позволяют рассматривать NO-зависимую регуляцию BDNF не как причину абстиненции, но как компенсаторный механизм, противодействующий абстиненции. Полученные результаты представлены в виде упрощенной схемы на Рис. 43.

## ВЫВОДЫ

1. Отмена морфина сопровождается увеличением экспрессии BDNF в отделах головного мозга крыс; в основе этого лежит активация транскрипции с промотора экзона I соответствующего гена, а также торможение посттранскрипционной деградации посредством микроРНК.
2. Регион-специфические изменения концентрации  $\text{NO}_x^-$  и цГМФ в головном мозге коррелируют с поведенческими проявлениями абстиненции.
3. Ингибирование синтеза NO во время субхронической интоксикации предотвращает увеличение уровня BDNF в отделах головного мозга, что сопровождается усилением абстинентных расстройств. Однократное введение рекомбинантного BDNF в ВОП при отмене морфина приводит к снижению выраженности абстиненции.
4. В отличие от отмены морфина алкогольная абстиненция характеризуется увеличением экспрессии BDNF в гиппокампе за счет транскрипционной регуляции активности промотора экзона VI, при этом направление изменений зависит от паттерна потребления этилового спирта. Как и в случае с отменой морфина, стимуляция сигналинга BDNF частично ослабляет проявления алкогольной абстиненции.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3'-UTR – 3'-untranslated region; 3'-нетранслируемая область

7,8-ДГФ – 7,8-дигидроксифлавонол

АЦ – аденилатциклаза

ВОП – вентральная область покрышки

ГАМК –  $\gamma$ -аминомасляная кислота

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГП – голубое пятно

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДАН – 2,3-диаминонафталин

ДМСО - диметилсульфоксид

ДТТ – 1,4-дитиотреитол

НАДФН –  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленная форма

ПФК - префронтальная кора

ГЦ – гуанилатциклаза

СМ - средний мозг

ТГБП – (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин (ВН4)

УРПМ – условная реакция предпочтения места

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФК - фронтальная кора

ФМН – флавиномононуклеотид

ФМСФ – фенилметансульфонилфторид

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЭГТА – (этилендиокси)диэтилендинитрилотетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АМРА –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid;  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; нейротрофический фактора мозга

CaMKII – calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; кальций/кальмодулин-зависимая протинкиназа II

CREB – cAMP responsive element binding protein

EZH2 – enhancer of zeste 2

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HuD – Hu-antigen D

L-NAME – L-NG-Nitroarginine methyl ester; метиловый эфир L-NG-нитроаргинина

L-NNA – L-NG-Nitroarginine; L-NG-нитроаргинин

MeCP2 – methyl-CpG binding protein 2

NED – N-(1-Naphthyl)ethylenediamine; N-(1-нафтил)-этилендиамин

NMDA – N-Methyl-D-aspartic acid; N-метил-D-аспарагиновая кислота

NO – оксид азота

NOC – NO-синтаза

NO<sub>x</sub><sup>-</sup> – нитраты и нитриты

PBS – phosphate-buffered saline; фосфатно-солевой буфер

SDS – sodium dodecyl sulfate; додецилсульфат натрия



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Альтшулер В.Б., Серова Л.А., Кравченко С.Л., Корольков А.И., Зарицкая В. А., Ходыкина Л. А. Атрофические изменения церебральных структур у больных алкоголизмом, различающихся объемами потребляемого алкоголя // *Вопр. наркол.* – 2013. – № 6. С. 176-191.
- Боголепов Н.Н. Изменения дендритов при хронической интоксикации морфином // *Арх. Анат. Гистол. Эмбриол.* – 1981. – Т. 81. – С. 5-10.
- Гуляева Н.В. Взаимодействие системы BDNF и глутаматергической системы в мозге: краткий обзор и связь с патогенезом депрессии // *Биохимия.* – 2017. – Т. 82, № 3. – Р. 441-448.
- Киржанова В.В., Григорова Н.И., Бобков Е.Н., Киржанов В.Н., Сидорюк О.В. Деятельность наркологической службы в Российской Федерации в 2019-2020 годах: Аналитический обзор. – М.: ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, 2021. – 192 с.
- Колик Л.Г., Константинопольский М.А., Надорова А.В., Круглов С.В., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Пептидный миметик 4-й петли BDNF купирует поведенческие признаки синдрома отмены морфина и препятствует увеличению ΔFosB в стриатуме у крыс // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* – 2020. – Т. 170, № . 7. – С. 40-44.
- Колик Л.Г., Надорова А.В., Григоревских Е.М., Сазонова Н.М., Гудашева Т.А., Дурнев А.Д. Низкомолекулярный миметик 2-й петли BDNF снижает потребление этанола у самок крыс // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* – 2021. – Т. 171, № 4. – С. 448-452.
- Константинопольский М.А., Суркова Л.А., Тюрина И.В., Судаков С.К. Оценка индивидуальной чувствительности крыс линии Вистар к формированию зависимости от морфин // *Эксп. и клинич. фармакол.* – 1992. – Т. 55, № 2. – С. 9-11.
- Морозов Г.В., Боголепов Н.Н. Морфинизм. – М.: Медицина, 1984. – 173 с.

- Онуфриев М.В., Семенова Т.П., Колаева С.Г., Моисеева Ю.В., Егорова Л.К., Гуляева Н.В. Активность синтазы оксида азота в отделах мозга сусликов *Citellus Undulatus* в разных фазах гибернационного цикла // *Нейрохимия*. – 2002. – Т. 19. – С. 264-268.
- Перегуд Д.И., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. Особенности экспрессии экзон-специфических вариантов мРНК нейротрофического фактора мозга в ЦНС крыс при действии алкоголя // *Наркология*. – 2019. – Т. 18, № 11. – Р. 42-50.
- Перегуд Д.И., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. МикроРНК могут регулировать уровень нейротрофического фактора мозга во фронтальной коре крыс при спонтанной отмене морфина // *Нейрохимия*. – 2016. – Т. 33, № 4. – С. 323-331. (а)
- Перегуд Д.И., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Влияние однократной инъекции нейротрофического фактора мозга в срединную область покрышки на подкрепляющие свойства морфина // *Журнал высшей нервной деятельности нейрофизиологии им. И.П. Павлова*. – 2016. – Т. 66, № 5. – С. 632-640. (б)
- Перегуд Д.И., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Роль сигнального каскада NO/цГМФ в формировании опиной зависимости // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т. 76, № 3. – С. 3-6. (а)
- Перегуд Д.И., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Влияние нейротрофического фактора мозга на синдром отмены морфина в эксперименте // *Вопросы наркологии*. – 2013. – № 3. – С. 41-49. (б)
- Перегуд Д.И., Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Экспрессия мРНК нейротрофинов в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина // *Нейрохимия*. – 2011. – Т. 28, № 2. – С. 142-148.
- Панченко Л.Ф., Перегуд Д.И., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Гуляева Н.В. Циклический гуанозинмонофосфат головного мозга крыс и

индивидуальные особенности формирования опиоидной зависимости // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2008. – № 1. – С. 33-36.

Перегуд Д.И., Воронцова О.Н., Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Изменение тревожности при абстиненции коррелирует с состоянием нитрергической системы в гиппокампе крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 4. – С. 357-365.

Перегуд Д.И. Система оксида азота в динамике действия морфина: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.45 / Перегуд Данил Игорьевич. – М., 2006. – 125 с.

Сошников С.С., Стародубов В.И., Халтурина Д.А., Власов В.В., Обухова О.В., Идрисов Б.Т. Бремя последствий от употребления психоактивных веществ в Российской Федерации // Неврологический вестник. - 2020. - Т. 52, № 1. - С. 49-54.

Судаков С.К., Борисова Е. В., Русаков Д.Ю. Метод количественной оценки синдрома отмены у морфин-зависимых крыс // Эксп. и клинич. фармакол. – 1994. – Т. 57, № 2. – С. 60-63.

Abdel-Zaher A.O., Hamdy M.M., Aly S.A., Abdel-Hady R.H., Abdel-Rahman S. Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – V. 540. – P. 60-66.

Abraham K.P., Salinas A.G., Lovinger D.M. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits // Neuron. – 2017. – V. 96, № 6. – P. 1223-1238.

Aid T., Kazantseva A., Piirsoo M., Palm K., Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited // J. Neurosci. Res. – 2007. – V. 85. – P. 525-535.

Akbarian S., Rios M., Liu R.J., Gold S.J., Fong H.F., Zeiler S., Coppola V., Tessarollo L., Jones K.R., Nestler E.J., Aghajanian G.K., Jaenisch R. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons // J. Neurosci. – 2002. – V. 22. – P. 4153-4162.

- Allen M., Bird C., Feng W., Liu G., Li W., Perrone-Bizzozero N.I., Feng Y. HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, № 1. – P. e55718.
- Altar C.A., Cai N., Bliven T., Juhasz M., Conner J.M., Acheson A.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain // *Nature*. – 1997. – V. 389, № 6653. – P. 856-860.
- An J.J., Gharami K., Liao G.Y., Woo N.H., Lau A.G., Vanevski F., Torre E.R., Jones K.R., Feng Y., Lu B., Xu B. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons // *Cell*. – 2008. – V. 134, № 1. – P. 175-187.
- Anastasia A., Deinhardt K., Chao M.V., Will N.E., Irmady K., Lee F.S., Hempstead B.L., Bracken C. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction // *Nat. Commun.* – 2013. – V. 4. – P. 2490.
- Andero R., Heldt S.A., Ye K., Liu X., Armario A., Ressler K.J. Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning // *Am. J. Psychiatry*. – 2011. – V. 168, № 2. – P. 163-172.
- Angelucci F., Ricci V., Pomponi M., Conte G., Mathé A.A., Attilio Tonali P., Bria P. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor // *J Psychopharmacol.* – 2007. – V. 21, № 8. – P. 820-825.
- Arguello A.A., Fischer S.J., Schonborn J.R., Markus R.W., Brekken R.A., Eisch A.J. Effect of chronic morphine on the dentate gyrus neurogenic microenvironment // *Neuroscience*. – 2009. – V. 159, № 3. – P. 1003-1010.
- Aricioglu F., Paul I.A., Regunathan S. Agmatine reduces only peripheral-related behavioral signs, not the central signs, of morphine withdrawal in nNOS deficient transgenic mice // *Neurosci. Lett.* – 2004. – V. 354. – P. 153-157.

- Ary M., Cox B., Lomax P. Dopaminergic mechanisms in precipitated withdrawal in morphine-dependent rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1977. – V. 200, № 2 – P. 271-276.
- Asuni G.P., Speidell A., Mocchetti I. Neuronal apoptosis induced by morphine withdrawal is mediated by the p75 neurotrophin receptor // *J. Neurochem.* – 2021. – V. 158, № 2. – P. 169-181.
- Autry A.E., Monteggia L.M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders // *Pharmacol. Rev.* - 2012. – V. 64. – P. 238-258.
- Bach S.V., Bauman A.J., Hosein D., Tuscher J.J., Ianov L., Greathouse K.M., Henderson B.M., Herskowitz J.H., Martinowich K., Day J.J. Distinct roles of Bdnf I and Bdnf IV transcript variant expression in hippocampal neurons // *bioRxiv [Preprint]*. – 2023. – doi: 10.1101/2023.04.05.535694.
- Bachis A., Campbell L.A., Jenkins K., Wenzel E., Mocchetti I. Morphine Withdrawal Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor Precursor // *Neurotox. Res.* – 2017. – V. 32, № 3. – P. 509-517.
- Bahi A., Dreyer J.L. Viral-mediated overexpression of the Myelin Transcription Factor 1 (MyT1) in the dentate gyrus attenuates anxiety- and ethanol-related behaviors in rats // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2017. – V. 234, № 12. – P. 1829-1840.
- Baj G, Leone E, Chao MV, Tongiorgi E. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2011. – V.108. – P. 16813-16818.
- Banoujaafar H., Monnier A., Pernet N., Quirié A., Garnier P., Prigent-Tessier A., Marie C. Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide // *Eur. J. Neurosci.* – 2016. – V. 44, № 5. – 2226-2235.
- Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain // *EMBO J.* – 1982. – V. 1, № 5. – P. 549-553.

