

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи



Перегуд Данил Игорьевич

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

Специальность – 1.5.24 – нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Национальном научном центре наркологии – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского" Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Научные консультанты: **Панченко Леонид Федорович**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации

Гуляева Наталия Валерьевна, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Левицкая Наталья Григорьевна**, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», старший научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета

Колик Лариса Геннадьевна, доктор биологических наук, профессор РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», главный научный сотрудник лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости

Судаков Сергей Константинович, доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАН, ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, заведующий лабораторией физиологии подкрепления

Защита диссертации состоится «04» декабря 2023 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Е-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/593163962/> и на сайте Диссовет 2.0 <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.7/2638>

Автореферат разослан «02» октября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.015.7,
доктор биологических наук

Умарова Белла Анверовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

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. Однако бесконтрольное употребление данных препаратов вызывает стойкую психическую и физическую зависимость, которая характеризуется крайне болезненными абстинентными расстройствами. Именно развитие тягостной абстиненции чаще всего является причиной обращения лиц, страдающих опиной зависимостью, за медицинской помощью. Злоупотребление препаратами опиного ряда и последующее формирование зависимости представляют собой актуальную медицинскую и социально-экономическую проблему мирового масштаба. Согласно отчету ООН о потреблении наркотических средств в мировом масштабе в 2019 г. 62 млн человек потребляли опиоиды, что соответствует порядка 1,2 % мировой популяции взрослого населения (World Drug Report, 2021). Кроме того, 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). Таким образом, учитывая значительный урон, наносимый злоупотреблением опиатов мировому сообществу, всестороннее изучение механизмов течения опиной 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 опиной 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 опиная, может рассматриваться как вариант нейропластичности (Dacher, Nugent, 2011; Corpi 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 (NO_x⁻) регион-специфично коррелируют с тяжестью синдрома отмены. Однако, непосредственное участие NO в реализации зависимости и опиоидной 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 опиоидной 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 опиоидной 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 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 опиной 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 опиной 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 нейробиологических 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 нейробиологических 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 опиоидной 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 опиоидной 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 цитирование.

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 опиоидной 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 опиоидной 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на животных

В работе было использовано 342 аутбредных крыс-самца 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 в 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/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией Института.

Инттоксикация морфином

При моделировании острой опийной интоксикации, морфин в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) вводили крысам однократно внутривентриально в дозе 10 мг/кг (3 мл/кг), биологический материал для исследования собирали через 1 или 2 ч после интоксикации.

Для формирования физической зависимости у крыс морфин вводили по отработанной схеме, предложенной Dum и соавт. (Dum et al., 1981 в модификации Rahman et al., 2002). Данная схема представляет собой субхроническое внутривентриальное введение морфина дважды в день в возрастающих дозах от 10 до 100 мг/кг (3 мл/кг). 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. В отдельных экспериментах через 3 или 6 дней после субхронической интоксикации морфином (отсроченная отмена, период после завершения острой фазы синдрома отмены опиатов, когда затухают соматические проявления) проводили тестирование животных в приподнятом крестообразном лабиринте.

Алкоголизация

Острую интоксикацию алкоголем проводили согласно работе Raivio и соавт. (Raivio et al., 2012) в которой 12 % раствор этилового спирта в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) вводили внутривентриально 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). Экспозицию осуществляли в течение 20 сеансов предъявления. Процедура ПД20%СВ была реализована согласно подходу использованного Simms и соавт. (2008). Количество потребляемого раствора пересчитывали на потребление спирта в г на массу тела животного за сеанс (сутки). По завершению модели ПД20%СВ в острой фазе алкогольной абстиненции, которая длится до 72 ч после отмены (Carnicella, Ron, Barak; 2014), исследовали поведение животных: на первый день абстиненции 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.

Введение ингибитора NO-синтазы

При исследовании роли NO в формировании зависимости от морфина ингибитор NO-синтазы (NOS) L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester) вводили системно на протяжении субхронической морфинизации по указанной выше 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 NOS.

Введение рекомбинантного BDNF

Для внутримозговых инъекций животным под наркозом (хлоралгидрат 350 мг/кг) на стереотаксической раме (David Kopf Instruments, USA) имплантировали стальную направляющую канюлю для внутримозговых инъекций (C313G, Plastics One, USA) в срединную ВОП согласно координатам стереотаксического атласа: -5,3 мм AP и 7,4 мм DV (Verhow et al., 1995; 1996). После операции животных помещали на 7 дней в индивидуальные клетки для прохождения восстановительного периода. При оценке влияния BDNF на экспрессию спонтанного синдрома отмены животным делали однократную инъекцию рекомбинантного BDNF человека (0,75 мкг) (B3795, Sigma-Aldrich, USA) в ВОП в период отмены (через 16 ч после последней инъекции морфина). При исследовании влияния BDNF на выработку или воспроизведение условной реакции предпочтения места, индуцированного морфином, BDNF (0,75 мкг) вводили однократно в ВОП за одни сутки до или одни сутки спустя фазы обусловливания, соответственно.

Введение миметика BDNF

При исследовании роли сигналинга опосредованного BDNF в реализации положительного подкрепляющего эффекта алкоголя, а также манифестации абстинентных расстройств животным в ходе моделирования чрезмерного потребления алкоголя (как описано выше) внутрибрюшинно вводили миметик BDNF – 7,8-дигидроксифлавонол (7,8-ДГФ) в дозе 5 мг/кг за 1 ч до каждого сеанса предьявления алкоголя. 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; и 4) группа «Этанол + 7,8-ДГФ», которой вводили 7,8-ДГФ перед каждым сеансом предьявления алкоголя в модели ПД20%СВ.

Оценка спонтанного синдрома отмены морфина

Спонтанный синдром отмены оценивали через 38 ч после введения завершающей инъекции морфина 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 соавт. (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).

Тест «открытое поле»

Двигательную активность и тревожно-подобные нарушения поведения оценивали в тесте «открытое поле». Тестирование животных проводили в течение 5 мин в круглой арене. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, а также число заходов в центр арены и время нахождения в центре.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

Для оценки тревожно-подобных нарушений поведения использовали тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Для каждого животного в течение 5 мин регистрировали: число заходов и время, проведенное в открытых и закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, а также горизонтальную двигательную активность.

Тест условной реакции предпочтения места

Для оценки роли BDNF в реализации подкрепляющих свойств морфина проводили тест условной реакции предпочтения места (УРПМ), индуцированной морфином. В начале эксперимента 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. Затем в течение 8 дней животным попеременно однократно вводили морфин (4 раза - 10 мг/кг) или изотонический раствор хлорида натрия (4 раза). Непосредственно после инъекции животных помещали на 30 мин в один из ассоциированных с введением морфина или изотонического раствора NaCl (0.9 %) 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 растворителя.

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°C .

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.

Активность NOC определяли с помощью радиометрического метода, регистрируя скорость накопления [^3H]-L-цитруллина в реакции окисления [^3H]-L-аргинина, катализируемой NO-синтазой (Bredt, Snyder, 1989 в модификации Онуфриева и соавт., 2002). Активность фермента выражали в пмоль [^3H]-L-цитруллина, накопленного за мин на мг белка в супернатанте.

Концентрацию NO_x^- определяли флюорометрическим методом, путем измерения интенсивности флюоресценции 2,3-диаминонафтотриазола, продукта реакции 2,3-диаминонафталина 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). Концентрацию NO_x^- выражали в нмоль на мг белка.

Концентрацию цГМФ измеряли с помощью набора реактивов основанном на конкурентном иммуоферментном анализе (Cayman Chemical, # 581021). Концентрацию цГМФ выражали в пмоль на мг белка.

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. При исследовании уровня микроРНК общую РНК, содержащую микроРНК, дополнительно полиаденилировали. Общую РНК или полиаденилированную РНК, содержащую микроРНК, подвергали ОТ с помощью реактивов для синтеза комплементарной в присутствии случайных декамеров и олиго(dT)15 в случае мРНК или универсального праймера в случае микроРНК (Wei et al., 2013). ПЦР проводили в двух параллельных образцах в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR GREEN. Для проведения ПЦР РВ использовали термоциклер АНК-32 или АНК-М (ИАНП РАН и МГТУ им. Н.Э.Баумана, Россия). 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).

Иммунопреципитация хроматина

При исследовании взаимодействия транскрипционных факторов, а также особенностей посттрансляционных модификаций гистонов в районе регуляторных участков гена BDNF использовали метод иммунопреципитации хроматина, совмещенный с ПЦР РВ. Для обеспечения сшивки белковых молекул с геномной ДНК кусочки ткани инкубировали в присутствии формальдегида. На следующем этапе гомогенизировали в буфере, содержащем додецилсульфат натрия, и подвергали обработке ультразвуком. Нерастворенную фракцию удаляли с помощью центрифугирования. Далее проводили, собственно, иммунопреципитацию посредством антител к транскрипционным факторам – регуляторам экспрессии BDNF, а также ацетилованному или метилированному гистону H3. Уровень хроматина промоторных областей гена BDNF, связанных с использованными антителами оценивали посредством ПЦР РВ. Содержание регуляторных областей гена BDNF в иммунопреципитированных образцах выражали в процентном отношении относительно содержания целевой области ДНК в общей фракции хроматина.

Иммунопреципитация РНК

Для оценки взаимодействия белковых комплексов с транскриптом BDNF был использован метод иммунопреципитации РНК, совмещенный с ОТ-ПЦР РВ. Посредством гомогенизации и последующего центрифугирования из отделов головного мозга была получена растворимая фракция, использованная для иммунопреципитации РНК-связывающих белков. В последующем выделяли РНК и после этапа ОТ проводили ПЦР-РВ для амплификации 3'-UTR мРНК BDNF. Содержание транскрипта BDNF в иммунопреципитированных образцах выражали относительно неспецифической иммунопреципитации в присутствии неиммунных IgG или в процентном отношении относительно содержания целевой мРНК в общей фракции РНК в образцах до иммунопреципитации.

Иммуноблоттинг

Стандартная процедура иммуноблоттинга использовалась для полуколичественной детекции белков. Ткань отделов головного мозга гомогенизировали и центрифугировали тем самым получая растворимую фракцию. Эквивалентное содержание общего белка разделяли при постоянном напряжении в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Затем белки электрофоретически были перенесены на мембрану PVDF (поливинилиденфторид) и блокированы посредством обезжиренного сухого молока или раствора бычьего сывороточного альбумина. После блокировки мембраны инкубировались в присутствии специфических первичных антител. После инкубации мембран в присутствии вторичных антител против IgG кролика или мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена, иммунореактивные белки детектировали посредством сканирования мембран в присутствии хемилюминесцентного субстрата и последующего денситометрического анализа. Искомый белок детектировали 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 фактора нормализации.

Иммуноферментный анализ

Содержание белка BDNF в экстрактах ткани отделов головного мозга было исследовано посредством наборов реактивов для иммуноферментного анализа (Millipore Corp., USA; # CYT306) 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.

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 бицинониновой кислоты (Pierce, USA; # 23227).

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 $p < 0,05$.

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 опийной 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 (Табл. 1, Рис. 1).

Таблица 1 – 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

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. 2).

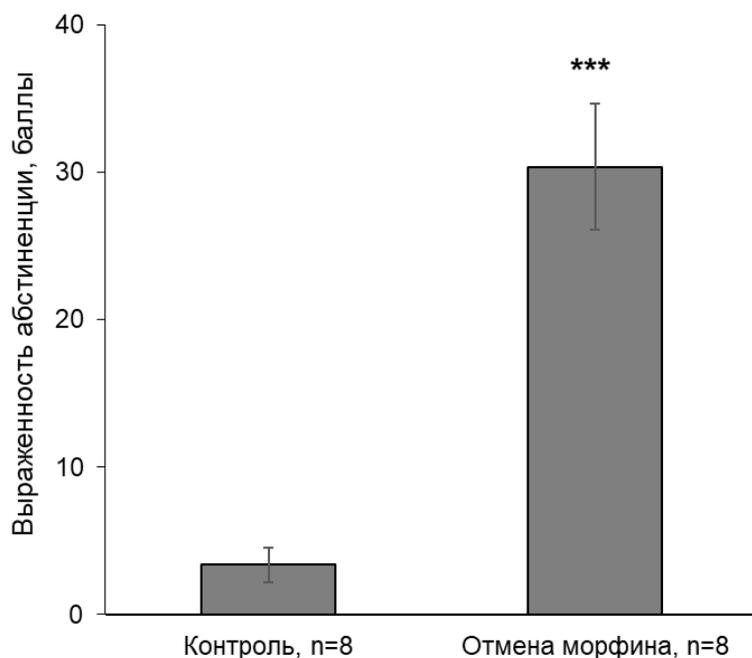


Рисунок 1 – Выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Наблюдаемые признаки регистрировали количественно с дальнейшим присвоением каждому признаку балла (см. таблицу 1 и Rahman et al., 2002). Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: *** - $p < 0,0005$. t- тест Стьюдента.

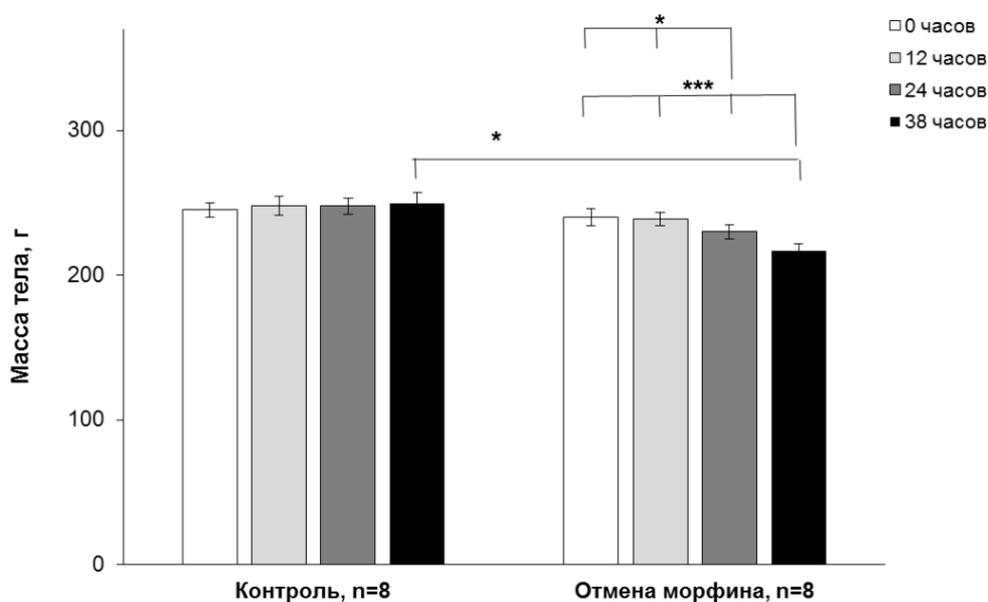


Рисунок 2 – Динамика массы тела животных при отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического ± ошибка среднего. Достоверность различий от указанной группы: * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,0005$. Двухфакторный ANOVA с повторными измерениями и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

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

Уровень мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина

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

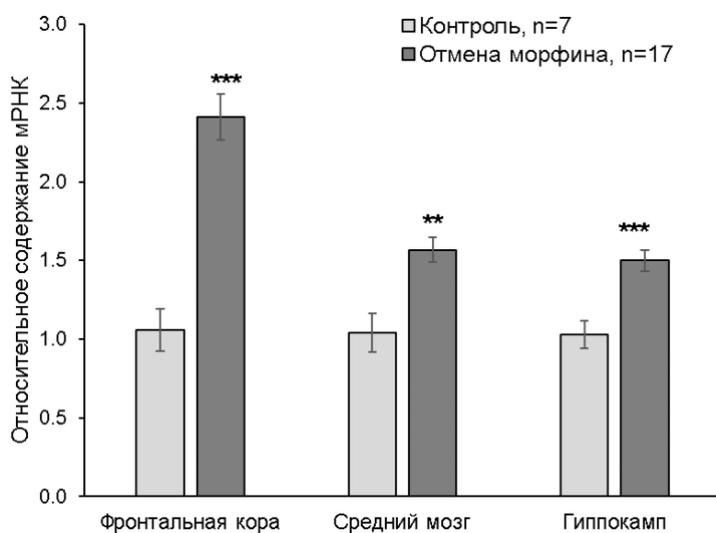


Рисунок 3 – Содержание мРНК BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$. t-тест Стьюдента.

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. 3).

Субхроническое воздействие препаратов опийной 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.

Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при интоксикации и спонтанной отмене морфина

Согласно литературным данным помимо мРНК BDNF, содержащей экзона I, наиболее реактивными экзонами в ответ на разнообразные стимулы являются транскрипты BDNF, содержащие экзоны 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 экзонов IV и VI оставались неизменными (Рис. 4В). Примечательно, что ни при острой (Рис. 4А), ни при субхронической интоксикации (Рис. 4Б) изменения уровня экзон-специфической мРНК BDNF не отмечалось.

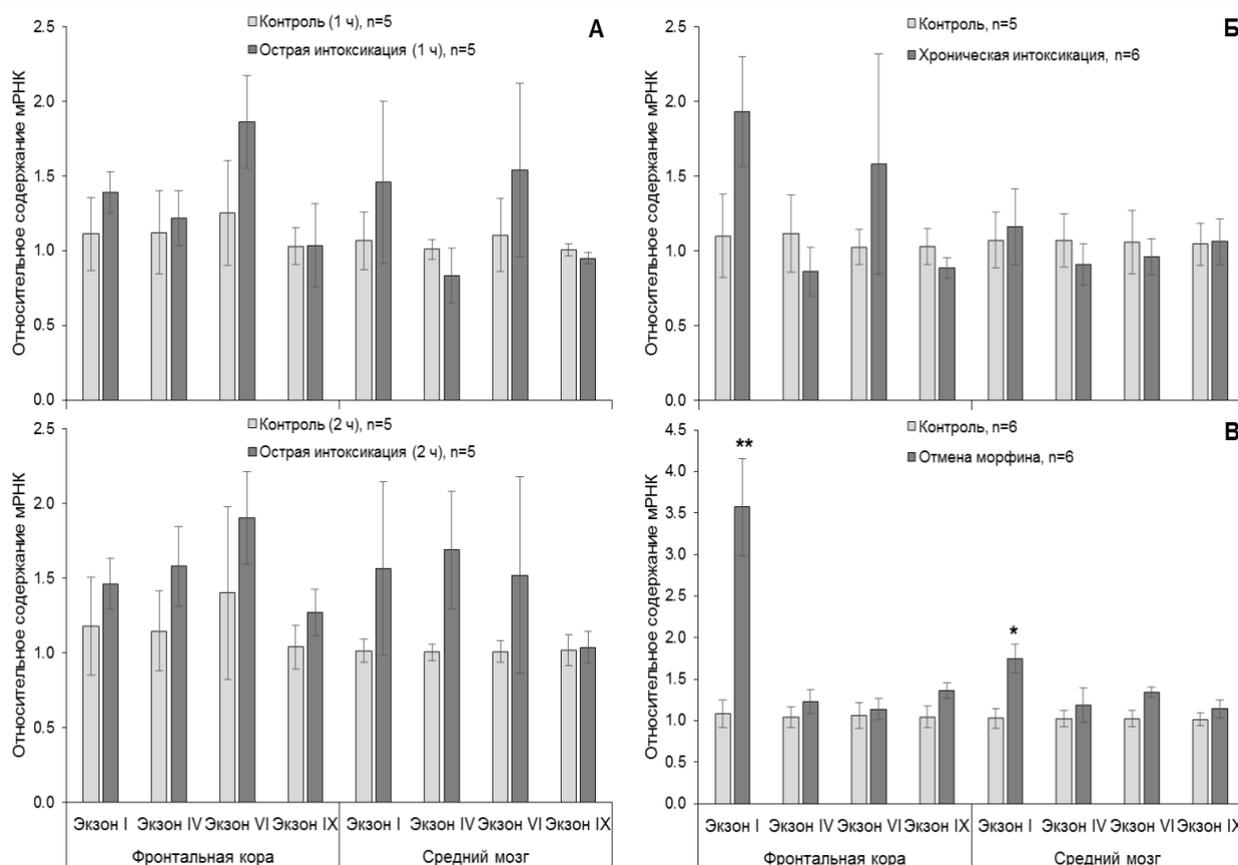


Рисунок 4 – Содержание экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс при острой (А) и субхронической (Б) интоксикации и спонтанной отмене морфина (В). Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$. t-тест Стьюдента.

В основе зарегистрированных изменений уровня мРНК BDNF, содержащей экзоны 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.

Потенциальные транскрипционные механизмы экспрессии гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина

Транскрипционная активность гена BDNF в нервной ткани может определяться балансом взаимодействия транскрипционных факторов и корегуляторов транскрипции с промоторными областями гена, которые могут, как активировать транскрипцию, так и оказывать негативное влияние на данный процесс (Flavell, Greenberg, 2008). Так наиболее изученными регуляторами транскрипции BDNF являются транскрипционный фактор CREB и корегулятор транскрипции MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2). 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 фосфорилированной формы CREB связанной только с промотором экзона I в ФК, тогда как в СМ увеличение уровня связываемости CREB не зависло от экзона (Рис. 5А). При этом в исследованных отделах головного мозга изменений уровня MeCP2 представленного на промоторах BDNF при отмене морфина не отмечалось (Рис. 5Б).

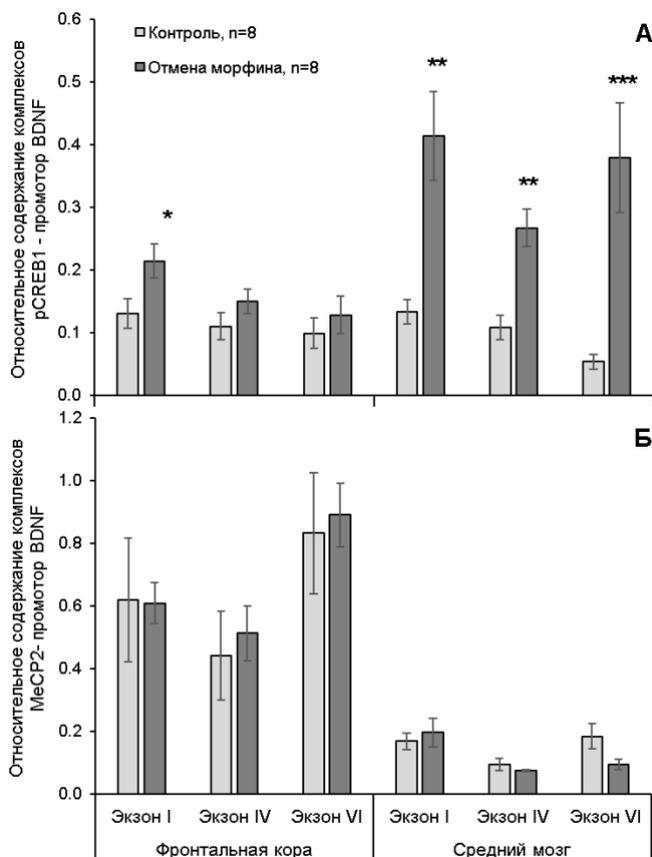


Рисунок 5 – Взаимодействие регуляторов транскрипции CREB (А) и MeCP2 (Б) с промоторами экзонов I, IV и VI гена BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$. 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.