- Bardo M.T., Bevins R.A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2000. – V. 153. – P. 31–43.
- Barney T.M., Vore A.S., Deak T. Acute Ethanol Challenge Differentially Regulates Expression of Growth Factors and miRNA Expression Profile of Whole Tissue of the Dorsal Hippocampus // *Front. Neurosci.* – 2022. – V. 16. – P. 884197.
- Bazzari A.H., Bazzari F.H. BDNF Therapeutic Mechanisms in Neuropsychiatric Disorders // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23, № 15. – P. 8417.
- Beitner-Johnson D., Nestler E.J. Chronic morphine decreases insulin-like growth factor-I levels in the ventral tegmental area of the rat brain // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1993. – V. 692. – P. 246-248.
- Belmer A., Patkar O.L., Pitman K.M., Bartlett S.E. Serotonergic Neuroplasticity in Alcohol Addiction // *Brain. Plast.* – 2016. – V. 1, № 2. – P. 177-206.
- Berhow M.T., Hiroi N., Nestler E.J. Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – P. 4707-4715.
- Berhow M.T., Russell D.S., Terwilliger R.Z., Beitner-Johnson D., Self D.W., Lindsay R.M., Nestler E.J. Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system // *Neuroscience* – 1995. – V. 68. – P.969-979.
- Bhargava H.N. Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase // *Gen. Pharmacol.* – 1995. – V. 26. – P. 1049-1053.
- Bhargava H.N., Cao Y.J. Effect of chronic administration of [D-Pen2, D-Pen5] enkephalin on the activity of nitric oxide synthase in brain regions and spinal cord of mice // *Peptides*. – 1998. – V. 19. – P. 113-117.

- Bhargava H.N., Kumar S. Effect of multiple injections of U-50, 488H, a kappa-opioid receptor agonist, on the activity of nitric oxide synthase in brain regions and spinal cord of mice // *Gen Pharmacol.* –1997. – V. 29. – P. 397-399.
- Bie B., Zhang Z., Cai Y.Q., Zhu W., Zhang Y., Dai J., Lowenstein C.J., Weinman E.J., Pan Z.Z. Nerve growth factor-regulated emergence of functional delta-opioid receptors // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30, № 16. – P. 5617-5628.
- Billa S.K., Liu J., Bjorklund N.L., Sinha N., Fu Y., Shinnick-Gallagher P., Morón J.A. Increased insertion of glutamate receptor 2-lacking alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors at hippocampal synapses upon repeated morphine administration // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – V. 77, № 5. – P. 874-883.
- Biojone C., Casarotto P.C., Joca S.R., Castrén E. Interplay Between Nitric Oxide and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Plasticity // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* – 2015. – V. 14, № 8. – P. 979-987.
- Blackwood C.A., Cadet J.L. The molecular neurobiology and neuropathology of opioid use disorder // *Curr. Res. Neurobiol.* – 2021. – V. 2. – P. 100023.
- Bläsig J., Herz A., Reinhold K., Zieglgänsberger S. Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats // *Psychopharmacologia.* – 1973. – V. 33, № . 1. – P. 19-38.
- Bloch S., Holleran K.M., Kash T.L., Vazey E.M., Rinker J.A., Lebonville C.L., O'Hara K., Lopez M.F., Jones S.R., Grant K.A., Becker H.C., Mulholland P.J. Assessing negative affect in mice during abstinence from alcohol drinking: Limitations and future challenges // *Alcohol.* –2022. – V. 100. – P. 41-56.
- Bogolepov N.N. Changes in dendrites in chronic morphine intoxication // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 1985. – V. 15. – P. 189-193.
- Bolognani F., Perrone-Bizzozero N.I. RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons // *J. Neurosci. Res.* – 2008. – V. 86, № 3. – P. 481-489.

- Bonci A., Williams J.T. A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. // *Neuron*. – 1996. – 16, № 3. – P. 631-639.
- Boulanger L.M., Poo M.M. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation // *Nat. Neurosci.* – 1999. – V. 4. P. 346–351.
- Boulle F., van den Hove D.L., Jakob S.B., Rutten B.P., Hamon M., van Os J., Lesch K.P., Lanfumey L., Steinbusch H.W., Kenis G. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders // *Mol. Psychiatry*. – 2012. – V. 17, № 6. – P. 584-596.
- Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1989. – V. 86. – P. 9030-9033.
- Bremner J.D. Brain imaging in anxiety disorders // *Expert. Rev. Neurother.* – 2004. – V. 4, № 2. – P. 275-284.
- Briones T.L., Woods J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis // *Neuroscience*. – 2013. – VI. 254. – P. 324-334.
- Bronicki L.M., Jasmin B.J. Emerging complexity of the HuD/ELAV14 gene; implications for neuronal development, function, and dysfunction // *RNA*. – 2013. – V. 19. – P. 1019-1037.
- Browne C.J., Godino A., Salery M., Nestler E.J. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction // *Biol. Psychiatry*. – 2020. – V. 87, № 1. – P. 22-33.
- Buckman S.G., Hodgson S.R., Hofford R.S., Eitan S. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal // *Behav. Brain. Res.* – 2009. – V. 197, № 2. – V. 454-456.
- Budygin E.A., Phillips P.E., Robinson D.L., Kennedy A.P., Gainetdinov R.R., Wightman R.M. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – V. 297. – P. 27-34.



- Canossa M., Giordano E., Cappello S., Guarnieri C., Ferri S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. – V. 99, № 5. – 3282-3287.
- Carlezon W.A. Jr., Duman R.S., Nestler E.J. The many faces of CREB // *Trends Neurosci.* – 2005. – V. 28, № 8. – P. 436-445.
- Carnicella S., Ron D., Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse // *Alcohol.* – 2014. – V. 48. – P. 243-252.
- Carola V., Gross C. BDNF moderates early environmental risk factors for anxiety in mouse // *Genes. Brain. Behav.* – 2010. – V. 9, № 4. – P. 379-389.
- Cattaneo A., Cattane N., Begni V., Pariante C.M., Riva M.A. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders // *Transl. Psychiatry.* – 2016. – V. 6, № 11. – P. e958.
- Chang H.A., Wang Y.H., Tung C.S., Yeh C.B., Liu Y.P. 7,8-Dihydroxyflavone, a tropomyosin-kinase related receptor B agonist, produces fast-onset antidepressant-like effects in rats exposed to chronic mild stress // *Psychiatry Investig.* – 2016. – V. 13. – P. 531-540.
- Chao M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2003 – V. 4, № 4. – P. 299-309.
- Chen C.L., Liu H., Guan X. Changes in microRNA expression profile in hippocampus during the acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference in rats // *J. Biomed. Sci.* – 2013. – V. 20, № 1. – P. 96.
- Chen H., Lombès M., Le Menuet D. Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells // *Mol. Brain.* – 2017. – V. 10. № 1. – P. 12.
- Chen S.L., Lee S.Y., Chang Y.H., Wang T.Y., Chen S.H., Chu C.H., Chen P.S., Yang Y.K., Hong J.S., Lu R.B. The BDNF Val66Met polymorphism and plasma brain-derived

neurotrophic factor levels in Han Chinese heroin-dependent patients // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 8148.

Chen S.L., Tao P.L., Chu C.H., Chen S.H., Wu H.E., Tseng L.F., Hong J.S., Lu R.B. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats // *J. Neuroimmune. Pharmacol.* – 2012. – V. 7, № 2. – P. 444-453.

Cheng A., Wang S., Cai J., Rao M.S., Mattson M.P. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain // *Dev. Biol.* – 2003. – V. 258, № 2. – 319-333.

Cheng C.M., Mervis R.F., Niu S.L., Salem N. Jr., Witters L.A., Tseng V., Reinhardt R., Bondy C.A. Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth // *J. Neurosci. Res.* 2003. – V. 73, № 1. – P. 1-9.

Chiaruttini C., Sonogo M., Baj G., Simonato M., Tongiorgi E. BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2008. – V. 37. – P. 11-19.

Chiaruttini C., Vicario A., Li Z., Baj G., Braiuca P., Wu Y., Lee F.S., Gardossi L., Baraban J.M., Tongiorgi E. Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106. – P. 16481-16486.

Christie M.J. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction // *Br. J. Pharmacol.* 2008 – V. 154, № 2. – P. 384-396.

Chu N.N., Zuo Y.F., Meng L., Lee D.Y., Han J.S., Cui C.L. Peripheral electrical stimulation reversed the cell size reduction and increased BDNF level in the ventral tegmental area in chronic morphine-treated rats // *Brain Res.* – 2007. – V. 1182. – P. 90-98.

Colliva A., Tongiorgi E. Distinct role of 5'UTR sequences in dendritic trafficking of BDNF mRNA: additional mechanisms for the BDNF splice variants spatial code // *Mol. Brain.* – 2021. – V. 14, № 1. – P. 10.

- Conner J.M., Lauterborn J.C., Yan Q., Gall C.M., Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport // *J. Neurosci.* – 1997. – V. 17, № 7. – P. 2295-2313.
- Connor M., Christie M.J. Opioid receptor signaling mechanisms // *Clin. Exp. Physiol. Pharmacol.* – 1999. – V. 26. – P. 493–499.
- Contestabile A. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – V. 84, № 4. – P. 317-328.
- Cossenza M., Socodato R., Portugal C.C., Domith I.C., Gladulich L.F., Encarnação T.G., Calaza K.C., Mendonça H.R., Campello-Costa P., Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects // *Vitam. Horm.* – 2014. – V. 96. – P. 79-125.
- Costa M.A., Girard M., Dalmay F., Malauzat D. Brain-derived neurotrophic factor serum levels in alcohol-dependent subjects 6 months after alcohol withdrawal // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2011. – V. 35, № 11. – P. 1966-1973.
- Cowansage K.K., LeDoux J.E., Monfils M.H. Brain-derived neurotrophic factor; a dynamic gatekeeper of neural plasticity // *Curr. Mol. Pharmacol.* – 2010. – V. 3. – P. 12–29.
- Cuellar B., Fernández A.P., Lizasoain I., Moro M.A., Lorenzo P., Bentura M.L., Rodrigo J., Leza J.C. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal // *Psychopharmacology.* – 2000. – V. 148. – P. 66–73.
- Cui X., Chopp M., Zacharek A., Ning R., Ding X., Roberts C., Chen J. Endothelial nitric oxide synthase regulates white matter changes via the BDNF/TrkB pathway after stroke in mice // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 11. – P. e80358.
- Cuitavi J., Hipólito L., Canals M. The Life Cycle of the Mu-Opioid Receptor // *Trends Biochem. Sci.* 2021. – V. 46, № 4. – P. 315-328.
- Dacher M., Nugent F.S. Opiates and plasticity // *Neuropharmacology.* – 2011. – V. 61, № 7. – P. 1088-1096.

- Dahchour A., Ward R.J. Changes in Brain Dopamine Extracellular Concentration after Ethanol Administration; Rat Microdialysis Studies // *Alcohol Alcohol.* – 2022. –V. 57, № 2. – P. 165-175.
- Dambisya Y.M., Lee T.L. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. – V. 117. – P. 914-918.
- Darcq E., Morisot N., Phamluong K., Warnault V., Jeanblanc J., Longo F.M., Massa S.M., Ron D. The Neurotrophic Factor Receptor p75 in the Rat Dorsolateral Striatum Drives Excessive Alcohol Drinking // *J. Neurosci.* – 2016. – V. 36, № 39. – P. 10116-10127.
- Davis M.I. Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers // *Pharmacol. Ther.* – 2008. – V. 118, № 1. – P. 36-57.
- de Cid R, Fonseca F, Gratacòs M, Gutierrez F, Martín-Santos R, Estivill X, Torrens M. BDNF variability in opioid addicts and response to methadone treatment: preliminary findings // *Genes Brain Behav.* – 2008. – V. 7, № 5. – P. 515-522.
- De Oliveira C.L., Del Bel E.A., Guimarães F.S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1997. – V. 56, № 1. – P. 55-59.
- De Vries T.J., Shippenberg T.S. Neural systems underlying opiate addiction // *J. Neurosci.* – 2002. – V.22, № 9. – P. 3321-3325.
- Dehpour A.R., Sadr S.S., Nouroddini M., Shadan F., Nourozi A., Farahani M., Sahebgharani M. Comparison of simultaneous administration of lithium with L-NAME or L-arginine on morphine withdrawal syndrome in mice // *Hum. Psychopharmacol.* – 2000. – V. 15. – P. 87-93.
- Deng L., Chu Z., Li B., Liu P., Lei G., Yang L., Zhang L., Li S., Wang Y., Dang Y. BDNF-AAV has protective effects on morphine-induced conditioned place preference through BDNF, TrkB, and CREB concentration changes in the VTA and NAc // *Neurosci. Lett.* – 2022. V. 782. – P. 136701.
- Dieni S., Matsumoto T., Dekkers M., Rauskolb S., Ionescu M.S., Deogracias R., Gundelfinger E.D., Kojima M., Nestel S., Frotscher M., Barde Y.A. BDNF and its pro-

peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons // *J. Cell. Biol.* – 2012. V. 196, № 6. – P. 775-88.

Deltheil T., Guiard B.P., Cerdan J., David D.J., Tanaka K.F., Repérant C., Guilloux J.P., Coudoré F., Hen R., Gardier A.M. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice // *Neuropharmacology.* – 2008. – V. 55, № 6. – P. 1006-1014.

Dhakshinamoorthy S., Sridharan S.R., Li L., Ng P.Y., Boxer L.M., Porter A.G. Protein/DNA arrays identify nitric oxide-regulated cis-element and trans-factor activities some of which govern neuroblastoma cell viability // *Nucleic. Acids. Res.* – 2007. – V. 35, № 16. – P. 5439-5451.