Потенциальные посттранскрипционные механизмы экспрессии BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина

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. 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. 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. 2) и уровня Ago-2, связанного с 3'-UTR мРНК BDNF (Рис. 6). В СМ при абстиненции отмечалось снижение уровня miR-382 (Табл. 2), однако характер взаимодействия Ago-2 с 3'-UTR мРНК BDNF не изменялся (Рис. 6). 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.

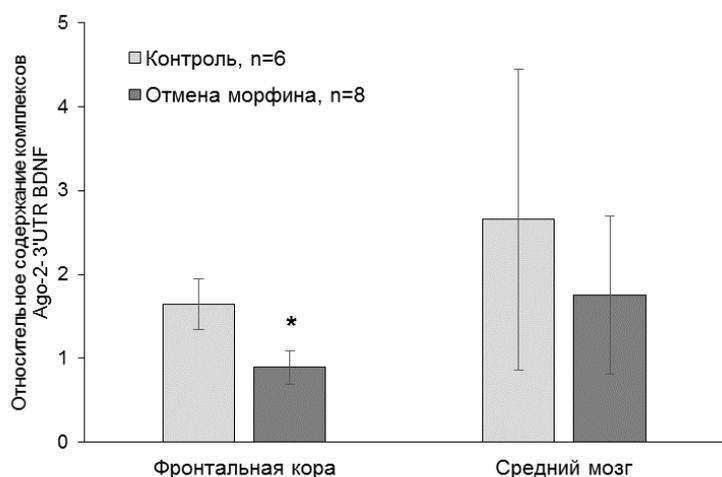


Рисунок 6 – Взаимодействие РНК-связывающего белка Ago-2 с 3'-UTR BDNF в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от контрольной группы: * - $p < 0,05$. t-тест Стьюдента.

Таблица 2 – 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	0,45 ± 0,10 *	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	0,81 ± 0,06 *
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.

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). Посредством иммунопреципитации РНК мы установили, что HuD преимущественно связывается с областями, содержащими последовательности AUUUA (AU-богатые элементы), локализованные в мРНК BDNF с длинной 3'-UTR (Рис. 7). При субхронической интоксикации морфином было выявлено снижение уровня HuD связанного с длинной 3'-UTR мРНК BDNF в ФК, но не СМ (Рис. 7).

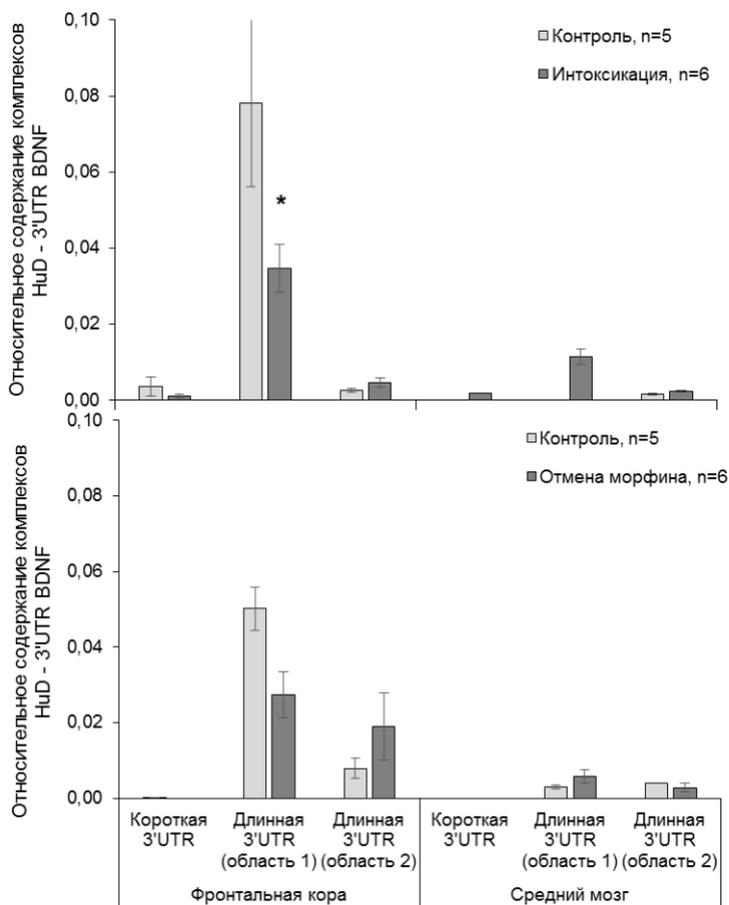


Рисунок 7 – Взаимодействие РНК-связывающего белка HuD с 3'-UTR BDNF в отделах головного мозга крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: * - $p < 0,05$. t-тест Стьюдента.

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. 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). 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.

Сопоставление изменений содержания мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс с уровнем соответствующего белка

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 иммуоферментного анализа, не выявили изменений уровня BDNF в отделах головного мозга, в которых повышался уровень их мРНК (данные не представлены).

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 иммуоферментного анализа не позволяет дифференцированно детектировать формы BDNF далее был проведен анализ содержания форм BDNF в отделах мозга посредством иммуоблоттинга. Было установлено, что в ФК, но не в СМ повышался уровень как про-формы, так и зрелого BDNF (Рис. 8), 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. 8).

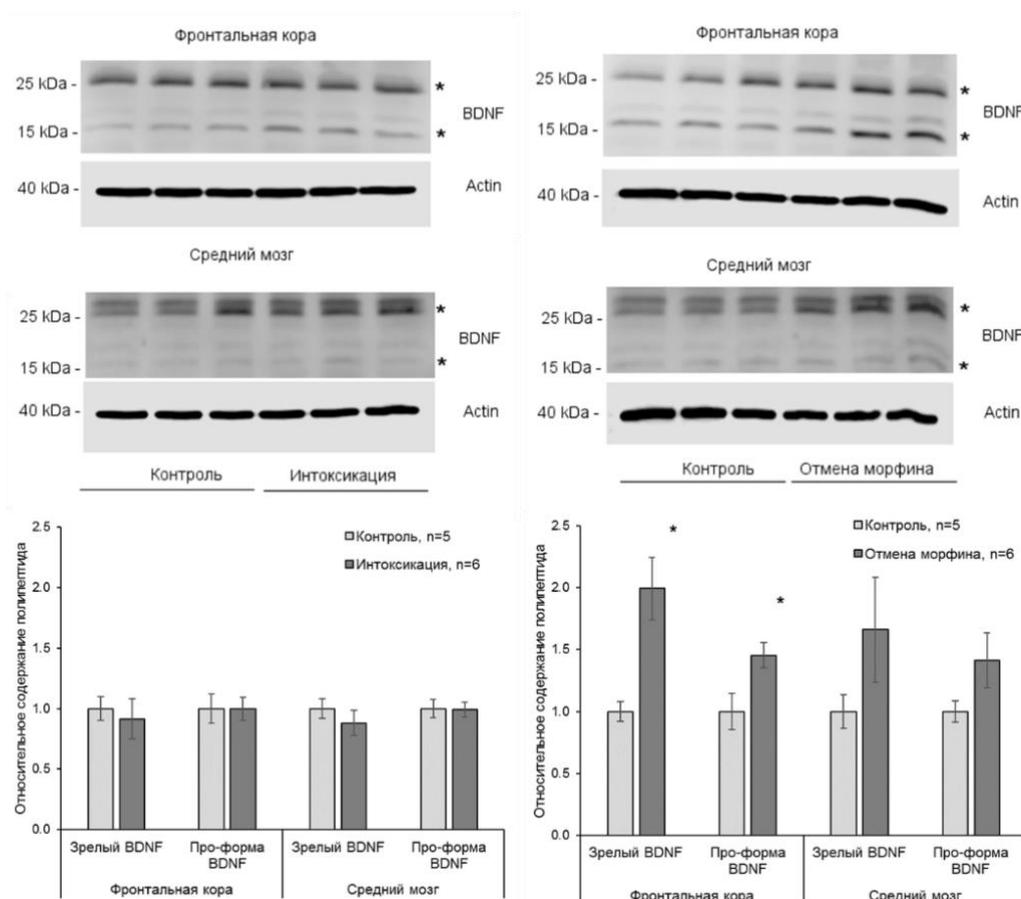


Рисунок 8 – Содержание BDNF на уровне белка во фронтальной коре и среднем мозге крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Верхняя панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. * - области оптической плотности, соответствующие про-форме BDNF (≥ 25 кДа) и зрелой форме BDNF (≥ 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.

Анализ отношения зрелого белка BDNF к про-форме – показатель, который может отражать интенсивность процессинга пептида, не выявил значимых изменений, однако, стоит отметить, в ФК при отмене значения данного показателя повышаются при этом, не достигая статистической значимости (Рис. 9). Полученные результаты отчасти подтверждают данные полученные Vachis и соавт. (2017), которые продемонстрировали увеличение зрелого белка BDNF и про-формы в ФК не только при спонтанной отмене морфина, но и при субхронической интоксикации. Коррел и соавт. (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.

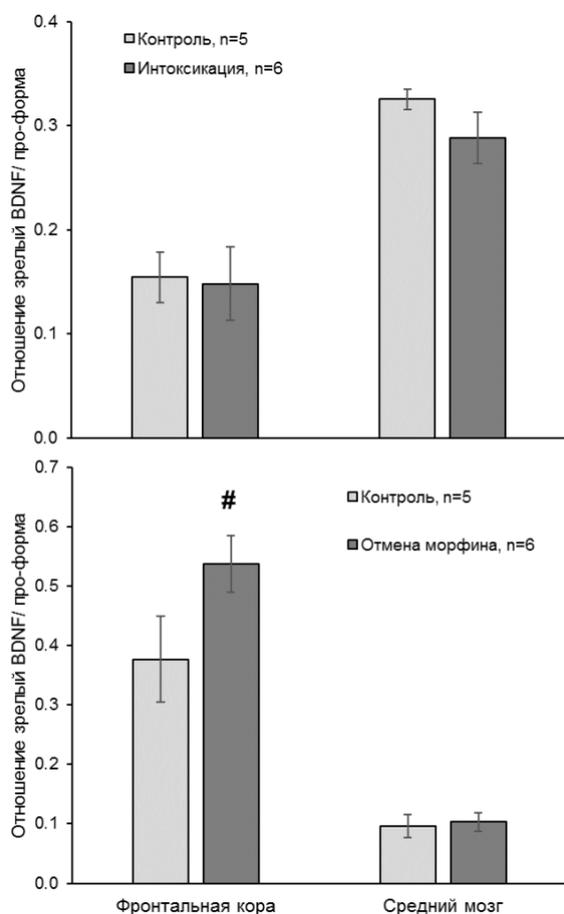


Рисунок 9 – Отношение зрелый белок BDNF/про-форма во фронтальной коре и среднем мозге крыс при субхронической интоксикации и спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий от соответствующей контрольной группы: # - $p < 0,1$. t-тест Стьюдента.

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). 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. 10). 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 соавт. 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.

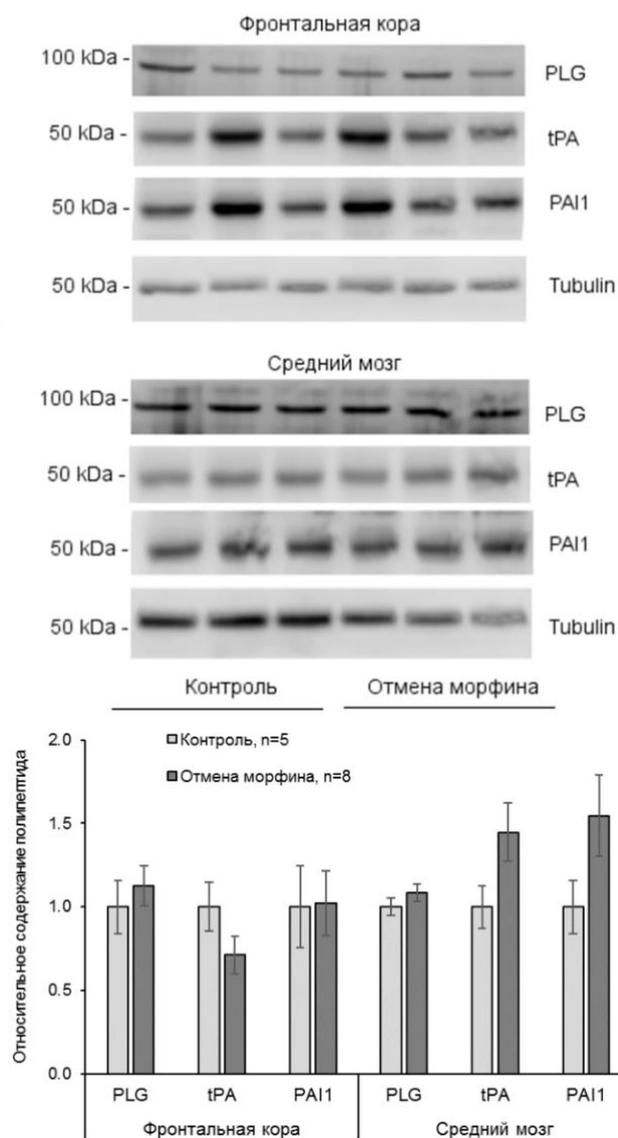


Рисунок 10 – Содержание протеолитического фермента - тканевого плазминогена (PLG), а также его регуляторов активатора тканевого плазминогена (tPA, plasminogen activator, tissue) и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Верхняя панель: репрезентативные данные иммуноблоттинга. Нижняя панель: денситометрический анализ. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего.

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 нитергической системы, такие как активность NOC и концентрацию стабильных метаболитов NO – нитратов и нитритов (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.

Активность нитрергической системы в гиппокампе коррелирует с изменениями поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной абстиненции

Известно, что отмена морфина сопровождается нарушениями эмоционального статуса, в частности, среди прочих отклонений при абстиненции может отмечаться увеличение тревожности (Schulteis 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 анализировали поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при отсроченной отмене, а также взаимосвязь показателей данного типа поведения с активностью нитрергической системы. Было установлено, что спустя 6 дней, но не 3 дня после отмены морфина крысы чаще посещали открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта (Рис. 11В) и дольше в них находились (Рис. 11А), кроме того, меньше времени проводили в закрытых рукавах по сравнению с соответствующей контрольной группой (Рис. 11Б). При этом отмена морфина не сопровождалась изменением двигательной активности в приподнятом крестообразном лабиринте (данные не представлены). Ранее было установлено, что активность NOC повышалась к 3-му дню, а концентрация 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 NO_x^- , но не активности NOC в определенных отделах мозга и поведением животных в приподнятом крестообразном лабиринте при отсроченной отмене. В частности, спустя 6 суток после отмены морфина концентрация 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 $p=0,016$).

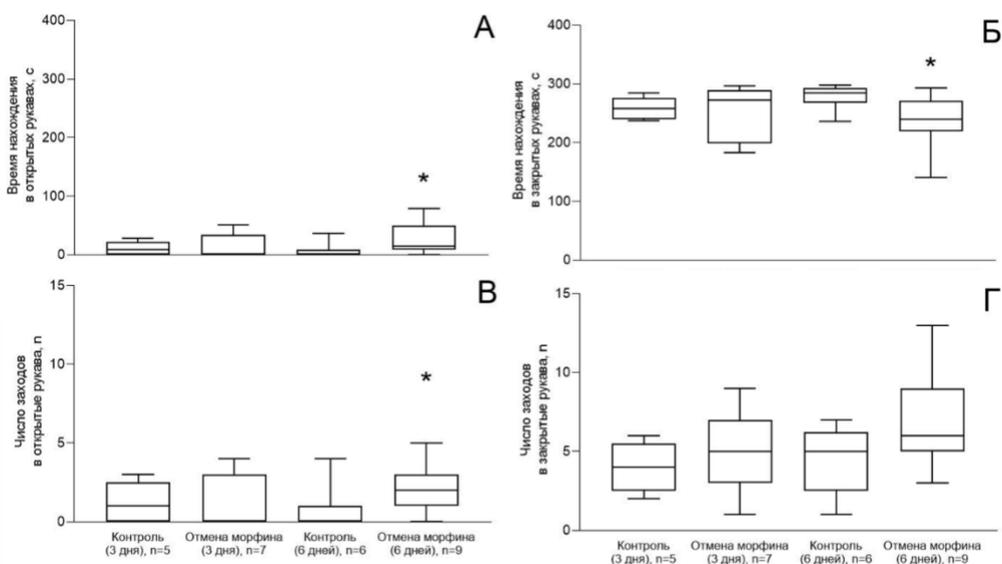


Рисунок 11 – Поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в период отсроченной отмены морфина. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке. * - достоверность различий от соответствующего контроля $p < 0,05$. U-тест Манна-Уитни.

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 соавт. (2001) указывается на увеличение уровня тревожности в условиях внутривентрикулярной 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 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.

Концентрация цГМФ в отделах головного мозга коррелирует с тяжестью спонтанного синдрома отмены морфина

Являясь вторичным посредником NO, запускает внутриклеточные сигнальные каскады, тем самым инициируя клеточный ответ на определенные стимулы, что в конечном итоге обеспечивает физиологическую реакцию. Растворимая гуанилатциклаза является прямой мишенью для NO. NO образует нитрозильные комплексы с гемовым железом, входящим в активный центр данного фермента, что вызывает значительную активацию гуанилатциклазы (Garthwaite, Boulton, 1995). Гуанилатциклаза в свою очередь катализирует образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который является внутриклеточным посредником, регулирующим многочисленные внутриклеточные процессы. Ранее было установлено, что селективный ингибитор гуанилатциклазы 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 том, что у животных с разной степенью выраженности абстинентных расстройств, а, следовательно, и опиоидной зависимости концентрация цГМФ в отделах мозга изменяется по-разному.

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. 12). Тогда как в гиппокампе данный показатель не различался между группами (Рис. 12).

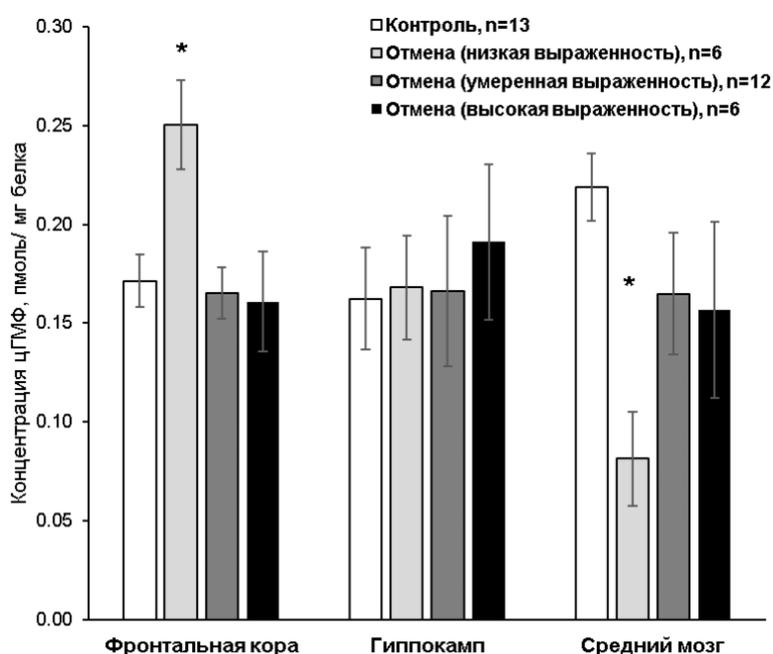


Рисунок 12 – Концентрация цГМФ во фронтальной коре и среднем мозге крыс взаимосвязана с тяжестью абстинентных расстройств. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. * - достоверность различий от группы контроль при $p < 0,05$. Однофакторный ANOVA и тест Тьюки для множественного сравнения средних.

Ранее исследования взаимосвязи между концентрацией цГМФ в отделах головного мозга и выраженностью опиоидной 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.

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

Функциональная роль NO в манифестации спонтанного синдрома отмены морфина у крыс

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 опиной абстиненции. На следующем этапе, посредством фармакологического воздействия мы предприняли попытку оценить прямую роль NO в данном процессе.

С целью выявления прямой функциональной роли NO в реализации опиной абстиненции вводили ингибитор NOC L-NAME на протяжении морфинизации, после чего оценивали выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Согласно ранговому критерию Краскела-Уоллиса ($H_{(3,36)}=26,8$; $p < 0,0001$) введение L-NAME в период морфинизации оказывает достоверное влияние на суммарную выраженность абстиненции (Рис. 13). Последующее проведение теста Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони показало, что при введении L-NAME выраженность спонтанного синдрома отмены значительно увеличивается (Рис. 13). 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 (данные не представлены).

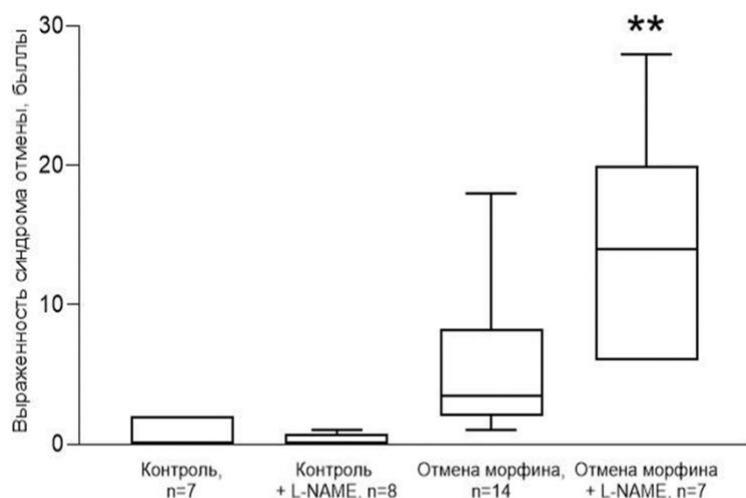


Рисунок 13 – Влияние системного введения ингибитора NO-синтазы L-NAME в период морфинизации на выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке. ** - достоверность различий от группы Отмена морфина при $p=0,005$. Ранговый ANOVA Краскела-Уоллиса и тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Данные литературы относительно роли NO в формировании зависимости и манифестации опиной 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.

NO регулирует содержание и активность BDNF в отделах головного мозга при спонтанной отмене морфина

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. 14А), а также мРНК BDNF гиппокампе (Рис. 14Б) и СМ (Рис. 14В) зарегистрированное при спонтанной отмене снижалось в условиях ингибирования NOС.

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. В частности, ингибирование NOС предотвращает повышение уровня зрелого, но не про-формы BDNF в ФК (Рис. 15А), 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 NOС сопровождалось снижением отношения содержания зрелого пептида к про-форме, однако изменения не достигали статистической значимости (Рис. 15Б). Представляется необходимым отметить, что по результатам данной серии экспериментов (Рис. 15А), 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. 8).