Doyle M.A., Mazei-Robison M.S. Opioid-Induced Molecular and Cellular Plasticity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2021. – V. 11, № 2. – P. a039362.

Duclot F., Kabbaj M. Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression // *J. Neurosci.* – 2013. – V. 33, № 27. 11048-11060.

Dum J., Bläsig J., Herz A. Buprenorphine: demonstration of physical dependence liability // *Eur. J. Pharmacol.* – 1981. – V. 70, № 3. – P. 293-300.

Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu B., Weinberger D.R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // *Cell.* – 2003. – V. 112, № 2. – P. 257-269.

Egervari G., Siciliano C.A., Whiteley E.L., Ron D. Alcohol and the brain: from genes to circuits // *Trends. Neurosci.* – 2021. – V. 44, № 12. – P. 1004-1015.

Ehinger Y., Phamluong K., Darevesky D., Welman M., Moffat J.J., Sakhai S.A., Whiteley E.L., Berger A.L., Laguesse S., Farokhnia M., Leggio L., Lordkipanidzé M., Ron D.

Differential correlation of serum BDNF and microRNA content in rats with rapid or late onset of heavy alcohol use // *Addict. Biol.* – 2021. – V. 26, № 2. – P. e12890.

Eipper-Mains J.E., Kiraly D.D., Palakodeti D., Mains R.E., Eipper B.A., Graveley B.R. microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs // *RNA.* – 2011. – V. 17, № 8. – P. 1529-1543.

Eisch A.J., Barrot M., Schad C.A., Self D.W., Nestler E.J. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2000. – V. 97. – P.7579–7584.

Ernst A.F., Gallo G., Letourneau P.C., McLoon S.C. Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20, № 4. – P. 1458-1469.

Esvald E.E., Tuvikene J., Moistus A., Rannaste K., Kõomägi S., Timmusk T. Differential Regulation of the BDNF Gene in Cortical and Hippocampal Neurons // *J Neurosci.* – 2022. – V. 42, № 49. – P. 9110-9128.

Evans C.J., Cahill C.M. Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability // *F1000Res.* – 2016 – V. 5.

Fasanaro P., Greco S., Lorenzi M., Pescatori M., Brioschi M., Kulshreshtha R., Banfi C., Stubbs A., Calin G.A., Ivan M., Capogrossi M.C., Martelli F. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210 // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284, № 50. – P. 35134-35143.

Fein G., Di Sclafani V., Cardenas V.A., Goldmann H., Tolou-Shams M., Meyerhoff D.J. Cortical gray matter loss in treatment naive alcohol dependent individuals. // *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* – 2002. –Vol. 26. – P. 558–564.

Fields H. State-dependent opioid control of pain // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2004. V. 5, № 7. – P. 565-575.

Fields H.L., Margolis E.B. Understanding opioid reward // *Trends. Neurosci.* – 2015. – V. 38. – P. 217-225.

- Fitzgerald L.W., Ortiz J., Hamedani A.G., Nestler E.J. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents // *J. Neurosci.* 1996. – V. 16, № 1. – P. 274-282.
- Flavell S.W., Greenberg M.E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2008. – V. 31. – P. 563-590.
- Florence C., Luo F., Rice K. The economic burden of opioid use disorder and fatal opioid overdose in the United States, 2017 // *Drug. Alcohol. Depend.* – 2021. – V. 218. – P. 108350.
- Fukuchi M., Tsuda M. Involvement of the 3'-untranslated region of the brain-derived neurotrophic factor gene in activity-dependent mRNA stabilization // *J Neurochem.* – 2010. – V. 115, № 5. – P. 1222-1233.
- Funada M., Shippenberg T.S. Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the expression of morphine withdrawal signs in rats // *Behav Pharmacol.* – 1996. – V. 7, № 5. – P. 448-453.
- Gallego X., Cox R., Funk E., Foster R., Ehringer M. Voluntary exercise decreases ethanol preference and consumption in C57BL/6 adolescent mice: sex differences and hippocampal BDNF expression // *Physiol. Behav.* – 2015. V. 138. – P. 28–36.
- Gallo E.F., Iadecola C. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, № 19. – P. 6947-6955.
- Gao Q., Yang T., Li X.X., Xiong J.W., Ma W., Xu Y.M., Liu Y., Zhang H.Y., Wang Q.Y., Wang H.X., Peng Y., Zhu X.F., Guan Y.Z., Nitric oxide signaling pathway in ventral tegmental area is involved in regulation of 7,8-dihydroxyflavone on alcohol consumption in rats // *Mol. Neurobiol.* – 2022. – V. 59. – P. 35-46.

- Gao X., Smith G.M., Chen J. Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling // *Exp. Neurol.* – 2009 – V. 215. – P. 178–190.
- García-Pérez D., López-Bellido R., Hidalgo J.M., Rodríguez R.E., Laorden M.L., Núñez C., Milanés M.V. Morphine regulates Argonaute 2 and TH expression and activity but not miR-133b in midbrain dopaminergic neurons // *Addict. Biol.* – 2015. – V. 20, № 1. – P. 104-19. (6)
- García-Pérez D., Sáez-Belmonte F., Laorden M.L., Núñez C., Milanés M.V. Morphine administration modulates expression of Argonaute 2 and dopamine-related transcription factors involved in midbrain dopaminergic neurons function // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 168, № 8. – P. 1889-1901. (a)
- Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – V. 27. – P. 2783–2802.
- Garthwaite J., Boulton C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system // *Annu. Rev. Physiol.* – 1995. – V. 57. – P. 683-706.
- GBD 2016., Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *Lancet.* – 2017. – V. 390. – P. 1211-1259.
- Geoffroy H., Noble F. BDNF During Withdrawal // *Vitam. Horm.* – 2017. – V. 104. P. 475-496.
- George O., Sanders C., Freiling J., Grigoryan E., Vu S., Allen C.D., Crawford E., Mandym C.D., Koob G.F. Recruitment of medial prefrontal cortex neurons during alcohol withdrawal predicts cognitive impairment and excessive alcohol drinking // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2012. – V. 109. – P. 18156-18161.
- Ghazalpour A., Bennett B., Petyuk V.A., Orozco L., Hagopian R., Mungrue I.N., Farber C.R., Sinsheimer J., Kang H.M., Furlotte N., Park C.C., Wen P.Z., Brewer H., Weitz K.,



- Camp D.G. 2nd, Pan C., Yordanova R., Neuhaus I., Tilford C., Siemers N., Gargalovic P., Eskin E., Kirchgessner T., Smith D.J., Smith R.D., Luskis A.J. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse // *PLoS Genet.* – 2011. V. 7, № 6. – P. e1001393.
- Girard M., Labrunie A., Malauzat D., Nubukpo P. Evolution of BDNF serum levels during the first six months after alcohol withdrawal // *World. J. Biol. Psychiatry.* – 2020. – V. 21, № 10. – P. 739-747.
- Glass M.J., Lane D.A., Colago E.E., Chan J., Schlussman S.D., Zhou Y., Kreek M.J., Pickel V.M. Chronic administration of morphine is associated with a decrease in surface AMPA GluR1 receptor subunit in dopamine D1 receptor expressing neurons in the shell and non-D1 receptor expressing neurons in the core of the rat nucleus accumbens // *Exp. Neurol.* – 2008. – V. 210, № 2. – P. 750-761.
- Glisovic T., Bachorik J.L., Yong J., Dreyfuss G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation // *FEBS Lett.* – 2008. – V. 582, № 14. – P. 1977-1986.
- Gorini G., Nunez Y.O., Mayfield R.D. Integration of miRNA and protein profiling reveals coordinated neuroadaptations in the alcohol-dependent mouse brain // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 12. – P. e82565.
- Gray K., Ellis V. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin // *FEBS Lett.* – 2008. – V. 582, № 6. – P. 907-910.
- Greenberg M.E., Xu B., Lu B., Hempstead B.L. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29, № 41. – P. 12764-12757.
- Greenwald M.K., Steinmiller C.L., Sliwerska E., Lundahl L., Burmeister M. BDNF Val(66) Met genotype is associated with drug-seeking phenotypes in heroin-dependent individuals: a pilot study // *Addict. Biol.* – 2012 – V. 18. – P. 836-845.
- Grisham M.B., Johnson G.G., Lancaster J.R. Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids // *Methods Enzymol.* – 1996. – V. 268. – P. 237-246.

- Gu Z., Kaul M., Yan B., Kridel S.J., Cui J., Strongin A., Smith J.W., Liddington R.C., Lipton S.A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death // *Science*. – 2002. – V. 297, № 5584. – P. 1186-1190.
- Guiard B.P., El Mansari M., Blier P. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus // *Mol. Pharmacol.* – 2008 – V. 74, № 5 – P. 1463-1475.
- Han C., Bae H., Won S.D., Roh S., Kim D.J. The relationship between brain-derived neurotrophic factor and cognitive functions in alcohol-dependent patients: a preliminary study // *Ann. Gen. Psychiatry*. – 2015. – V. 14. – P. 30.
- Han M.H., Bolaños C.A., Green T.A., Olson V.G., Neve R.L., Liu R.J., Aghajanian G.K., Nestler E.J. Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors // *J. Neurosci.* 2006 – V. 26, № 17. – P. 4624-4629.
- Hariri A.R., Goldberg T.E., Mattay V.S., Kolachana B.S., Callicott J.H., Egan M.F., Weinberger D.R. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23, № 17. – P. 6690-6694.
- Harper C., Kril J. Brain atrophy in chronic alcoholic patients: a quantitative pathological study // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. – 1985. – V. 48. – P. 211–217.
- Harris G.C., Aston-Jones G. Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome // *Nature*. – 1994. – V. 371, № 6493. – P. 155-157.
- Hassanipour M., Rajai N., Rahimi N., Fatemi I., Jalali M., Akbarian R., Shahabaddini A., Nazari A., Amini-Khoei H., Dehpour A.R. Sumatriptan effects on morphine-induced antinociceptive tolerance and physical dependence: The role of nitric oxide // *Eur. J. Pharmacol.* – 2018. – V. 835. – P. 52-60.

- Hatami H., Oryan S., Semnanian S., Kazemi B., Bandepour M., Ahmadiani A. Alterations of BDNF and NT-3 genes expression in the nucleus paragigantocellularis during morphine dependency and withdrawal // *Neuropeptides*. – 2007. – V. 41, № 5. – P. 321-328.
- Haun H.L., Griffin W.C., Lopez M.F., Solomon M.G., Mulholland P.J., Woodward J.J., McGinty J.F., Ron D., Becker H.C. Increasing Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in medial prefrontal cortex selectively reduces excessive drinking in ethanol dependent mice // *Neuropharmacology*. – 2018. – V. 140. – P. 35-42.
- Hauser S.R., Getachew B., Taylor R.E., Tizabi Y. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2011. – V. 100. – P. 253-258.
- He Y., Yang C., Kirkmire C.M., Wang Z.J. Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30, № 30. – P. 10251-10258.
- Heberlein A., Dürsteler-MacFarland K.M., Lenz B. et al. Serum levels of BDNF are associated with craving in opiate-dependent patients // *J. Psychopharmacol.* – 2011. – V. 25. – P. 1480-1484.
- Heberlein A., Muschler M., Wilhelm J., Frieling H., Lenz B., Gröschl M., Kornhuber J., Bleich S., Hillemecher T. BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. – 2010. – V. 34, № 6. – P. 1060-1064.
- Heidari M.H., Amini A., Bahrami Z., Shahriari A., Movafag A., Heidari R. Effect of Chronic Morphine Consumption on Synaptic Plasticity of Rat's Hippocampus: A Transmission Electron Microscopy Study // *Neurol. Res. Int.* – 2013. – P. 290414.
- Heilig M., Egli M., Crabbe J.C., Becker H.C. Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? // *Addict. Biol.* – 2010. – V. 15, № 2. – P. 169-184.

- Heldt S.A., Stanek L., Chhatwal J.P., Ressler K.J. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories // *Mol. Psychiatry*. – 2007. – V. 12, № 7. – P. 656-670.
- Hempstead B.L. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2015. – V. 126. – P. 9-19.
- Hensler J.G., Ladenheim E.E., Lyons W.E. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 85. – P. 1139-1147.
- Heyer M.P., Kenny P.J. Corticostriatal microRNAs in addiction // *Brain Res.* – 2015. – V. 1628. – P. 2-16.
- Hodgson S.R., Hofford R.S., Norris C.J., Eitan S. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during naloxone-precipitated morphine withdrawal // *Behav. Pharmacol.* – 2008. – V. 19, № 8. – P. 805-811.
- Hofer M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J., Barde Y.A. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain // *EMBO J.* – 1990. – V. 9, № 8. – P. 2459-2464.
- Holm M.M., Nieto-Gonzalez J.L., Vardya I., Vaegter C.B., Nykjaer A., Jensen K. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29, № 40. – P. 12412-12418.
- Hou H., Qing Z., Jia S., Zhang X., Hu S., Hu J. Influence of brain-derived neurotrophic factor (val66met) genetic polymorphism on the ages of onset for heroin abuse in males // *Brain Res.* – 2010. – V.1353. – P. 245-248.
- Houshmand G., Pourasghar M., Shiran M., Arab Firozjae A., Goudarzi M., Manouchehr F., Shirzad S., Assadpour S., Nikbakht J., Ghorbanzadeh B. Simvastatin prevents morphine antinociceptive tolerance and withdrawal symptoms through antioxidative effect and nitric oxide pathway in mice // *Behav. Brain. Res.* – 2021. – V. 402. – P. 113104.

- Hsieh H.Y., Robertson C.L., Vermehren-Schmaedick A., Balkowiec A. Nitric oxide regulates BDNF release from nodose ganglion neurons in a pattern-dependent and cGMP-independent manner // *J. Neurosci. Res.* – 2010. – V. 88, № 6. – P. 1285-1297.
- Hu X.M., Cao S.B., Zhang H.L., Lyu D.M., Chen L.P., Xu H., Pan Z.Q., Shen W. Downregulation of miR-219 enhances brain-derived neurotrophic factor production in mouse dorsal root ganglia to mediate morphine analgesic tolerance by upregulating CaMKII $\gamma$  // *Mol. Pain.* – 2016. – V. 12. – P. 1744806916666283.
- Huang M.C., Chen C.H., Chen C.H. et al. Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal // *Alcohol Alcohol.* – 2008. – Vol. 43. – P. 241-245.
- Hwang J.J., Park M.H., Choi S.Y., Koh J.Y. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, № 12. – P. 11995-12001.
- Iadecola C, Xu X, Zhang F, Hu J, el-Fakahany EE. Prolonged inhibition of brain nitric oxide synthase by short-term systemic administration of nitro-L-arginine methyl ester // *Neurochem. Res.* – 1994. – V. 19, № 4. – P. 501-505.
- Im H.I., Hollander J.A., Bali P., Kenny P.J. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212 // *Nat. Neurosci.* – 2010. – V. 13. – P. 1120-1127.
- Im H.I., Kenny P.J. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction // *Trends Neurosci.* – 2012. – V. 35, № 5. – P. 325-334.
- Ito W., Chehab M., Thakur S., Li J., Morozov A. BDNF-restricted knockout mice as an animal model for aggression // *Genes. Brain. Behav.* – 2011. – V. 10, № 3. – P. 365-374.
- Jang S.W., Liu X., Yepes M., Shepherd K.R., Miller G.W., Liu Y., Wilson W.D., Xiao G., Blanchi B., Sun Y.E., Ye K. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – V. 107, № 6. – P. 2687-2692.

- Jeanblanc J., Coune F., Botia B., Naassila M. Brain-derived neurotrophic factor mediates the suppression of alcohol self-administration by memantine // *Addict. Biol.* – 2014. – V. 19. – P. 758-769.
- Jeanblanc J., He D.Y., Carnicella S., Kharazia V., Janak P.H., Ron D. Endogenous BDNF in the dorsolateral striatum gates alcohol drinking // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29. – P. 13494-13502
- Jeanblanc J., Logrip M.L., Janak P.H., Ron D. BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis // *Eur. J. Neurosci.* – 2013. – V. 37. – P. 607-612.
- Jimenez-Gonzalez A., García-Concejo A., López-Benito S., Gonzalez-Nunez V., Arévalo J.C., Rodriguez R.E. Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of Bdnf in zebrafish embryos // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2016. – V. 1860, № 6. 1308-1316.
- Jin T., Zhang H., Yang Q., Li L., Ouyang Y., Yang M., Wang F., Wang Z., Zhang J., Yuan D. The relationship between polymorphisms of BDNFOS and BDNF genes and heroin addiction in the Han Chinese population / *J. Gene Med.* – 2016. – V. 18, № 10. – P. 288-293.
- Joe K.H., Kim Y.K., Kim T.S. et al. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2007. – Vol. 31. – P. 1833-1838.
- Jorjani H., Joneidi M., Vafaei A.A., Rashidy-Pour A., Sameni H., Bandegi A.R., Yousefi B., Miladi-Gorji H. Microinjection of the BDNF receptor antagonist ANA-12 into the nucleus accumbens and medial-prefrontal cortex attenuates morphine-induced reward memory, and alterations of BDNF levels and apoptotic cells in rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2021. – V. 201. – P. 173111.

- Ju Y.Y., Long J.D., Liu Y., Liu J.G. Formation of aversive memories associated with conditioned drug withdrawal requires BDNF expression in the amygdala in acute morphine-dependent rats // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2015. – V. 36, № 12. – P. 1437-1443.
- Kabir Z.D., Katzman A.C., Kosofsky B.E. Molecular mechanisms mediating a deficit in recall of fear extinction in adult mice exposed to cocaine in utero // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 12. – P. e84165.
- Kalivas P.W., O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity // *Neuropsychopharmacology.* – 2008. – V. 33. – P. 166-180.
- Kang H., Welcher A.A., Shelton D., Schuman E.M. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation // *Neuron.* – 1997. – V. 19, № 3. – P. 653-664.
- Karmohapatra S.K., Chakraborty K., Kahn N.N., Sinha A.K. The role of nitric oxide in aspirin induced thrombolysis in vitro and the purification of aspirin activated nitric oxide synthase from human blood platelets // *Am. J. Hematol.* – 2007. – V. 82, № 11. – P. 986-995.
- Karpova N.N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* – 2014. – V. 76. – P. 709-718.
- Katoh-Semba R., Takeuchi I.K., Semba R., Kato K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain // *J. Neurochem.* – 1997. – V. 69, № 1. – P. 34-42.
- Kauer J.A., Malenka R.C. Synaptic plasticity and addiction // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – V. 8. – P. 844-858.
- Kethawath S.M., Jain R., Dhawan A., Sarkar S. A review of peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in alcohol-dependent patients: Current understanding // *Indian J. Psychiatry.* – 2020. – V. 62, № 1. – P. 15-20.
- Khalil-Khalili M., Rashidy-Pour A., Bandegi A.R., Yousefi B., Jorjani H., Miladi-Gorji H. Effects of BDNF receptor antagonist on the severity of physical and psychological

dependence, morphine-induced locomotor sensitization and the ventral tegmental area-nucleus accumbens BDNF levels in morphine-dependent and withdrawn rats // *Neurosci. Lett.* – 2018. – V. 668. – P. 7-12.

Kimes A.S., Vaupel D.B., London E.D. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase // *Psychopharmacology (Berl.)* – 1993. – V. 112. – P. 521-524.

Köhler S., Klimke S., Hellweg R., Lang U.E. Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations change after alcohol withdrawal: preliminary data of a case-control comparison // *Eur. Addict. Res.* – 2013. – Vol. 19. – P. 98-104.

Kolarow R., Kuhlmann C.R., Munsch T., Zehendner C., Brigadski T., Luhmann H.J., Lessmann V. BDNF-induced nitric oxide signals in cultured rat hippocampal neurons: time course, mechanism of generation, and effect on neurotrophin secretion // *Front. Cell. Neurosci.* – 2014. – V. 8. – P. 323.

Koo J.W., Lobo M.K., Chaudhury D., Labonté B., Friedman A., Heller E., Peña C.J., Han M.H., Nestler E.J. Loss of BDNF signaling in D1R-expressing NAc neurons enhances morphine reward by reducing GABA inhibition // *Neuropsychopharmacology.* – 2014. – V. 39. – P. 2646-2653.

Koo J.W., Mazei-Robison M.S., Chaudhury D., Juarez B., LaPlant Q., Ferguson D., Feng J., Sun H., Scobie K.N., Damez-Werno D., Crumiller M., Ohnishi Y.N., Ohnishi Y.H., Mouzon E., Dietz D.M., Lobo M.K., Neve R.L., Russo S.J., Han M.H., Nestler E.J. BDNF is a negative modulator of morphine action // *Science.* – 2012. – V. 338, № 6103. – P. 124-128.

Koo J.W., Mazei-Robison M.S., LaPlant Q., Egervari G., Braunscheidel K.M., Adank D.N., Ferguson D., Feng J., Sun H., Scobie K.N., Damez-Werno D.M., Ribeiro E., Peña C.J., Walker D., Bagot R.C., Cahill M.E., Anderson S.A., Labonté B., Hodes G.E., Browne H., Chadwick B., Robison A.J., Vialou V.F, Dias C., Lorsch Z., Mouzon E., Lobo M.K., Dietz D.M., Russo S.J., Neve R.L., Hurd Y.L., Nestler E.J. Epigenetic basis of opiate



suppression of Bdnf gene expression in the ventral tegmental area // *Nat. Neurosci.* – 2015. – V. 18. – P. 415-422.

Koob G.F. Drug Addiction: Hyperkatifeia/Negative Reinforcement as a Framework for Medications Development // *Pharmacol. Rev.* – 2021. – V.73, № 1. – P. 163-201.

Koob G.F. Neurobiology of Opioid Addiction: Opponent Process, Hyperkatifeia, and Negative Reinforcement // *Biol. Psychiatry.* – 2020. – V. 87, № 1. – 44-53.

Koob G.F., Volkow N.D. Neurocircuitry of addiction // *Neuropsychopharmacology.* – 2010. – V. 35. – P. 217-238.

Koppel I., Jaanson K., Klasche A., Tuvikene J., Tiirik T., Pärn A., Timmusk T. Dopamine cross-reacts with adrenoreceptors in cortical astrocytes to induce BDNF expression, CREB signaling and morphological transformation // *Glia.* – 2018. – V. 66. – P. 206-216.

Koppel I., Tuvikene J., Lekk I., Timmusk T. Efficient use of a translation start codon in BDNF exon I // *J. Neurochem.* – 2015. – V. 134, № 6. – P. 1015-1025.

Korpi E.R., den Hollander B., Farooq U., Vashchinkina E., Rajkumar R., Nutt D.J., Hyytiä P., Dawe G.S. Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse // *Pharmacol. Rev.* – 2015. – V. 67, № 4. – P. 872-1004.

Korte M., Carroll P., Wolf E., Brem G., Thoenen H., Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92, № 19. – P. 8856-8860.

Korte M., Kang H., Bonhoeffer T., Schuman E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation // *Neuropharmacology.* – 1998. – V. 37, № 4-5. – P. 553-559.

Koshimizu H., Matsuoka H., Nakajima Y., Kawai A., Ono J., Ohta K.I., Miki T., Sunagawa M., Adachi N., Suzuki S. Brain-derived neurotrophic factor predominantly regulates the expression of synapse-related genes in the striatum: Insights from in vitro transcriptomics // *Neuropsychopharmacol. Rep.* – 2021. – V. 41(4). – P. 485-495.

- Koskela M., Bäck S., Vöikar V., Richie C.T., Domanskyi A., Harvey B.K., Airavaara M. Update of neurotrophic factors in neurobiology of addiction and future directions // *Neurobiol. Dis.* – 2017. – V. 97. – P. 189-200.
- Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2018. – V. 38, № 3. – P. 579-593.
- Kreek M.J, Koob G.F. Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways // *Drug. Alcohol. Depend.* – 1998. – V. 51. – P. 23-47.
- Kudla L., Przewlocki R. Influence of G protein-biased agonists of  $\mu$ -opioid receptor on addiction-related behaviors // *Pharmacol. Rep.* – 2021. – V. 73, № 4. – P. 1033-1051.
- Kumar A., Varendi K., Peränen J., Andressoo J.O. Tristetraprolin is a novel regulator of BDNF // *Springerplus.* – 2014. – V. 3. – P. 502.
- Kumar S., Bhargava H., Time course of the changes in central nitric oxide synthase activity following chronic treatment with morphine in the mouse: reversal by naltrexone // *Gen. Pharmacol.* – 1997. – V. 29. – P. 223-227.
- Kuntz-Melcavage K.L., Brucklacher R.M., Grigson P.S., Freeman W.M., Vrana K.E. Gene expression changes following extinction testing in a heroin behavioral incubation model // *BMC Neurosci.* – 2009. – V. 10. – P. 95.
- Kurauchi Y., Hisatsune A., Isohama Y., Sawa T., Akaike T., Shudo K., Katsuki H. Midbrain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF // *J. Neurochem.* – 2011. – V. 116, № 3. – P. 323-333.
- Kutlu M.G., Gould T.J. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction // *Learn. Mem.* – 2016. – V. 23, № 10. – P. 515-533.
- Lai K.O., Wong A.S., Cheung M.C., Xu P., Liang Z., Lok K.C., Xie H., Palko M.E., Yung W.H., Tessarollo L., Cheung Z.H., Ip N.Y. TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for

- activity-dependent structural plasticity and spatial memory // *Nat. Neurosci.* – 2012. – V. 15, № 11. – P. 1506-1515.
- Le Merrer J., Becker J.A., Befort K., Kieffer B.L. Reward processing by the opioid system in the brain // *Physiol. Rev.* – 2009. V. 89, № 4. – P. 1379-1412.
- Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins // *Science.* – 2001. – V. 294, № 5548. – P. 1945-1948.
- Lee S.T., Chu K., Jung K.H., Kim J.H., Huh J.Y., Yoon H., Park D.K., Lim J.Y., Kim J.M., Jeon D., Ryu H., Lee S.K., Kim M., Roh J.K. miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model // *Ann. Neurol.* – 2012. – V. 72, № 2. – P. 269-277.
- Lei B., Adachi N., Nagaro T., Arai T. Measurement of total nitric oxide metabolite (NO(x)(-)) levels in vivo // *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* – 1999. – V. 4, № 3. – P. 415-419.
- Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde Y.A. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor // *Nature.* – 1989. – V. 341, № 6238. – P. 149-152.
- Lekk I., Cabrera-Cabrera F., Turconi G., Tuvikene J., Esvald E.E., Rähni A., Casserly L., Garton D.R., Andressoo J.O., Timmusk T., Koppel I. Untranslated regions of brain-derived neurotrophic factor mRNA control its translatability and subcellular localization // *J. Biol. Chem.* – 2023. – V. 299, № 2. –P. 102897.
- Lemos Duarte M., Devi L.A. Post-translational Modifications of Opioid Receptors // *Trends Neurosci.* – 2020– V. 43, № 6. – P. 417-432.
- Lewohl J.M., Nunez Y.O., Dodd P.R., Tiwari G.R., Harris R.A., Mayfield R.D. Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2011. – V. 35, № 11. – P. 1928-1937.
- Leza J.C., Lizasoain I., Cuellar B. Moro M.A., Lorenzo P. Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal // *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* – 1996. – V. 353. – P. 349-354.