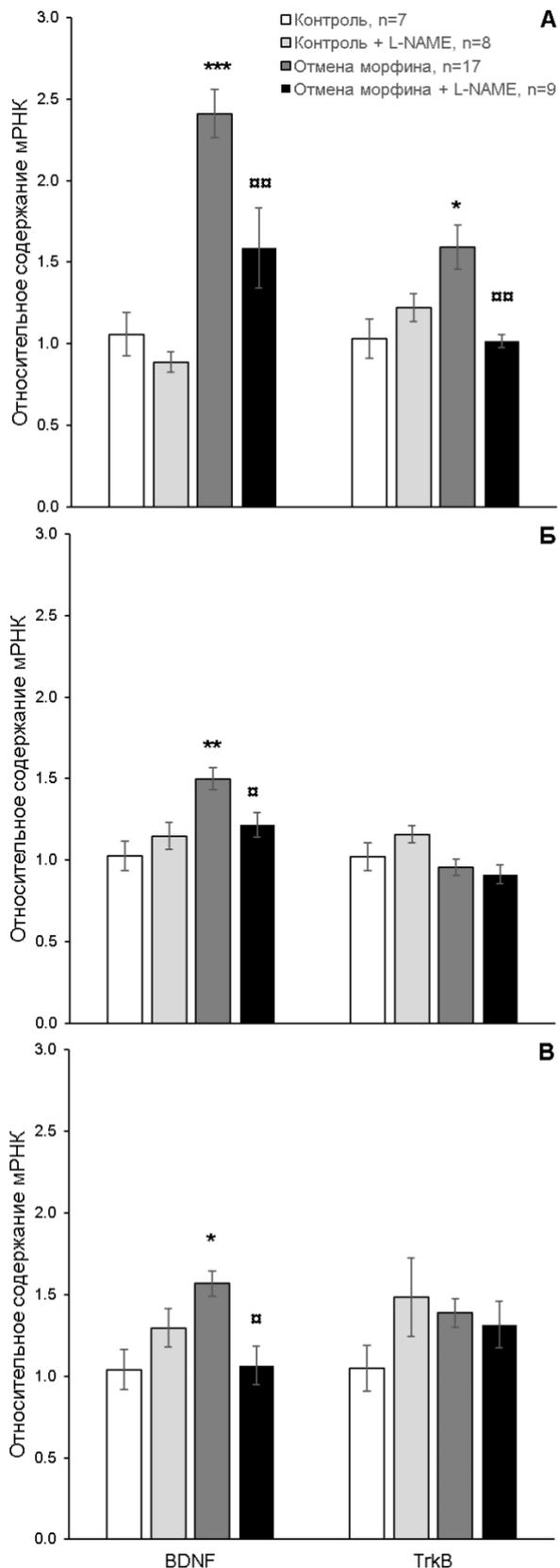


Рисунок 14 – Влияние введения ингибитора NO-синтазы – L-NAME при формировании зависимости от морфина на содержание мРНК BDNF, а также рецептора TrkB во фронтальной коре (А), гиппокампе (Б) и среднем мозге (В) при спонтанной отмене морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка 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.

Активность зрелого пептида BDNF определяется его способностью связываться с рецептором TrkB, что запускает ряд внутриклеточных сигнальных каскадов (Kowiański et al., 2017). TrkB принадлежит к классу рецепторов обладающих тирозинкиназной активностью, который в ответ на связывание лиганда активируется в процессе аутофосфорилирования остатков тирозина, расположенных в каталитическом домене (Kowiański et al., 2017). 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. 15А), ингибирование NOC при формировании зависимости сопровождалось снижением активной формы TrkB при отмене морфина (Рис. 15Б). Также было установлено, что ни отмена морфина, ни NO не оказывают влияние на уровень белка BDNF в гиппокампе и СМ (данные не представлены).

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). 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. 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.

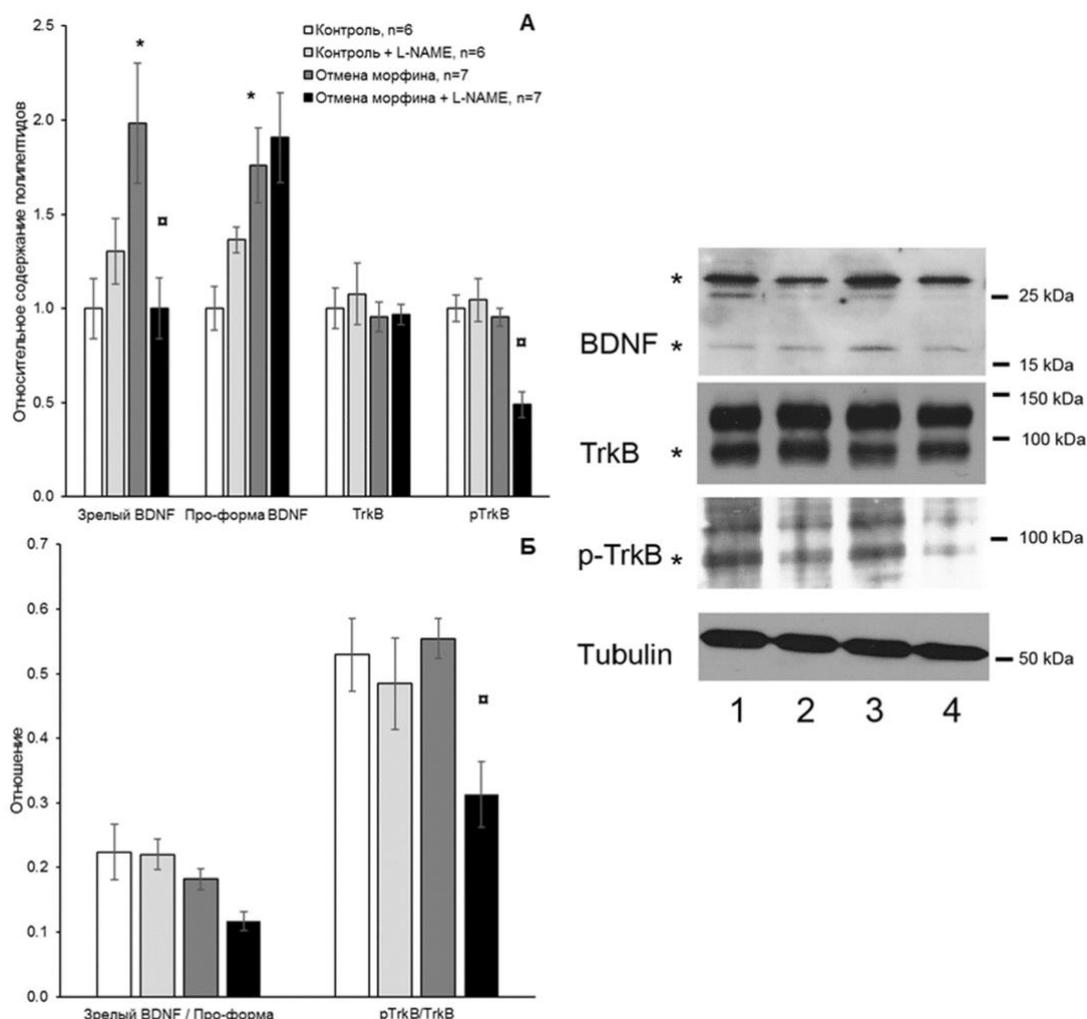


Рисунок 15 – Влияние введения ингибитора NO-синтазы – L-NAME при формировании зависимости от морфина на содержание BDNF, а также рецептора TrkB на уровне белков во фронтальной коре при спонтанной отмене морфина. Левая панель: денситометрический анализ. Данные представлены в виде среднего арифметического \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.

Влияние инъекции BDNF в ВОП на проявления спонтанной отмены морфина

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 опиоидной 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 опиоидной 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). 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. 16).

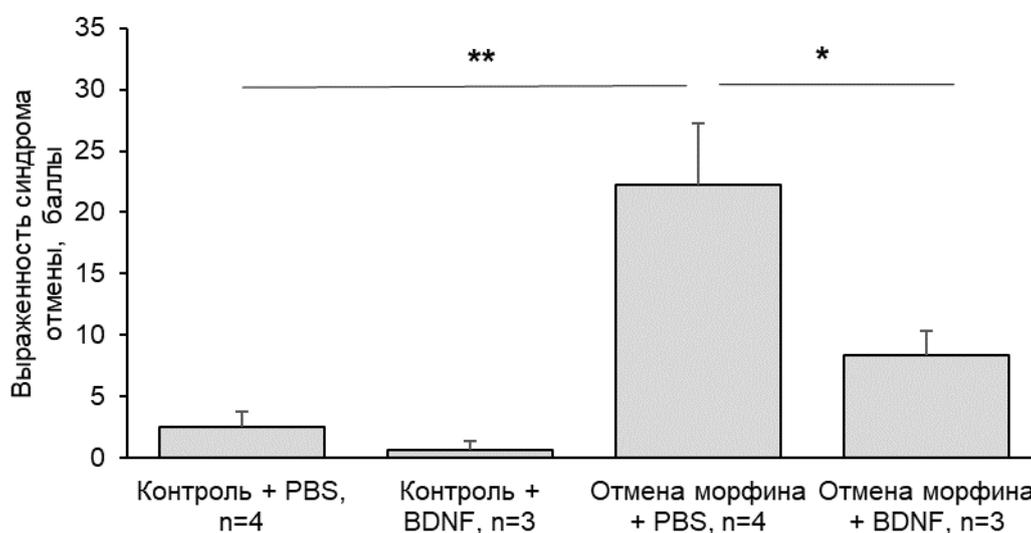


Рисунок 16 – Влияние однократной инъекции BDNF в срединную ВОП на выраженность спонтанного синдрома отмены морфина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий между указанными группами: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$. Двухфакторный ANOVA и тест Тьюки 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; Rezamohammadi et al., 2020; Колик и соавт. 2020).

Влияние инъекции BDNF в ВОП на выработку и воспроизведение условной реакции предпочтения места, ассоциированной с введением морфина

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 оказывать положительное подкрепление.

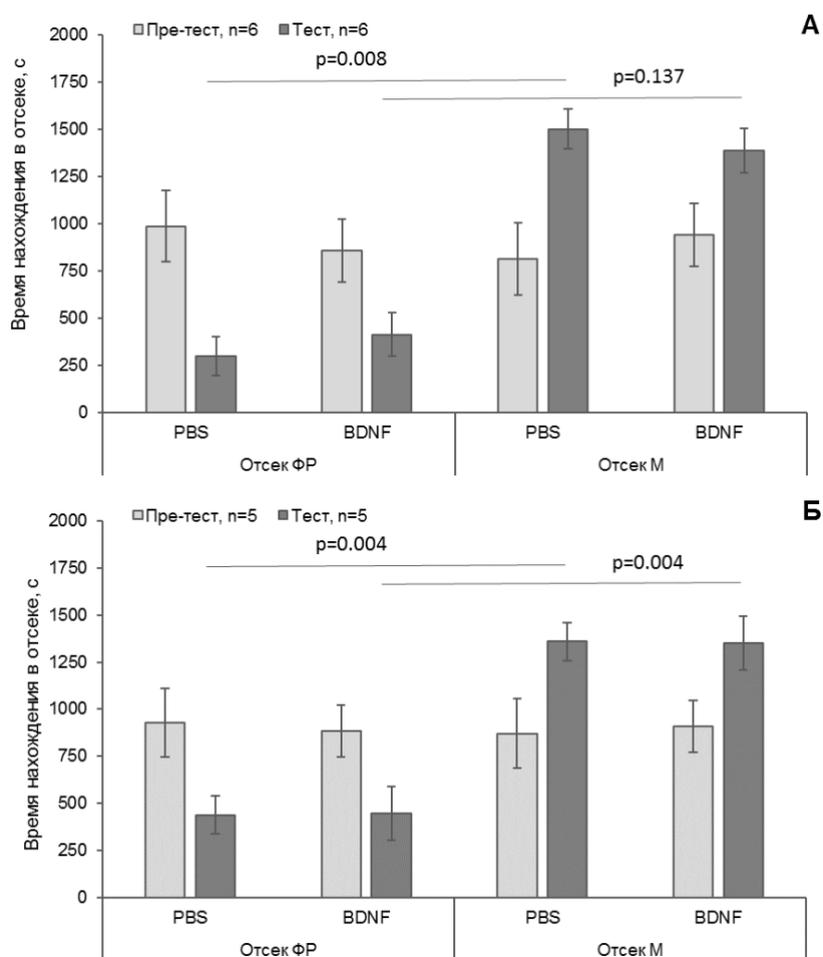


Рисунок 17 – Влияние однократной инъекции BDNF в срединную ВОП на поведение крыс в тесте УРПМ, индуцированной введением морфина. Представлено время нахождения в отсеке, ассоциированном с введением морфина (Отсек М) и отсеке, ассоциированном с введением физиологического раствора (Отсек ФР). Проводили 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.