- Leza J.C., Lizasoain I., San-Martin-Clark O., Lorenzo P. Morphine-induced changes in cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity // *Eur. J. Pharmacol.* – 1995. – V. 285. – P. 95-98.
- Li H., Tao R., Wang J., Xia L. Upregulation of miR-375 level ameliorates morphine analgesic tolerance in mouse dorsal root ganglia by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway // *J. Pain. Res.* – 2017. – V. 10. – P. 1279-1287.
- Li J., Li J., Liu X., Qin S., Guan Y., Liu Y., Cheng Y., Chen X., Li W., Wang S., Xiong M., Kuzhikandathil E.V., Ye J.H., Zhang C. MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-382 is a critical novel gene of alcohol addiction // *EMBO Mol. Med.* – 2013. – V. 5, № 9. – P. 1402-1414.
- Li L.Y., Chang K.J. The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors // *Mol. Pharmacol.* 1996. – V. 50, № 3. – P. 599-602.
- Li X.X., Yang T., Wang N., Zhang L.L., Liu X., Xu Y.M., Gao Q., Zhu X.F., Guan Y.Z. 7,8-Dihydroxyflavone attenuates alcohol-related behavior in rat models of alcohol consumption via TrkB in the ventral tegmental area // *Front. Neurosci.* – 2020. – V. 14. – P. 467.
- Li Y., Li S., Yan J., Wang D., Yin R., Zhao L., Zhu Y., Zhu X. miR-182 (microRNA-182) suppression in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2016. – V. 65. – P. 96-103.
- Li Y., Wang H., Niu L., Zhou Y. Chronic morphine exposure alters the dendritic morphology of pyramidal neurons in visual cortex of rats // *Neurosci. Lett.* – 2007. – V. 418. – P. 227-231.
- Li Y., Xia B., Li R., Yin D., Wang Y., Liang W. Expression of brain-derived neurotrophic factors, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 in the nucleus accumbens during heroin dependency and withdrawal // *Neuroreport.* – 2017. – V. 28, № 11. – P. 654-660.

- Liang D.Y., Clark J.D. Modulation of the NO/CO-cGMP signaling cascade during chronic morphine exposure in mice // *Neurosci. Lett.* – 2004. – V. 365. – P. 73-77.
- Liao D., Grigoriants O.O., Wang W., Wiens K., Loh H.H., Law P.Y. Distinct effects of individual opioids on the morphology of spines depend upon the internalization of mu opioid receptors // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2007. – V. 35, № 3. – P. 456-469.
- Liao D., Lin H., Law P.Y., Loh H.H. Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P. 1725-1730.
- Licata S.C., Shinday N.M., Huizenga M.N., Darnell S.B., Sangrey G.R., Rudolph U., Rowlett J.K., Sadri-Vakili G. Alterations in brain-derived neurotrophic factor in the mouse hippocampus following acute but not repeated benzodiazepine treatment // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 12. – P. e84806.
- Lim C.S., Alkon D.L. Protein kinase C stimulates HuD-mediated mRNA stability and protein expression of neurotrophic factors and enhances dendritic maturation of hippocampal neurons in culture // *Hippocampus.* – 2012. – V. 22. – P. 2303-2319.
- Liran M., Rahamim N., Ron D., Barak S. Growth Factors and Alcohol Use Disorder // *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* – 2020. – V. 10, № 12. – P. a039271.
- Liu C., Chan C.B., Ye K. 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders // *Transl. Neurodegener.* – 2016. – V.5. – P. 2.
- Liu W.T., Han Y., Liu Y.P., Song A.A, Barnes B, Song XJ. Spinal matrix metalloproteinase-9 contributes to physical dependence on morphine in mice // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30, № 22. – P. 7613-7623.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods* – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-408.
- Logrip M., Janak P., Ron D. Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression // *J. Neurochem.* – 2009. – V. 109. – P. 1459–1468.

- Logrip M.L., Barak S., Warnault V., Ron D. Corticostriatal BDNF and alcohol addiction // *Brain Res.* – 2015. – V. 1628. – P. 60-67.
- Loya C.M., Van Vactor D., Fulga T.A. Understanding neuronal connectivity through the post-transcriptional toolkit // *Genes Dev.* – 2010. – V. 24. – P. 625-635.
- Lu L., Dempsey J., Liu S.Y., Bossert J.M., Shaham Y. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24, № 7. – P. 1604-1611.
- Lu B., Pang P.T., Woo N.T. The yin and yang of neurotrophin action // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – V. 6. – P. 604-614.
- Luan X., Tao J., Zhang J., Xie Y., Zhang X., Su H., He J. Increased BDNF may not be associated with cognitive impairment in heroin-dependent patients // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – V. 96, № 15. – P. e6582.
- Lubin F.D., Roth T.L., Sweatt J.D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28, № 42. – P. 10576-10586.
- Lunden J.W., Kirby L.G. Opiate exposure and withdrawal dynamically regulate mRNA expression in the serotonergic dorsal raphe nucleus // *Neuroscience* – 2013. – V. 254. – P. 160-172.
- Lüscher C., Malenka R.C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling // *Neuron*. – 2011. – V. 69, № 4. – P. 650-663.
- Lyons W.E., Mamounas L.A., Ricaurte G.A., Coppola V., Reid S.W., Bora S.H., Wihler C., Koliatsos V.E., Tessarollo L. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96, № 26. – P. 15239-15244.
- Mahmoodi M., Shahidi S., Hashemi-Firouzi N. Effects of phosphodiesterase type 5 inhibitions on morphine withdrawal symptoms in mice // *Psicothema*. – 2014. – P. 26, № 4. – P. 511-515.

- Majeed N.H., Przewłocka B., Machelska H., Przewłocki R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice // *Neuropharmacology*. – 1994. – V. 33. – P. 189-192.
- Maldonado R., Stinus L., Gold L.H., Koob G.F. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1992. – V. 261, № 2 – P. 669-677.
- Mansouri M.T., Naghizadeh B., Ghorbanzadeh B., Alboghobeish S., Amirgholami N., Houshmand G., Cauli O. Venlafaxine prevents morphine antinociceptive tolerance: The role of neuroinflammation and the l-arginine-nitric oxide pathway // *Exp. Neurol.* – 2018. – V. 303. – P. 134-141.
- Mansouri M.T., Naghizadeh B., Ghorbanzadeh B., Alboghobeish S., Houshmand G., Amirgholami N. Venlafaxine Attenuates the Development of Morphine Tolerance and Dependence: Role of L-Arginine/Nitric Oxide/cGMP Pathway // *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.* – 2018. – V. 18, № 4. – 362-370.
- Mansouri M.T., Naghizadeh B., Ghorbanzadeh B., Amirgholami N., Houshmand G., Alboghobeish S. Venlafaxine inhibits naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide // *Metab. Brain Dis.* – 2020. – V. 35, № 2. – P. 305-313.
- Manzoni O.J., Williams J.T. Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal // *J. Neurosci.* – 1999. V. 19, № 15. – P. 6629-6636.
- Margolis E.B., Lock H., Hjelmstad G.O., Fields H.L. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? // *J. Physiol.* – 2006. – V. 577, № 3. – P. 907-924.
- Martinowich K., Hattori D., Wu H., Fouse S., He F., Hu Y., Fan G., Sun Y.E. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation // *Science.* – 2003. – V. 302, № 5646. P. 890-893.

- Martins C.C., Rosa S.G., Recchi A.M.S., Nogueira C.W., Zeni G. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide (m-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulates the hippocampal neurotoxic adaptations and abolishes a depressive-like phenotype in a short-term morphine withdrawal in mice // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2020. – V. 98. – P. 109803.
- Mashayekhi F.J., Rasti M., Rahvar M., Mokarram P., Namavar M.R., Owji A.A. Expression levels of the BDNF gene and histone modifications around its promoters in the ventral tegmental area and locus ceruleus of rats during forced abstinence from morphine // *Neurochem. Res.* – 2012. – V. 37. – P. 1517-1523.
- Matsushita Y., Ueda H. Curcumin blocks chronic morphine analgesic tolerance and brain-derived neurotrophic factor upregulation // *Neuroreport.* – 2009. – V. 20. – P. 63-68.
- Matthes H.W., Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dolle P. et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene // *Nature.* – 1996. – V. 383. – P. 819-823.
- Mazei-Robison M.S., Nestler E.J. Opiate-induced molecular and cellular plasticity of ventral tegmental area and locus coeruleus catecholamine neurons // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – V. 2, № 7. – P. a012070.
- McClung C.A., Nestler E.J. Neuroplasticity mediated by altered gene expression // *Neuropsychopharmacology.* – 2008. – V. 33, № 1. – P. 3-17.
- McGough N.N., He D.Y., Logrip M.L., Jeanblanc J., Phamluong K., Luong K., Kharazia V., Janak P.H., Ron D. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 10542-10552.
- Mellios N., Huang H.S., Grigorenko A., Rogaev E., Akbarian S. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex // *Hum. Mol. Genet.* 2008. – V. 17, № 19. – P. 3030-3042.



- Metsis M., Timmusk T., Arenas E., Persson H. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V. 90, № 19. – P. 8802-8806.
- Miess E., Gondin A.B., Yousuf A., Steinborn R., Mösslein N., Yang Y., Göldner M., Ruland J.G., Bünemann M., Krasel C., Christie M.J., Halls M.L., Schulz S., Canals M. Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid  $\mu$ -opioid receptor desensitization // *Sci. Signal.* – 2018. – V. 11, № 539. – P. eaas9609.
- Miladi-Gorji H., Rashidy-Pour A., Fathollahi Y., Akhavan M.M., Semnanian S., Safari M. Voluntary exercise ameliorates cognitive deficits in morphine dependent rats: the role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2011. – V. 96, № 3. – 479-491.
- Mill D., Bito-Onon J., Simms J., Li R., Bartlett S. Fischer rats consume 20% ethanol in a long-term intermittent-access two-bottle-choice paradigm // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – P. e79824.
- Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D., Moore W.M., Currie M.G. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples // *Anal. Biochem.* – 1993. – V. 214, № 1. – P. 11-16.
- Mitchelmore C., Gede L. Brain Derived Neurotrophic Factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders // *Brain Res.* – 2014. – V. 1586. – P. 162-172.
- Mitre M., Mariga A., Chao M.V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology // *Clin. Sci. (Lond).* – 2017. – V. 131, № 1. – P. 13-23.
- Miura P., Amirouche A., Clow C., Bélanger G., Jasmin B.J. Brain-derived neurotrophic factor expression is repressed during myogenic differentiation by miR-206 // *J. Neurochem.* – 2012. – V. 120, № 2. – P. 230-238.
- Mizoguchi H., Nakade J., Tachibana M., Ibi D., Someya E., Koike H., Kamei H., Nabeshima T., Itohara S., Takuma K., Sawada M., Sato J., Yamada K. Matrix metalloproteinase-9

- contributes to kindled seizure development in pentylentetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, № 36. – P. 12963-12971.
- Molteni R., Cattaneo A., Calabrese F., Macchi F., Olivier J., Racagni G., Ellenbroek B., Gennarelli M., Riva M. Reduced function of the serotonin transporter is associated with decreased expression of BDNF in rodents as well as in humans // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – V. 37. – P. 747-755.
- Momeni S., Roman E. Subgroup-dependent effects of voluntary alcohol intake on behavioral profiles in outbred Wistar rats // *Behav. Brain. Res.* – 2014. – V. 275. – P. 288-296.
- Monzón M.E., Varas M.M., De Barioglio S.R. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain // *Peptides.* – 2001. – V. 22, № 7. – P. 1043-1047.
- Motahari A.A., Sahraei H., Meftahi G.H. Role of Nitric Oxide on Dopamine Release and Morphine Dependency // *Basic Clin. Neurosci.* – 2016. – V. 7, № 4. P. 283-290.
- Muñños-Gimeno M., Espinosa-Parrilla Y., Guidi M., Kagerbauer B., Sipilä T., Maron E., Pettai K., Kananen L., Navinés R., Martín-Santos R., Gratacòs M., Metspalu A., Hovatta I., Estivill X. Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways // *Biol. Psychiatry.* – 2011. – V. 69, № 6. – P. 526-533.
- Neer E.J. Heterotrimeric G-proteins – organizers of transmembrane signals // *Cell.* – 1995. – V. 80. – P.249-257.
- Nelson N.G., Suhaidi F.A., Law W.X., Liang N.C. Chronic moderate alcohol drinking alters insulin release without affecting cognitive and emotion-like behaviors in rats // *Alcohol.* – 2018. – V. 70. – P. 11-22.
- Nemoto W., Sato T., Nakagawasai O., Yaoita F., Silberring J., Tadano T., Tan-No K. Phenylmethanesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, suppresses naloxone-

- precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice // *Neuropeptides*. – 2013. – V. 47, № 3. – P. 187-191.
- Niblock M.M., Brunso-Bechtold J.K., Riddle D.R. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex // *J. Neurosci.* – 2000. – V. 20, № 11. – P. 4165-4176.
- Nibuya M., Morinobu S., Duman R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments // *J Neurosci.* – 1995. – V. 15, № 11. – P. 7539-7547.
- Nikonenko I., Boda B., Steen S., Knott G., Welker E., Muller D. PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling // *J. Cell. Biol.* – 2008. – V. 183. – P. 1115-1127.
- Nubukpo P., Ramoz N., Girard M., Malauzat D., Gorwood P. Determinants of Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor Blood Levels in Patients with Alcohol Use Disorder // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2017. – V. 41, № 7. – P. 1280-1287.
- Nugent F.S., Niehaus J.L., Kauer J.A. PKG and PKA signaling in LTP at GABAergic synapses // *Neuropsychopharmacology*. – 2009 – V. 34, № 7. – P.1829-42.
- Nugent F.S., Penick E.C., Kauer J.A. Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses // *Nature*. – 2007. – V. 446, № 7139. – P. 1086-1090.
- Numakawa T., Richards M., Adachi N., Kishi S., Kunugi H., Hashido K. MicroRNA function and neurotrophin BDNF // *Neurochem. Int.* – 2011. – V. 59, № 5. –P. 551-558.
- Numan S., Lane-Ladd S.B., Zhang L., Lundgren K.H., Russell D.S., Seroogy K.B., Nestler E.J. Differential regulation of neurotrophin and trk receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal // *J Neurosci.* – 1998. – V. 18, № 24. – P. 10700-10708.
- Oe S., Miki H., Nishimura W., Noda Y. Mechanism of the Dendritic Translation and Localization of Brain-derived Neurotrophic Factor // *Cell Struct. Funct.* – 2016. – V. 41. – P. 23-31.

- Oe S., Yoneda Y. Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons // *FEBS Lett.* – 2010 – V. 584. – P. 3424-3430.
- Oliver R.J., Brigman J.L., Bolognani F., Allan A.M., Neisewander J.L., Perrone-Bizzozero N.I. Neuronal RNA-binding protein HuD regulates addiction-related gene expression and behavior // *Genes. Brain. Behav.* – 2018. – V. 17, № 4. – P. e12454.
- Ooi L., Wood I.C. Regulation of gene expression in the nervous system // *Biochem. J.* – 2008. – V. 414, № 3. – P. 327-341.
- Ornell F., Hansen F., Schuch F.B., Pezzini Rebelatto F., Tavares A.L., Scherer J.N., Valerio A.G., Pechansky F., Paim Kessler F.H., von Diemen L. Brain-derived neurotrophic factor in substance use disorders: A systematic review and meta-analysis // *Drug Alcohol Depend.* – 2018. – V. 193. – P. 91-103.
- Ornstein K., Milon H., McRae-Degueurce A., Alvarez C., Berger B., Würzner H.P. Biochemical and radioautographic evidence for dopaminergic afferents of the locus coeruleus originating in the ventral tegmental area // *J. Neural. Transm.* – 1987. – V. 70, № (3-4) – P. 183-191.
- Ozdemir D., Allain F., Kieffer B.L., Darcq E. Advances in the characterization of negative affect caused by acute and protracted opioid withdrawal using animal models // *Neuropharmacology.* – 2023. – V. 232. – P. 109524.
- Ozek M., Uresin Y., Güngör M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice // *Life Sci.* – 2003. – V. 72. – P. 1943-1951.
- Pal A., Das S. Chronic morphine exposure and its abstinence alters dendritic spine morphology and upregulates Shank1 // *Neurochem. Int.* – 2013. – V. 62, № 7. – P. 956-964.
- Palma-Álvarez R.F., Ros-Cucurull E., Amaro-Hosey K., Rodriguez-Cintas L., Grau-López L., Corominas-Roso M., Sánchez-Mora C., Roncero C. Peripheral levels of BDNF and

opiate-use disorder: literature review and update // *Rev. Neurosci.* – 2017. – V. 28, № 5. – P. 499-508

Palomer E., Carretero J., Benvegnù S., Dotti C., Martin M. Neuronal activity controls Bdnf expression via Polycomb de-repression and CREB/CBP/JMJD3 activation in mature neurons // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 11081.

Pang P.T., Teng H.K., Zaitsev E., Woo N.T., Sakata K., Zhen S., Teng K.K., Yung W.H., Hempstead B.L., Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity // *Science.* – 2004. – V. 306, № 5695. – P. 487-491.

Panja D., Kenney J.W., D'Andrea L., Zalfa F., Vedeler A., Wibrand K., Fukunaga R., Bagni C., Proud C.G., Bramham C.R. Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK // *Cell Rep.* – 2014. – V. 9, № 4. – P. 1430-1445.

Park H., Poo M.M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2013. – V. 14. – P. 7-23.

Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice // *Neuron.* – 1996. – V. 16, № 6. – P. 1137-1145.

Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* // Academic Press, Sydney, 2013. – 472 pp.

Peregud D., Panchenko L., Gulyaeva N. Chronic morphine intoxication reduces binding of HuD to BDNF long 3'-UTR, while morphine withdrawal stimulates BDNF expression in the frontal cortex of male Wistar rats // *Int. J. Neurosci.* – 2022. – V. 132, № 3. – P. 283-295. (a)

Peregud D., Kvichansky A., Shirobokova N., Stepanichev M., Gulyaeva N. 7,8-DHF enhances SHH in the hippocampus and striatum during early abstinence but has minor effects on alcohol intake in IA2BC paradigm and abstinence-related anxiety-like behavior in rats // *Neurosci. Lett.* – 2022. – V. 781. – P. 136671. (6)

- Peregud D., Stepanichev M., Gulyaeva N. Drinking Pattern in Intermittent Access Two-Bottle-Choice Paradigm in Male Wistar Rats Is Associated with Exon-Specific BDNF Expression in the Hippocampus During Early Abstinence // *J. Mol. Neurosci.* – 2021. – V. 71, № 2. – P. 262-275.
- Peregud D.I., Yakovlev A.A., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Expression of BDNF and TrkB phosphorylation in the rat frontal cortex during morphine withdrawal are NO dependent // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2016. – V. 36, № 6. – P. 839-849.
- Peregud D.I., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Elevation of BDNF exon I-specific transcripts in the frontal cortex and midbrain of rat during spontaneous morphine withdrawal is accompanied by enhanced pCreb1 occupancy at the corresponding promoter // *Neurochem. Res.* – 2015. – V. 40, №1. – P. 130-138.
- Pfefferbaum A., Rosenbloom M., Rohlfing T., Sullivan E.V. Degradation of association and projection white matter systems in alcoholism detected with quantitative fiber tracking. // *Biol. Psychiatry.* – 2009. – Vol. 65. – P. 680–690.
- Polakiewicz R.D., Schieferl S.M., Dorner L.F., Kansra V., Comb M.J. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273, № 20. – P. 12402-12406.
- Prins S.A., Przybycien-Szymanska M.M., Rao Y.S., Pak T.R. Long-term effects of peripubertal binge EtOH exposure on hippocampal microRNA expression in the rat // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, № 1. – P. e83166.
- Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters // *Genomics.* – 2007. – V. 90, № 3. – P. 397-406.
- Pu L., Bao G.B., Xu N.J., Ma L., Pei G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22, № 5. – P. 1914-1921.

- Qi C., Liu S., Qin R., Zhang Y., Wang G., Shang Y., Wang Y., Liang J. Coordinated regulation of dendrite arborization by epigenetic factors CDYL and EZH2 // *J. Neurosci.* – 2014. – V. 34. – P. 4494-4508.
- Qiu H., Lee S., Shang Y., Wang W.Y., Au K.F., Kamiya S., Barmada S.J., Finkbeiner S., Lui H., Carlton C.E., Tang A.A., Oldham M.C., Wang H., Shorter J., Filiano A.J., Roberson E.D., Tourtellotte W.G., Chen B., Tsai L.H., Huang E.J. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects // *J. Clin. Invest.* – 2014. – V. 124. – P. 981-999.
- Qureshi I.A., Mehler M.F. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2012. – V. 13, № 8. – P. 528-541.
- Radka S.F., Holst P.A., Fritsche M., Altar C.A. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay // *Brain Res.* – 1996. – V. 709, № 1. – P. 122-301.
- Radke A.K., Rothwell P.E., Gewirtz J.C. An anatomical basis for opponent process mechanisms of opiate withdrawal // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, № 20. – P. 7533-7539.
- Radzikinas K., Aven L., Jiang Z., Tran T., Paez-Cortez J., Boppidi K., Lu J., Fine A., Ai X. A Shh/miR-206/BDNF cascade coordinates innervation and formation of airway smooth muscle // *J. Neurosci.* – 2011. – V. 31, № 43. – P. 15407-15415.
- Rahman S., Ali Khan R., Kumar A. Experimental study of the morphine de-addiction properties of *Delphinium denudatum* Wall // *BMC Complement Altern Med.* 2002. – V. 2. – P. 6.
- Raivio N., Tiraboschi E., Saarikoski S.T., Castrén E., Kiianmaa K. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol / *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – V. 687. P. 9-13.
- Raju C.S., Fukuda N., López-Iglesias C., Göritz C., Visa N., Percipalle P. In neurons, activity-dependent association of dendritically transported mRNA transcripts with the

transacting factor CBF-A is mediated by A2RE/RTS elements // *Mol. Biol. Cell.* – 2011. – V. 22. – P. 1864-1877.

Rasmussen K., Beitner-Johnson D.B., Krystal J.H., Aghajanian G.K., Nestler E.J. Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates // *J. Neurosci.* – 1990. – V. 10, № 7. – P. 2308-2317.

Rasmussen K., Brodsky M., Inturrisi C.E. NMDA antagonists and clonidine block c-fos expression during morphine withdrawal // *Synapse.* – 1995. – V. 20. – P. 68-74.

Rauskolb S., Zagrebelsky M., Dreznjak A., Deogracias R., Matsumoto T., Wiese S., Erne B., Sendtner M., Schaeren-Wiemers N., Korte M., Barde Y.A. Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30, № 5. – P. 1739-1749.

Rex C.S., Lin C.Y., Kramár E.A., Chen L.Y., Gall C.M., Lynch G. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27, № 11. – P. 3017-3029.

Rezamohammadi F., Rahmani M., Ghanbari A., Khaleghian A., Miladi-Gorji H. BDNF receptor antagonism during the induction of morphine dependence exacerbates the severity of physical dependence and ameliorates psychological dependence in rats // *Neurosci. Lett.* – 2020. – V. 737. – P. 135332.

Robbe D., Bockaert J., Manzoni O.J. Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdrawn mice // *Eur. J. Neurosci.* – 2002. – V.16, № 11. – P. 2231-2235.

Robinson T.E., Gorny G., Savage V.R., Kolb B. Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats // *Synapse.* – 2002. – V. 46. – P. 271-279.

Robinson T.E., Kolb B. Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats // *Synapse.* – 1999. – V. 33. – P. 160-162.