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. 17). 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. 17А). 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 соавт. на латеральной ВОП (Коо et al., 2012), согласно которым BDNF в латеральной части ВОП подавляет положительный подкрепляющий эффект морфина у мышей. С другой стороны, Vargas-Perez и соавт. (2009) продемонстрировали, что введение BDNF в ВОП крысам стимулирует положительное подкрепление в основе чего лежит опосредованная дофамином передача нервного импульса. Таким образом, учитывая ограничения полученных результатов, с определенной степенью допущения можно полагать, что BDNF в ВОП может предотвращать выработку УРПМ, индуцированной морфином.

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 опийной 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.

Взаимосвязь экспрессии BDNF с паттерном потребления этанола

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. 18). 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. 18). 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 сравнению с сеансами 10-16 ($p < 0,05$) и 17-20 ($p < 0,005$) (Рис. 18). Несмотря на различный паттерн потребления алкоголя в начале реализации модели, данные показатели к ее окончанию не различались между экспериментальными группами. Важно, что подобный паттерн потребления на схожей модели был описан и для крыс-самцов Long-Evans (Ehinger et al., 2021).

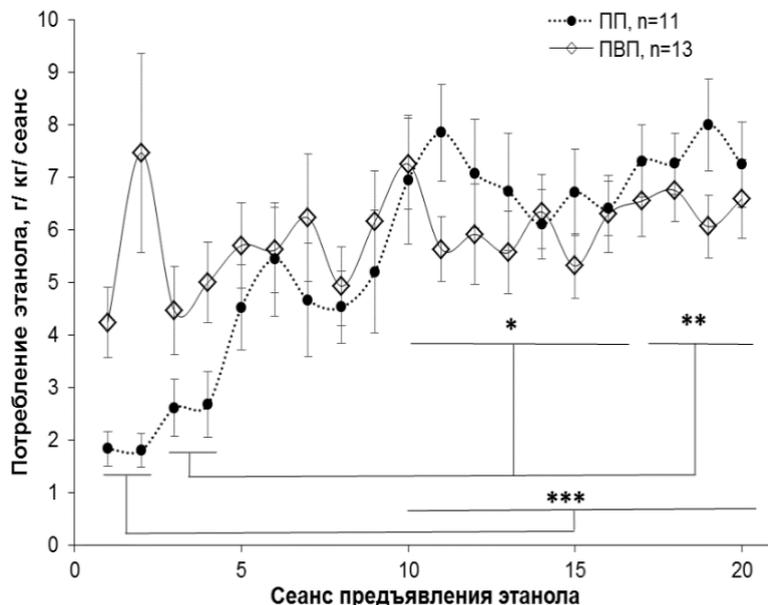


Рисунок 18 – Гетерогенность потребления раствора этилового спирта в модели ПД20%СВ. Крысы демонстрировали стойкое повышение потребляемого алкоголя (повышающееся потребление – ПП) или потребляли спирт на постоянно высоком уровне (постоянно высокое потребление - ПВП). Данные представлены в виде среднего 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.

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. 19Б). В ФК и СМ изменений уровня экзон-специфической мРНК BDNF не отмечалось (Рис. 19А, 19В). Ранее Stragier и соавт. (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).

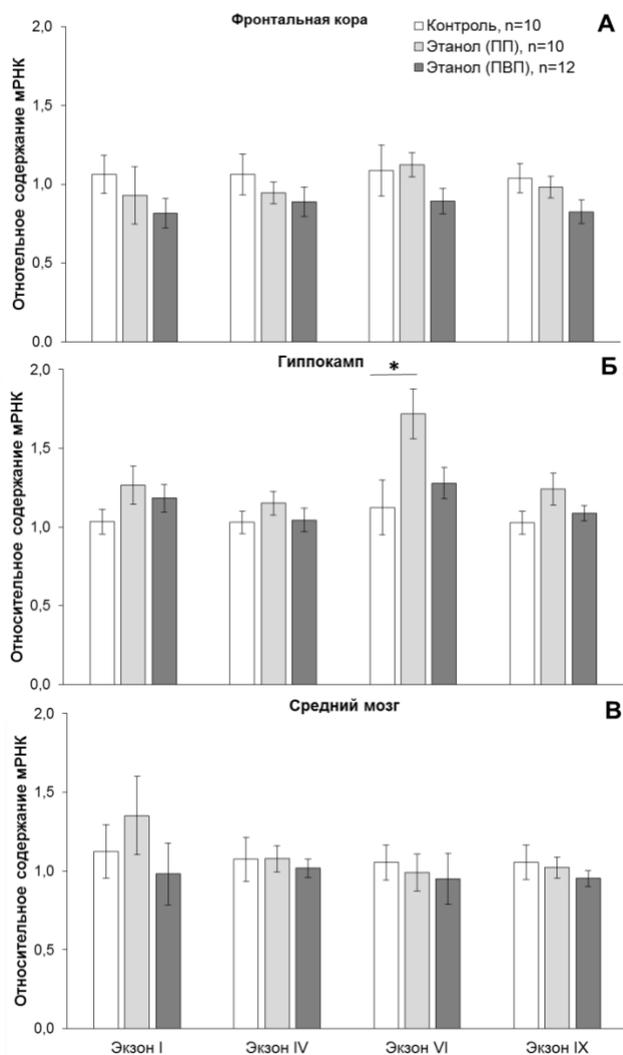


Рисунок 19 – Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс зависит от паттерна потребления этанола в условиях свободного выбора. На основании гетерогенности уровня потребляемого спирта в использованной выборке были выделены 2 группы животных: крысы, демонстрировавшие 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. 20Б). При этом экспрессия мРНК BDNF, содержащей экзоны I и IV, в гиппокампе не изменялась (Рис. 20Б). При острой интоксикации значимых изменений вариантов мРНК BDNF в ФК и СМ зарегистрировать не удалось (Рис. 20А, 20В, 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, префронтальной коре и ВОП крыс; при этом характер изменений зависит от дозы и времени, прошедшего после интоксикации (Raivio et al., 2012).

На следующем этапе мы сопоставили изменения уровня мРНК BDNF, зарегистрированные в гиппокампе крыс, демонстрирующих повышающееся потребление этанола на модели чрезмерного потребления этанола 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 ($F_{(2,29)}=0,312$, $p=0,734$) (Данные не представлены).

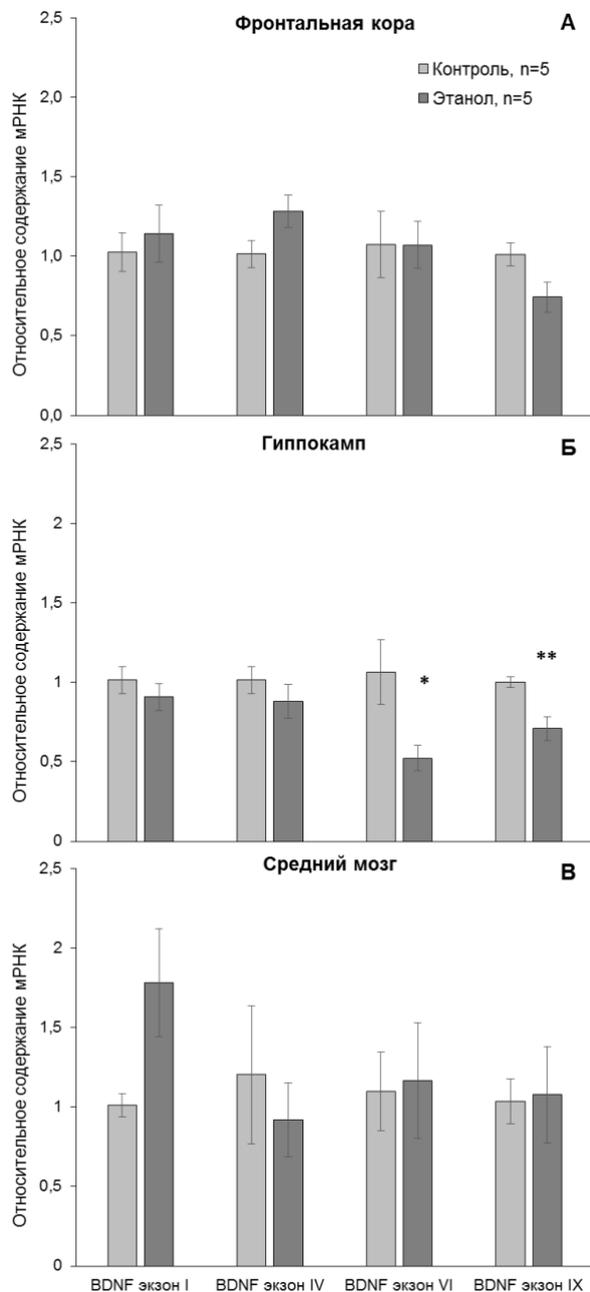


Рисунок 20 – Экспрессия экзон-специфических вариантов мРНК BDNF в отделах головного мозга крыс после острой алкогольной интоксикации. Этиловый спирт вводили однократно внутривенно в дозе 2,5 г/кг, отделы головного мозга исследовали спустя одни сутки после введения. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего. Достоверность различий между группами: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. t-тест Стьюдента для независимых выборок.

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 (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit)) 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. 21B). 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. 21B). 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). 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. 21Г). 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. 21Г). Изменения уровня транскрипционных факторов, представленных в регуляторных участках гена BDNF в гиппокампе выявлено не было (Рис. 21А, 21Б).

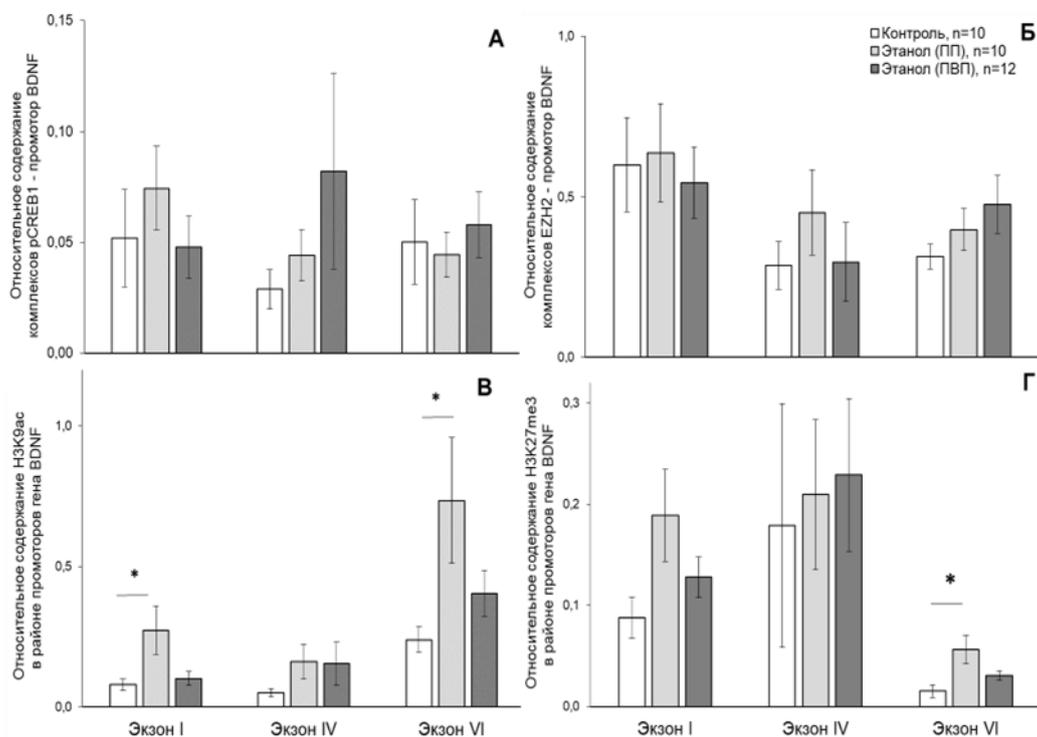


Рисунок 21 – Взаимодействие активатора CREB (А) и репрессора EZH2 (Б) транскрипции с регуляторными участками гена BDNF и особенности гистонового кода (активирующие и ингибирующие посттрансляционные модификации гистона H3: ацетилированный (H3K9ac) (В) и триметилированный (H3K27me3) (Г) соответственно) 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.