- Robinson T.E., Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse // *Neuropharmacology*. – 2004. – V. 47. – P. 33-46.
- Ron D., Barak S. Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2016. – V. 17, № 9. – P. 576-591.
- Ron D., Berger A. Targeting the intracellular signaling "STOP" and "GO" pathways for the treatment of alcohol use disorders // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2018. – V. 235, № 6. – P. 1727-1743.
- Roni M., Rahman S. Lobeline attenuates ethanol abstinence-induced depression-like behavior in mice // *Alcohol*. – 2017. – 61. – P. 63–70.
- Rousseaud A., Delépine C., Nectoux J., Billuart P., Bienvenu T. Differential Expression and Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) mRNA Isoforms in Brain Cells from *Mecp2(308/y)* Mouse Model /// *J. Mol. Neurosci.* – 2015. – V. 56. – P. 758-767.
- Russo S.J., Bolanos C.A., Theobald D.E., DeCarolis N.A., Renthall W., Kumar A., Winstanley C.A., Renthall N.E., Wiley M.D., Self D.W., Russell D.S., Neve R.L., Eisch A.J., Nestler E.J. IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates // *Nat. Neurosci.* – 2007 – V. 10, № 1 – P. 93-99.
- Russo S.J., Dietz D.M., Dumitriu D., Morrison J.H., Malenka R.C., Nestler E.J. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens // *Trends Neurosci.* – 2010. – V. 33, № 6. – P. 267-276.
- Russo S.J., Mazei-Robison M.S., Ables J.L., Nestler E.J. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction // *Neuropharmacology*. – 2009. – V. 56. – P. 73-82.
- Saal D., Dong Y., Bonci A., Malenka R.C. Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons // *Neuron*. – 2003. – V. 37, № 4. – P. 577-582.
- Sadava D., Mack B. The effect of methadone addiction on cyclic nucleotide levels in regions of rat brain // *Life Sci.* – 1986. – V. 39. – P. 477-481.

- Sadri-Vakili G., Kumaresan V., Schmidt H.D., Famous K.R., Chawla P., Vassoler F.M., Overland R.P., Xia E., Bass C.E., Terwilliger E.F., Pierce R.C., Cha J.H. Cocaine-induced chromatin remodeling increases brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat medial prefrontal cortex, which alters the reinforcing efficacy of cocaine // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30, № 35. – P. 11735-11744.
- Sakata K., Jin L., Jha S. Lack of promoter IV-driven BDNF transcription results in depression-like behavior // *Genes. Brain. Behav.* – 2010. – V. 9, № 7. – P. 712-721.
- Sakharkar A.J., Kyzar E.J., Gavin D.P., Zhang H., Chen Y., Krishnan H.R., Grayson D.R., Pandey S.C. Altered amygdala DNA methylation mechanisms after adolescent alcohol exposure contribute to adult anxiety and alcohol drinking // *Neuropharmacology.* – 2019. – V. 157. – P. 107679.
- Sakharkar A.J., Vetreno R.P., Zhang H., Kokare D.M., Crews F.T., Pandey S.C. A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood // *Brain. Struct. Funct.* – 2016. – V. 221, № 9. — P. 4691-4703.
- Sandoval R., González A., Caviedes A., Pancetti F., Smalla K.H., Kaehne T., Michea L., Gundelfinger E.D., Wyneken U. Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons // *J. Neurochem.* – 2011. – V. 118, № 5. – P. 760-772.
- Sanna M.D., Ghelardini C., Galeotti N. HuD-mediated distinct BDNF regulatory pathways promote regeneration after nerve injury // *Brain Res.* – 2017. – V. 1659. – P. 55-63.
- Sanna M.D., Peroni D., Mello T., Ghelardini C., Quattrone A., Galeotti N. Increase of neurofilament-H protein in sensory neurons in antiretroviral neuropathy: Evidence for a neuroprotective response mediated by the RNA-binding protein HuD // *Pharmacol. Res.* – 2016. – V. 111. – P. 23-33.
- Sasi M., Vignoli B., Canossa M., Blum R. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling // *Pflugers Arch.* – 2017. – V. 469, № 5-6. – P. 593-610.

- Savell K.E., Bach S.V., Zipperly M.E., Revanna J.S., Goska N.A., Tuscher J.J., Duke C.G., Sultan F.A., Burke J.N., Williams D., Ianov L., Day J.J. A Neuron-Optimized CRISPR/dCas9 Activation System for Robust and Specific Gene Regulation // *eNeuro*. – 2019. – V. 6, № 1. – P. ENEURO.0495-18.2019.
- Schaefer A., Im H.I., Venø M.T., Fowler C.D., Min A., Intrator A., Kjems J., Kenny P.J., O'Carroll D., Greengard P. Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction // *J. Exp. Med.* – 2010. – V. 207, № 9. – P. 1843-1851.
- Schinder A.F., Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity // *Trends Neurosci.* – 2000. – V. 23, № 12. – P. 639-645.
- Schmidt H.D., Sangrey G.R., Darnell S.B., Schassburger R.L., Cha J.H., Pierce R.C., Sadri-Vakili G. Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters // *J. Neurochem.* – 2012. – V. 120, № 2. – P. 202-209.
- Schulteis G., Yackey M., Risbrough V., Koob G.F. Anxiogenic-like effects of spontaneous and naloxone-precipitated opiate withdrawal in the elevated plus-maze // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1998. – V. 60, № 3. – P. 727-731.
- Seidah N.G., Benjannet S., Pareek S., Chrétien M., Murphy R.A. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases // *FEBS Lett.* – 1996. – V. 379, № 3. – P. 247-250.
- Shen R.Y., Altar C.A., Chiodo L.A. Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994 – V. 91, № 19. – P. 8920-8924.
- Shi W., Ma C., Qi Q., Liu L., Bi H., Cong B., Li Y. The effect of different durations of morphine exposure on mesencephalic dopaminergic neurons in morphine dependent rats // *Neurotoxicology.* – 2015. – V. 51. – P. 51-57.

- Shojaei S., Ghavami S., Panjehshahin M.R., Owji A.A. Effects of Ethanol on the Expression Level of Various BDNF mRNA Isoforms and Their Encoded Protein in the Hippocampus of Adult and Embryonic Rats // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – V. 16. – P. 30422-30437.
- Simmons S.C., Wheeler K., Mazei-Robison M.S. Determination of circuit-specific morphological adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons by chronic morphine // *Mol. Brain.* –2019. – V. 12, № 1.– P. 10.
- Simms J., Steensland P., Medina B., Abernathy K., Chandler L., Wise R., Bartlett S. Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2008. – V. 32. – P. 1816-1823.
- Simonato M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 1996. – V. 17, № 11. – P. 410-415.
- Sklair-Tavron L., Shi W.X., Lane S.B., Harris H.W., Bunney B.S., Nestler E.J. Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1996. – V. 93. – P. 11202-11207.
- Somkuwar S., Fannon M., Staples M., Zamora-Martinez E., Navarro A., Kim A., Quigley J., Edwards S., Mandyam C. Alcohol dependence-induced regulation of the proliferation and survival of adult brain progenitors is associated with altered BDNF-TrkB signaling // *Brain. Struct. Funct.* – 2016. – V. 221. – P. 4319–4335.
- Spiga S., Puddu M.C., Pisano M., Diana M. Morphine withdrawal-induced morphological changes in the nucleus accumbens // *Eur. J. Neurosci.* – 2005.– V. 22. – P. 2332-2340.
- Spiga S., Serra G.P., Puddu M.C., Foddai M., Diana M. Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy // *Eur. J. Neurosci.* – 2003. – V. 17. – P. 605-612.
- Stanquini L.A., Biojone C., Guimarães F.S., Joca S.R. Repeated treatment with nitric oxide synthase inhibitor attenuates learned helplessness development in rats and increases hippocampal BDNF expression // *Acta Neuropsychiatr.* – 2018. – V. 30, № 3. – P. 127-136.

- Stragier E., Martin V., Davenas E., Poilbout C., Mongeau R., Corradetti R., Lanfumey L. Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice // *Transl. Psychiatry*. – 2015. – V. 5. – P. e696. (6)
- Stragier E., Massart R., Sallery M., Hamon M., Geny D., Martin V., Boulle F., Lanfumey L. Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice // *Mol. Psychiatry*. – 2015. – V. 20. – P. 405–412. (a)
- Strang J., Volkow N.D., Degenhardt L., Hickman M., Johnson K., Koob G.F., Marshall B.D.L., Tyndall M., Walsh S.L. Opioid use disorder // *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2020. – V. 6, № 1. – P. 3.
- Sullivan M.E., Hall S.R., Milne B., Jhamandas K. Suppression of acute and chronic opioid withdrawal by a selective soluble guanylyl cyclase inhibitor // *Brain. Res.* – 2000. – V. 859, № 1. – P. 45-56.
- Sun Y., Lim Y., Li F., Liu S., Lu J.J., Haberberger R., Zhong J.H., Zhou X.F. ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA // *PLoS One*. — 2012. – V. 7, № 4. – P. e35883.
- Sweatt J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2004 – V.14, № 3. – P. 311-317.
- Tabuchi A., Sakaya H., Kisukeda T., Fushiki H., Tsuda M. Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, № 39. – P. 35920-35931.
- Tanganelli S., Antonelli T., Morari M., Bianchi C., Beani L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs // *Neurosci Lett.* – 1991. – V. 122. – P. 270-272.
- Tao X., Finkbeiner S., Arnold D.B., Shaywitz A.J., Greenberg M.E. Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism // *Neuron*. – 1998. – V. 20, № 4. – P. 709-726.

- Tapocik J.D., Barbier E., Flanigan M., Solomon M., Pincus A., Pilling A., Sun H., Schank J.R., King C., Heilig M. microRNA-206 in rat medial prefrontal cortex regulates BDNF expression and alcohol drinking // *J. Neurosci.* – 2014. – V. 34, № 13. – P. 4581-4588.
- Tapocik J.D., Solomon M., Flanigan M., Meinhardt M., Barbier E., Schank J.R., Schwandt M., Sommer W.H., Heilig M. Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence // *Pharmacogenomics J.* – 2013. – V. 13, № 3. – P. 286-296.
- Tayfun Uzbay I., Oglesby M.W. Nitric oxide and substance dependence // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2001. – V.25, № 1. – P. 43-52.
- Taylor D.A., Fleming W.W. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – V. 297. – P. 11-18.
- Teng H.K., Teng K.K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R.D., Kermani P., Torkin R., Chen Z.Y., Lee F.S., Kraemer R.T., Nykjaer A., Hempstead B.L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25, № 22. – P. 5455-5463.
- Tian F., Hu X.Z., Wu X., Jiang H., Pan H., Marini A.M., Lipsky R.H. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1 // *J. Neurochem.* – 2009. – V. 109. – P. 1375-1388.
- Tian N., Cao Z., Zhang Y. MiR-206 decreases brain-derived neurotrophic factor levels in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *Neurosci. Bull.* – 2014. – V. 30, № 2. – P. 191-197.
- Timmusk T., Palm K., Metsis M., Reintam T., Paalme V., Saarma M., Persson H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene // *Neuron.* – 1993. – V. 10, № 3. – P. 475-489.
- Ting-A-Kee R., van der Kooy D. The neurobiology of opiate motivation // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – V. 2. – P. a012096.

- Tiruchinapalli D.M., Caron M.G., Keene J.D. Activity-dependent expression of ELAV/Hu RBPs and neuronal mRNAs in seizure and cocaine brain // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 107. – P. 1529-1543.
- Toda N., Kishioka S., Hatano Y., Toda H. Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling // *Anesthesiology.* – 2009. – V. 110, № 1. – P. 166-181.
- Tolou-Dabbaghian B., Delphi L., Rezaeifard A. Blockade of NMDA Receptors and Nitric Oxide Synthesis Potentiated Morphine-Induced Anti-Allodynia via Attenuating Pain-Related Amygdala pCREB/CREB Signaling Pathway // *J. Pain.* – 2019. – V. 20, № 8. – P. 885-897.
- Tongiorgi E., Baj G. Functions and mechanisms of BDNF mRNA trafficking // *Novartis Found. Symp.* – 2008. – V. 289. – P. 136-147
- Topiwala A., Allan C.L., Valkanova V., Zsoldos E., Filippini N., Sexton C., Mahmood A., Fooks P., Singh-Manoux A., Mackay C.E., Kivimäki M., Ebmeier K.P. Moderate alcohol consumption as risk factor for adverse brain outcomes and cognitive decline: longitudinal cohort study // *BMJ.* – 2017. – V. 357. – P. j2353.
- Torregrossa M.M., Isgor C., Folk J.E., Rice K.C., Watson S.J., Woods J.H. The delta-opioid receptor agonist (+)BW373U86 regulates BDNF mRNA expression in rats // *Neuropsychopharmacology.* – 2004. – V. 29, № 4. – P. 649-659.
- Trapaidze N., Gomes I., Cvejic S., Bansinath M., Devi L.A. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2000. – V. 76, № 2. – P. 220-228.
- Tropea D., Capsoni S., Tongiorgi E., Giannotta S., Cattaneo A., Domenici L. Mismatch between BDNF mRNA and protein expression in the developing visual cortex: the role of visual experience // *Eur. J. Neurosci.* – 2001. – V. 13, № 4. P. 709-721.
- Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 5603-5610.