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 посттранскрипционном уровне.

Функциональная роль BDNF в регуляции мотивации к потреблению алкоголя и манифестации проявлений алкогольной абстиненции

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-ДГФ; Liu et al., 2016) за 1 ч перед каждым сеансом предъявления алкоголя в модели ПД20%СВ. 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 ($F_{(1,18)}=3,814$, $p=0,067$). Взаимодействие эффектов сеанса предъявления и введения 7,8-ДГФ в отношении потребления этанола также не были статистически достоверны ($F_{(19,342)}=0,677$, $p=0,842$). Можно заключить, что 7,8-ДГФ повышает потребление этанола в модели чрезмерного потребления алкоголя на уровне тенденции (Рис. 22). Тем не менее ранее на схожей модели было продемонстрировано, что однократное внутривентрикулярное введение 7,8-ДГФ ослабляет уровень чрезмерно потребляемого этанола крысами после отмены (Li et al., 2020).

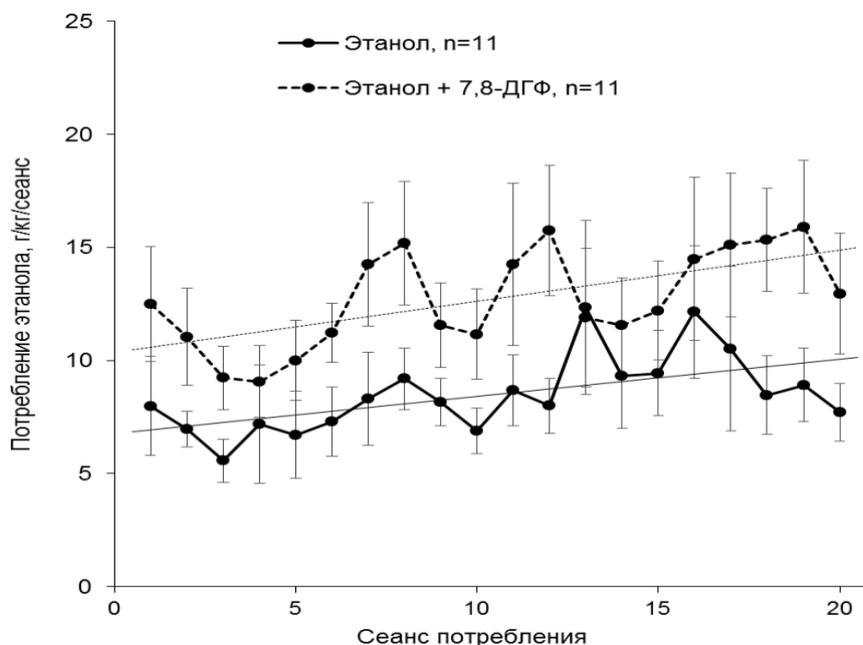


Рисунок 22 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДГФ) на потребление 20% раствора этанола в модели прерывистого доступа в условиях свободного выбора. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибка среднего.

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» (данные не представлены). 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. 23А). При этом различий числа заходов в центральную зону арены установлено не было ($H_{(3,38)}=4,422$, $p=0,219$) (Рис. 23Б). 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. 23А), 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.

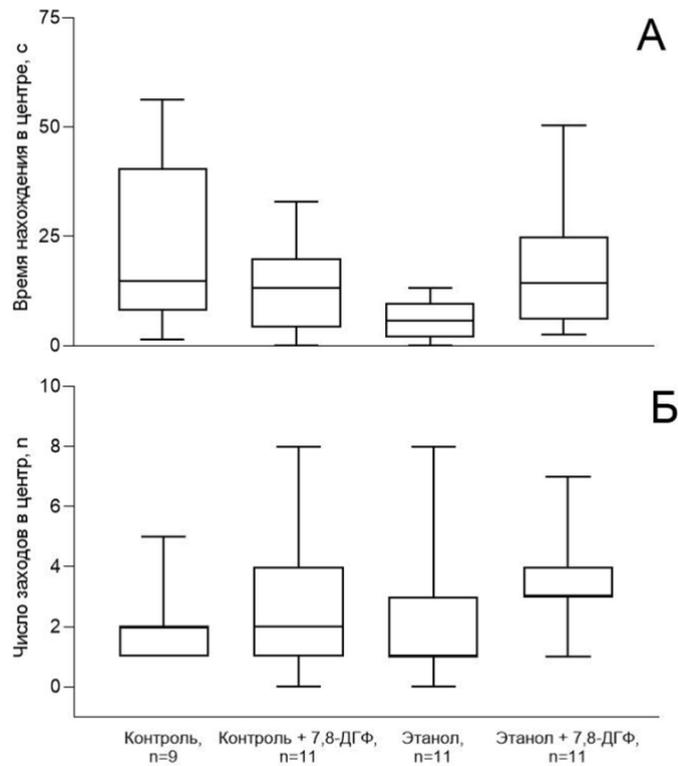


Рисунок 23 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДФФ) на тревожно-подобное поведение в тесте «открытое поле» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке.

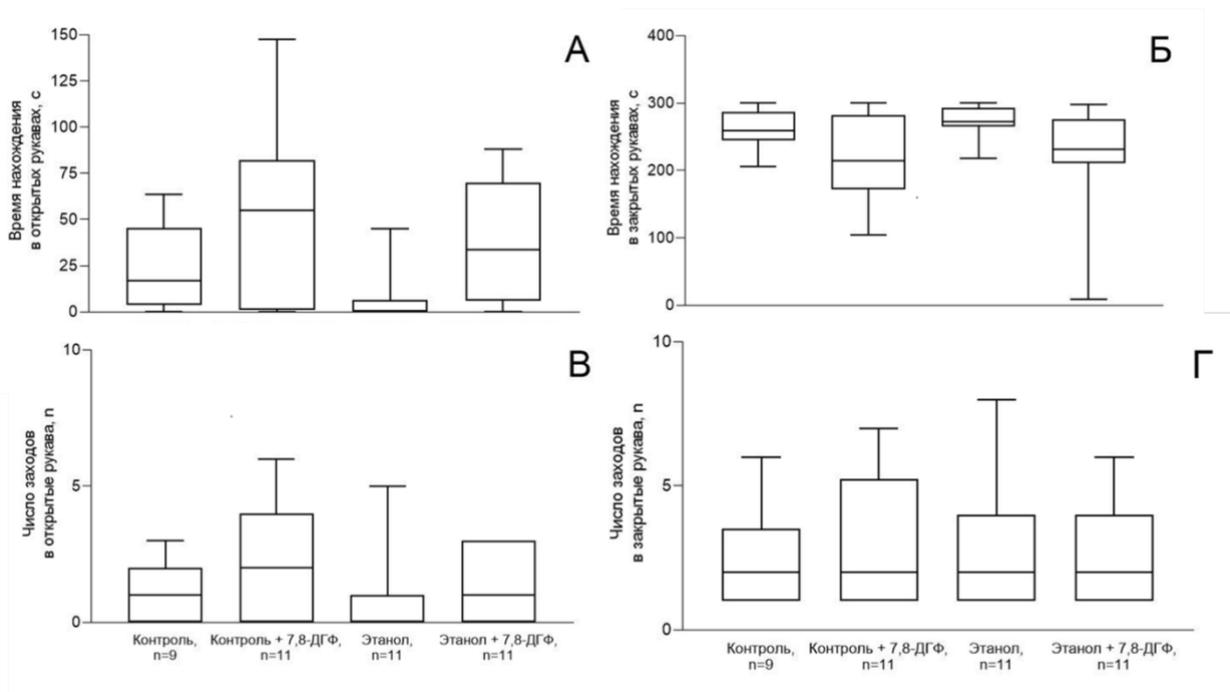


Рисунок 24 – Влияние 7,8-дигидроксифлавона (7,8-ДФФ) на поведение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» при абстиненции после реализации модели ПД20%СВ. Данные представлены в виде медианы, квантилей, максимального и минимального значений в выборке.

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» (данные не представлены). Согласно результатам рангового ANOVA Краскела-Уоллиса предварительное введение 7,8-ДГФ на протяжении алкоголизации оказывает значимое влияние на время нахождения в открытых рукавах лабиринта в острой фазе алкогольной абстиненции ($H_{(3,38)}=9,436$, $p=0,024$) (Рис. 24А). 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. 24А) последующий *post hoc* анализ множественных сравнений с помощью теста Данна не выявил достоверных различий между экспериментальными группами. Различия числа заходов в открытые (Рис. 24В) и закрытые рукава (Рис. 24Г) лабиринта, а также времени нахождения в закрытых рукавах между экспериментальными группами отсутствуют (Рис. 24Б). Можно заключить что, согласно тесту «приподнятый крестообразный лабиринт» введение 7,8-ДГФ 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.

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 описанной 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 Bachis и соавт. (Bachis 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 NOx-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 (Sklair-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 опиоидной 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. 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; Vach 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. 25.