- Tso P.H., Wong Y.H. Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2003. – V. 30. – P. 307-316.
- Uzbaya I.T., Oglesby M.W. Nitric oxide and substance dependence // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2001. – V. 25. – P. 43-52.
- Vaghi V., Polacchini A., Baj G., Pinheiro V.L., Vicario A., Tongiorgi E. Pharmacological profile of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) splice variant translation using a novel drug screening assay: a "quantitative code" // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – P. 27702-27713.
- Van den Oever M.C., Goriounova N.A., Li K.W., Van der Schors R.C., Binnekade R., Schoffemeer A.N., Mansvelter H.D., Smit A.B., Spijker S., De Vries T.J. Prefrontal cortex AMPA receptor plasticity is crucial for cue-induced relapse to heroin-seeking // *Nat. Neurosci.* – 2008. – V. 11, № 9. – P. 1053-1058.
- Vanevski F., Xu B. HuD interacts with Bdnf mRNA and is essential for activity-induced BDNF synthesis in dendrites // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 2. – P. e0117264.
- Vaupel D.B., Kimes A.S., London E.D. Comparison of 7-nitroindazole with other nitric oxide synthase inhibitors as attenuators of opioid withdrawal // *Psychopharmacology (Berl.)*. – 1995. – V. 118, № 4. – P. 361-368.
- Vaupel D.B., Kimes A.S., London E.D. Further in vivo studies on attenuating morphine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy // *Eur. J. Pharmacol.* – 1997. – V. 324. – P. 11-20.
- Varendi K., Kumar A., Härma M.A., Andressoo J.O. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2014. – V. 71, № 22. – P. 4443-4456.
- Varendi K., Mätlik K., Andressoo J.O. From microRNA target validation to therapy: lessons learned from studies on BDNF // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2015. – V. 72, № 9. – P. 1779-1794.



- Vargas-Perez H., Ting-A Kee R., Walton C.H., Hansen D.M., Razavi R., Clarke L., Bufalino M.R., Allison D.W., Steffensen S.C., van der Kooy D. Ventral tegmental area BDNF induces an opiate-dependent-like reward state in naive rats // *Science* – 2009. – V. 324. – P. 1732-1734.
- Vicario A., Colliva A., Ratti A., Davidovic L., Baj G., Gricman L., Colombrita C., Pallavicini A., Jones K.R., Bardoni B., Tongiorgi E. Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins // *Front. Mol. Neurosci.* – 2015. – V. 8. – P. 62.
- Vogel C., Marcotte E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses // *Nat. Rev. Genet.* – 2012. – V. 13. – P. 227–232
- Volicer L., Puri S.K., Choma P. Cyclic GMP and GABA levels in rat striatum and cerebellum during morphine withdrawal: effect of apomorphine // *Neuropharmacology.* – 1977. – V. 16. – P. 791-794.
- Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L. Opioid receptors // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – V. 73. – P. 953–990.
- Wan L., Xie Y., Su L., Liu Y., Wang Y., Wang Z. RACK1 affects morphine reward via BDNF // *Brain Res.* – 2011. – V. 1416. – P. 26-34.
- Wang C.S, Kavalali E.T., Monteggia L.M. BDNF signaling in context: From synaptic regulation to psychiatric disorders // *Cell.* – 2022. – V. 185, № 1. – P. 62-76.
- Wang N., X. Liu, X.T. Li, X.X. Li, W. Ma, Y.M. Xu, Y. Liu, Q. Gao, T. Yang, H. Wang, Y. Peng, X.F. Zhu, Y.Z. Guan, 7,8-Dihydroxyflavone alleviates anxiety-like behavior induced by chronic alcohol exposure in mice involving tropomyosin-related kinase B in the amygdala // *Mol. Neurobiol.* – 2021. – V. 58 – P. 92-105.
- Wang W.S., Kang S., Liu W.T., Li M., Liu Y., Yu C., Chen J., Chi Z.Q., He L., Liu J.G. Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the

rat ventromedial prefrontal cortex // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 32, № 40. – P. 13763-13775.

Wang Y., Lai J., Cui H., Zhu Y., Zhao B., Wang W., Wei S. Inhibition of histone deacetylase in the basolateral amygdala facilitates morphine context-associated memory formation in rats // *J. Mol. Neurosci.* – 2015. – V. 55, № 1. – P. 269-278.

Watts V.J., Neve K.A. Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o-coupled receptors // *Pharmacol. Ther.* 2005 – V. 106 № 3. – P. 405-421.

Wei L., Zhu Y.M., Zhang Y.X., Liang F., Barry D.M., Gao H.Y., Li T., Huo F.Q., Yan C.X. Microinjection of histone deacetylase inhibitor into the ventrolateral orbital cortex potentiates morphine induced behavioral sensitization // *Brain Res.* – 2016. – V. 1646. – P. 418-425.

Wei X., Li H., Miao J., Liu B., Zhan Y., Wu D., Zhang Y., Wang L., Fan Y., Gu H., Wang W., Yuan Z. miR-9\*- and miR-124a-Mediated switching of chromatin remodelling complexes is altered in rat spina bifida aperta // *Neurochem. Res.* – 2013. – V. 38, № 8. – P. 1605-1615.

Welsch L., Bailly J., Darcq E., Kieffer B.L. The Negative Affect of Protracted Opioid Abstinence: Progress and Perspectives From Rodent Models // *Biol. Psychiatry.* – 2020. – V. 87, № 1. – P. 54-63.

West A., Chen W., Dalva M., Dolmetsch R., Kornhauser J., Shaywitz A., Takasu M., Tao X., Greenberg M. Calcium regulation of neuronal gene expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2001. – V. 98. – P. 11024-11031.

Williams J.T., Christie M.J., Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence // *Physiol. Rev.* – 2001. – V. 81, № 1. – P. 299-343.

Wise R.A. Opiate reward: sites and substrates // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1989. – V. 13. – P. 129-133.

Wise R.A. Strain and supplier differences affecting ethanol intake by rats // *Q. J. Stud. Alcohol.* – 1974. – V. 35. – P. 667-668.

- Wise RA (1975) Maximization of ethanol intake in the rat // *Alcohol Intoxication and Withdrawal: Experimental Studies II*. (Advances in experimental medicine and withdrawal V. 59), Gross M (ed). –Springer Science+Buisness Media, New York, 1975. – P. 279-295.
- Wolińska R., Kleczkowska P., de Cordé-Skurska A., Poznański P., Sacharczuk M., Mika J., Bujalska-Zadrożny M. Nitric oxide modulates tapentadol antinociceptive tolerance and physical dependence // *Eur. J. Pharmacol.* – 2021. – V. 907. – P. 174245.
- Woo N.H., Teng H.K., Siao C.J., Chiaruttini C., Pang P.T., Milner T.A., Hempstead B.L., Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression // *Nat. Neurosci.* – 2005. – V. 8, № 8. – P. 1069-1077.
- World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8).
- Wu Q., Hwang C.K., Zheng H., Wagley Y., Lin H.Y., Kim D.K., Law P.Y., Loh H.H., Wei L.N. MicroRNA 339 down-regulates  $\mu$ -opioid receptor at the post-transcriptional level in response to opioid treatment // *FASEB J.* – 2013. – V. 27, № 2. – P. 522-535.
- Wu Q., Zhang L., Law P.Y., Wei L.N., Loh H.H. Long-term morphine treatment decreases the association of mu-opioid receptor (MOR1) mRNA with polysomes through miRNA23b // *Mol. Pharmacol.* – 2009. – V. 75, № 4. – P. 744-750.
- Wu S.Y., Chen C.Y., Huang T.L., Tsai M.C. Brain-derived neurotrophic factor and glutathione peroxidase as state biomarkers in alcohol use disorder patients undergoing detoxification // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – V. 99, № 17. – P. e19938.
- Wu Y.C., Williamson R., Li Z., Vicario A., Xu J., Kasai M., Chern Y., Tongiorgi E., Baraban J.M. Dendritic trafficking of BDNF mRNA can be mediated by both translin-dependent and -independent mechanisms // *J. Neurochem.* – 2011. – V. 116. – P. 1112-1121.
- Xiong G., Mojsilovic-Petrovic J., Pérez C.A., Kalb R.G. Embryonic motor neuron dendrite growth is stunted by inhibition of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase and protein kinase G // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – V. 25. – P. 1987-1997.

- Xiong H., Yamada K., Han D., Nabeshima T., Enikolopov G., Carnahan J., Nawa H. Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons // *Eur. J. Neurosci.* – 1999. – V. 11, № 5. – P. 1567-1576.
- Xu H., Li H., Liu D., Wen W., Xu M., Frank J.A., Chen J., Zhu H., Grahame N.J., Luo J. Chronic Voluntary Alcohol Drinking Causes Anxiety-like Behavior, Thiamine Deficiency, and Brain Damage of Female Crossed High Alcohol Preferring Mice // *Front. Pharmacol.* – 2021. – V. 12. – P. 614396.
- Yadav S., Pandey A., Shukla A., Talwelkar S.S., Kumar A., Pant A.B., Parmar D. miR-497 and miR-302b regulate ethanol-induced neuronal cell death through BCL2 protein and cyclin D2 // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, № 43. – P. 37347-37357.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics.* – 2012. – V. 13. – P. 134.
- Yin J.B., Wu H.H., Dong Y.L., Zhang T., Wang J., Zhang Y., Wei Y.Y., Lu Y.C., Wu S.X., Wang W., Li Y.Q. Neurochemical properties of BDNF-containing neurons projecting to rostral ventromedial medulla in the ventrolateral periaqueductal gray // *Front. Neural. Circuits.* – 2014. – V. 8. – P. 137.
- Yoshihara Y., De Roo M., Muller D. Dendritic spine formation and stabilization // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2009. – V. 19. – P. 146-153.
- You H., Lu B. Diverse Functions of Multiple Bdnf Transcripts Driven by Distinct Bdnf Promoters // *Biomolecules.* – 2023; – V. 13, № 4. – P. 655.
- You C., Zhang H., Sakharkar A.J., Teppen T., Pandey S.C. Reversal of deficits in dendritic spines, BDNF and Arc expression in the amygdala during alcohol dependence by HDAC inhibitor treatment // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2014. – V. 17. – P. 313-322

- Yu H., Hu H., Meng H., Deng W., Fu Y., Luo Q. Brain-derived neurotrophic factor and Bcl-2 expression in rat brain areas following chronic morphine treatment // *Neural. Regen. Res.* – 2011. – V. 6, № 7. – P. 528-533.
- Zagrebelsky M., Tacke C., Korte M. BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines // *Cell. Tissue. Res.* – 2020. – V. 382, № 1. – P. 185-199.
- Zanardini R., Fontana A., Pagano R. et al. Alterations of brain-derived neurotrophic factor serum levels in patients with alcohol dependence // *Alcohol. Clin. Exp Res.* – 2011. – Vol. 35. – P. 1529-1533.
- Zhang H., Torregrossa M.M., Jutkiewicz E.M., Shi Y.G., Rice K.C., Woods J.H., Watson S.J., Ko M.C. Endogenous opioids upregulate brain-derived neurotrophic factor mRNA through delta- and micro-opioid receptors independent of antidepressant-like effects // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – V. 23, № 4 – P. 984-994.
- Zhang H.N., Ko M.C. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors // *Neuroscience.* – 2009. – V. 161, № 1. – P. 301-310.
- Zhang J., Zhang X., Su H. et al. Increased serum brain-derived neurotrophic factor levels during opiate withdrawal // *Neurosci. Lett.* – 2014. – V. 571. – P. 61-65.
- Zhang K., Jiang H., Zhang Q., Du J., Wang Y., Zhao M. Brain-derived neurotrophic factor serum levels in heroin-dependent patients after 26 weeks of withdrawal // *Compr. Psychiatry.* – 2016. – V. 65. – P. 150-155.
- Zhang Z., Tao W., Hou Y.Y., Wang W., Kenny P.J., Pan Z.Z. MeCP2 repression of G9a in regulation of pain and morphine reward // *J. Neurosci.* 2014. – V. 34, № 27. – P. 9076-9087.
- Zhang Z., Wenjuan Tao W., Hou Y.-Y., Wang W., Kenny P.J., Pan Z.Z. MeCP2 repression of G9a in regulation of pain and morphine reward // *J. Neurosci.* – 2014. – V. 34. – P. 9076-9087.

- Zhao Z., Wang Z., Gu Y., Feil R., Hofmann F., Ma L. Regulate axon branching by the cyclic GMP pathway via inhibition of glycogen synthase kinase 3 in dorsal root ganglion sensory neurons // *J. Neurosci.* – 2009. – V. 29. – P. 1350-1360.
- Zheng H., Chu J., Zeng Y., Loh H.H., Law P.Y. Yin Yang 1 phosphorylation contributes to the differential effects of mu-opioid receptor agonists on microRNA-190 expression // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, № 29. – P. 21994-212002.
- Zheng H., Zeng Y., Zhang X., Chu J., Loh H.H., Law P.Y. mu-Opioid receptor agonists differentially regulate the expression of miR-190 and NeuroD // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – V. 77, № 1. – P. 102-109.
- Zhou J., Pliego-Rivero B., Bradford H.F., Stern G.M. The BDNF content of postnatal and adult rat brain: the effects of 6-hydroxydopamine lesions in adult brain // *Brain Res. Dev. Brain. Res.* – 1996 – V. 97, № 2. – P. 297-303.