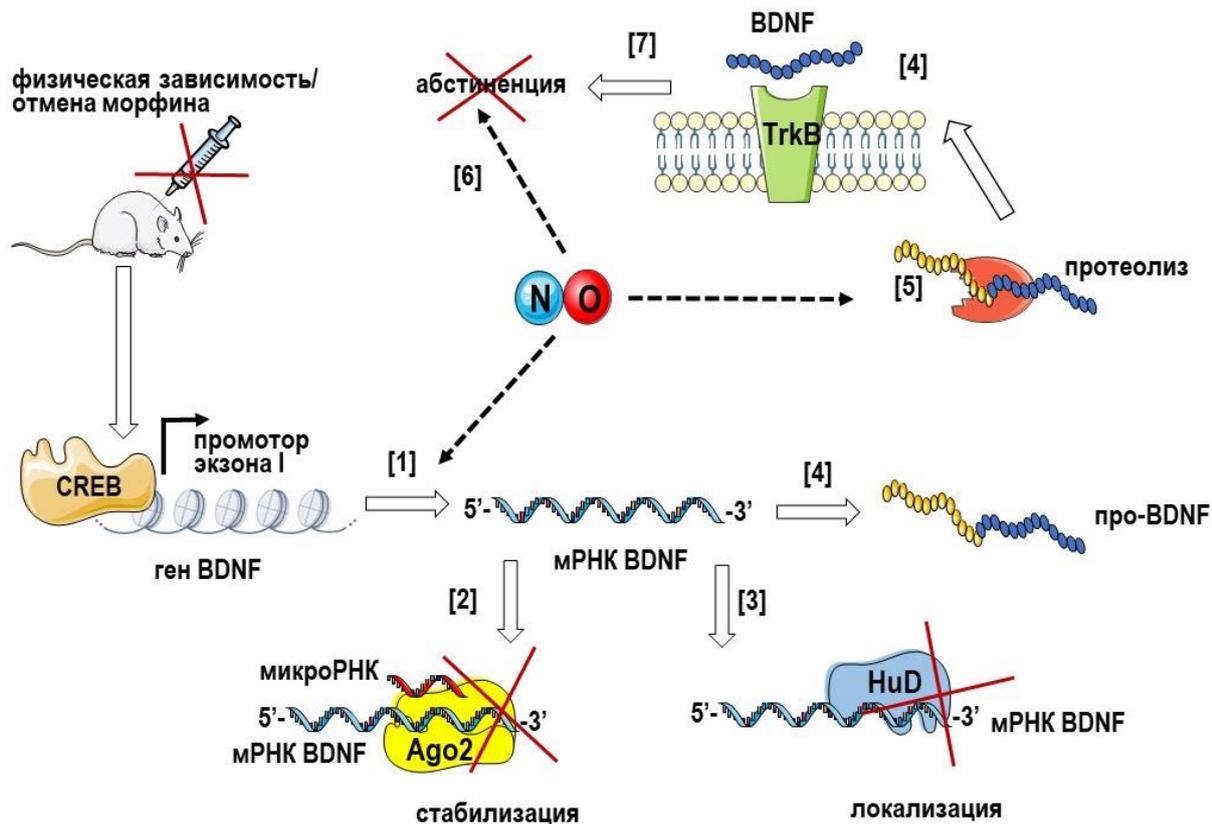


Рисунок 25 – Рабочая схема взаимодействия нейрохимических систем NO и BDNF при отмене морфина. Отмена морфина сопровождается активацией транскрипции BDNF с промотора экзона I: транскрипционный фактор CREB и NO регулируют данный процесс [1]. В условиях абстиненции транскрибированная мРНК BDNF может быть 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].

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 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ЖУРНАЛАХ ВХОДЯЩИХ В SCOPUS, WoS, RSCI, А ТАКЖЕ В ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ В ДИССЕРТАЦИОННОМ СОВЕТЕ МГУ 015.7, ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ «НЕЙРОБИОЛОГИЯ»

1. **Перегуд Д.И.**, Баронец В.Ю., Теребилина Н.Н., Гуляева Н.В. Роль BDNF в нейропластичности при формировании зависимости от алкоголя // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 3. – С. 491-507. (Импакт-фактор = 2.010, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Baronets V.Y., Terebilina N.N., Gulyaeva N.V. Role of BDNF in Neuroplasticity Associated with Alcohol Dependence // Biochemistry (Mosc). – 2023. – V. 88, № 3. – P. 404-416. doi: 10.1134/S0006297923030094. (Impact factor = 2.8, WoS 2022)] (2,0/1,6)*
2. **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. doi: 10.1016/j.neulet.2022.136671. (Impact factor = 2.5, WoS 2022) (1,4/1,0)*
3. **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. doi: 10.1080/00207454.2020.1809395. (Impact factor = 2.2, WoS 2022) (1,4/1,2)*
4. **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. doi: 10.1007/s12031-020-01645-1. (Impact factor = 3.1, WoS 2022) (1,75/1,4)*
5. **Перегуд Д.И.**, Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Нейротрофический фактор мозга в действии опиатов: потенциальные механизмы посттранскрипционной регуляции // Вопросы наркологии. – 2017. – № 2-3. – С. 128-138. (Импакт-фактор = 0.883, РИНЦ 2021) (1/0,75)*
6. **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. (Импакт-фактор = 0.481, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. MicroRNA may regulate the content of the brain-derived neurotrophic factor in the frontal cortex of rats after spontaneous morphine withdrawal // Neurochem. J. – 2016. – V. 10, № 4. – P. 300-307. (Impact factor = 0.5, WoS 2022)] (1,8/1,3)*
7. **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. (Импакт-фактор = 0.680, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Stepanichev M.Yu., Lazareva N.A., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Effects of Single Injections of Brain-Derived Neurotrophic Factors into the Midline Ventral Tegmental Area on the Reinforcing Properties of Morphine // Neurosci. Behav. Physiol. – 2018. – V. 48, № 1. – P. 123-129.] (1,55/1,0)*
8. **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. doi: 10.1007/s10571-015-0267-6. (Impact factor = 4.0, WoS 2022) (1,65/0,8)*
9. **Перегуд Д.И.**, Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Дисбаланс нейротрофического фактора мозга (BDNF) как фактор патогенеза алкогольной зависимости // Вопросы наркологии. – 2016. – № 9-10. – С. 29-41. (Импакт-фактор = 0.883, РИНЦ 2021) (1,1/0,75)*

10. **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. doi: 10.1007/s11064-014-1476-y. (Impact factor = 4.4, WoS 2022) (2,0/1,5)*
11. **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. (Импакт-фактор = 0.883, РИНЦ 2021) (0,8/0,5)*
12. **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. (Импакт-фактор = 0.424, РИНЦ 2021) (0,7/0,4)*
13. **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. (Импакт-фактор = 0.481, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Yakovlev A.A., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Expression of the mRNA of neurotrophins in brain regions of rats after spontaneous morphine withdrawal // *Neurochem. J.* – 2011. – V. 5, № 2. – P. 126-132. (Impact factor = 0.5, WoS 2022)] (1,0/0,75)*
14. **Перегуд Д.И.**, Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Нейробиологические основы предрасположенности к развитию опиной зависимости // *Нейрохимия.* – 2008. – Т. 25, № 3. – С. 179-183. (Импакт-фактор = 0.481, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Neurobiological bases of predisposition to the development of opiate addiction // *Neurochem. J.* – 2008. – V. 2, № 3. – P. 153-156. (Impact factor = 0.5, WoS 2022)] (0,6/0,4)*
15. **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. (Импакт-фактор = 0.577, РИНЦ 2021) [**Peregud D.I.**, Vorontsova O.N., Yakovlev A.A., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Changes in Anxiety in Abstinence Correlate with the State of the Nigrostriatal System in the Rat Hippocampus // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2008. – V. 38, № 5. – P. 443-448.] (1,2/0,7)*

СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, ВХОДЯЩИХ В ПЕРЕЧЕНЬ ИЗДАНИЙ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ

1. **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. – С. 42-50. (Импакт-фактор = 0.655, РИНЦ 2021) (1,5/1,0)*
2. **Перегуд Д.И.**, Панченко Л.Ф., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Онуфриев М.В., Гуляева Н.В. Успехи в исследовании нейротрофического фактора мозга (BDNF) при действии опиатов // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* – 2013. – № 1. – С. 53-58. (Импакт-фактор = 0.375, РИНЦ 2021) (0,8/0,5)*
3. **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 опиной зависимости // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* – 2008. – № 1. – С. 33-36. (Импакт-фактор = 0.375, РИНЦ 2021) (0,65/0,4)*

ГЛАВА В НАЦИОНАЛЬНОМ РУКОВОДСТВЕ

Перегуд Д.И., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Роль нейроактивных полипептидов — нейротрофинов в патогенезе химической зависимости // Наркология. Национальное руководство. под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. - Москва, 2016. - С. 174-185. (1/0,7)*

*– Объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах.

ОСНОВНЫЕ ТЕЗИСЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI

1. **Peregud D.I.,** Yakovlev A.A., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. L-NAME treatment does not attenuate spontaneous morphine withdrawal in rats // Abstracts of 4th conference on advances in molecular mechanisms of neurological disorders (Leipzig, Germany, 11-14 July, 2009). J. Neurochem. – 2009. – V. 110, Suppl. 1. – P.1-106. Abst. 221. (Impact factor = 4.7, WoS 2022)
2. **Peregud D.I.,** Yakovlev A.A., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Panchenko L.F. and Gulyaeva N.V. Changes in cyclic guanosine monophosphate in rat brain regions during morphine withdrawal correlates with abstinence severity // Abstracts of 22th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (Busan, Korea, 23-28 August, 2009). J. Neurochem. – 2009. – V. 110, Suppl. 2. – P.24-66. Abst. MO04-07. (Impact factor = 4.7, WoS 2022)

ОСНОВНЫЕ ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА РОССИЙСКИХ И МЕЖДУНАРОДНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. **Перегуд Д.И.,** Степаничев М.Ю., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Содержание мРНК BDNF в гиппокампе крыс изменяется в зависимости от паттерна алкоголизации. "Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии." Сборник тезисов IV Российской конференции с международным участием (Томск, 22-23 мая 2018). Томск, 2018. С. 117-118.
2. **Перегуд Д.И.,** Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Нейрохимические основы опиной абстиненции: оксид азота и нейротрофические факторы. Тезисы научно-практической конференции с международным участием «Современная наркология: достижения, проблемы, перспективы развития», (Москва, 14-15 июня 2017). Вопросы наркологии 2017. № 6, С.18-19.
3. **Перегуд Д.И.,** Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Содержание мРНК нейротрофического фактора мозга и его рецептора в отделах головного мозга крыс при действии морфина зависит от длительности интоксикации. Тезисы конференции научно-практической конференции с международным участием «Мир аддикций: химические и нехимические зависимости, ассоциированные психические расстройства» (Санкт-Петербург 29-30 ноября 2012). Санкт-Петербург, 2012. С. 105.
4. **Peregud D.I.,** Yakovlev A.A., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Expression pattern of neurotrophic factors and their receptors in rat brain regions during spontaneous morphine withdrawal. Abstracts of 10th World congress of biological psychiatry (Prague, Czech Republic, May 29 – June 2, 2011), 2011. P-01-009.

5. **Перегуд Д.И.**, Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Содержание мРНК нейротрофического фактора мозга повышается в отделах головного мозга крыс при спонтанной отмене морфина. Материалы научно-практической конференции с международным участием «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга». (Ростов-на-Дону, 28-30 сентября 2011), Ростов-на-Дону, 2011. С. 81-82.
6. **Перегуд Д.И.**, Яковлев А.А., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Экспрессия нейротрофинов в головном мозге морфинзависимых крыс при отмене морфина: роль оксида азота. Сборник тезисов всероссийской научно-практической конференции «Совершенствование организации и оказания наркологической помощи населению». (Москва, 20-21 октября 2011), Москва, 2011, С. 88-89.
7. **Peregud D.I.**, Yakovlev A.A., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. Morphine withdrawal is accompanied by region-specific changes in expression of mRNA related to glutamate/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate cascade in rat brain. Abstracts of the 7th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies, (Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2010) FENS Abstr., 2010. V.5, Abst. 108.62.
8. **Перегуд Д.И.**, Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Панченко Л.Ф., Гуляева Н.В. Циклический гуанозинмонофосфат в отделах головного мозга крыс при спонтанном синдроме отмены морфина. Тезисы докладов. Конференция с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга». (Санкт-Петербург – Колтуши, 10-12 сентября 2008), Санкт-Петербург, 2008. С. 106-107.
9. **Peregud D.I.**, Yakovlev A.A., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. The behavior of rats in a forced swim test is a predictor of morphine dependence severity: a potential role of the NO/cGMP cascade. Abstracts of the 6th Forum of the Federation of European Neuroscience Societies (Geneva, Switzerland, July 12-16, 2008). FENS Abstr. 2008. V. 4, Abst. 086.34.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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

7,8-ДГФ – 7,8-дигидроксифлавонол

ВОП – вентральная область покрышки

СМ - средний мозг

УРПМ – условная реакция предпочтения места

ФК - фронтальная кора

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; нейротрофический фактора мозга

CREB – cAMP responsive element binding protein

EZH2 – enhancer of zeste 2

HuD – Hu-antigen D

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

MeCP2 – methyl-CpG binding protein 2

NO – оксид азота

NOS – NO-синтаза

NO_x⁻ – нитраты и нитриты