

На правах рукописи

Шагиахметов Фарид Шамилович

**Нарушение экспрессии генов опиоидной системы мозга в патогенезе
экспериментальной алкогольной зависимости**

14.03.03 — патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва — 2020

Работа выполнена в лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» и в лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Давыдова Татьяна Викторовна – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Шамакина Инна Юрьевна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Котов Александр Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии мотиваций Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина»

Нинкина Наталья Николаевна - доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета Д001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП».
Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИОПП» www.niiopp.ru

Автореферат разослан «.....»2020 г.

И.о. ученого секретаря
Диссертационного совета Д001.003.01
доктор биологических наук

Н.А.Крупина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. По данным ВОЗ, ежегодно около 3 миллионов человек погибает от последствий злоупотребления алкоголем, а среди людей в возрасте 20-39 лет с алкоголем связано примерно 13,5% всех случаев смерти. Помимо медицинских последствий, пагубное употребление алкоголя наносит значительный социальный и экономический ущерб обществу. Вместе с тем, эффективность терапии сформированной алкогольной зависимости на сегодняшний день остается крайне низкой [Castrén et al., 2019]. В связи с этим, все более очевидна важность изучения патогенетических механизмов формирования алкогольной зависимости на ранних этапах ее становления с целью выявления новых фармакологических мишеней и разработки эффективных средств ее лечения и профилактики. В последние годы накоплены многочисленные данные о нарушении функций мезолимбической дофаминергической системы мозга, как ключевом факторе высокого риска злоупотребления алкоголем [Анохина и др., 2010, 2017, 2018; Судаков, 2018; Давыдова и др., 2018; Nestler, 2005; Koob et Volkow, 2016; Volkow et Koob, 2016]. Однако на сегодняшний день остается открытым вопрос о роли модуляторных, прежде всего, опиоидергических механизмов регуляции функций дофаминовой системы на ранних стадиях формирования зависимости. Основное внимание исследователей в последние годы было направлено на изучение роли мю-опиоидных (MOP) рецепторов в механизмах «подкрепления» и формирования зависимости, обосновавших целесообразность применения антагониста MOP рецепторов налтрексона в терапии алкоголизма [Attilia et al., 2018; Palpacuer et al., 2018; Castrén et al., 2019]. Теоретическим основанием использования антагонистов опиоидных рецепторов служат представления о непосредственном участии MOP рецепторов в реализации положительно-подкрепляющего действия алкоголя [Панченко и др., 2002; Котов с соавт., 2003; Блохина с соавт., 2010; Крупицкий с соавт., 2017; Mendez, Morales-Mulia, 2008; Ray et al., 2019]. Однако клинические и экспериментальные данные показывают невысокую эффективность MOP-антагонистов в качестве средства стабилизации ремиссий. При их использовании риск рецидива, согласно последним данным, снижается лишь на 5-10% [Kranzler et Soyka, 2018].

Таким образом, крайне актуальной задачей представляется экспериментальное моделирование и исследование всех звеньев опиоидной регуляции мезолимбической дофаминергической системы на ранних этапах формирования алкогольной зависимости с целью выявления новых мишеней и потенциальных подходов к ее патогенетической терапии.

Цель исследования — изучить особенности экспрессии генов, кодирующих опиоидные рецепторы и их эндогенные лиганды, в мезолимбических структурах мозга у крыс на ранних этапах становления алкогольного предпочтения в условиях свободного выбора между алкоголем и водой.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ распределения мРНК, кодирующей мю (MOP), дельта (DOP), каппа (KOP) и ноцицептиновый (NOP) рецепторы, а также предшественники их эндогенных лигандов — продинорфин (pDyn) и проноцицептин (pNoc) в мезолимбических отделах мозга интактных крыс.
2. Используя экспериментальную модель добровольного потребления алкоголя («свободный выбор»), выделить репрезентативные группы животных с одинаковым низким начальным уровнем предпочтения алкоголя, но различной динамикой его потребления во времени.
3. Сравнить уровень экспрессии мРНК опиоидных рецепторов (MOP, DOP, KOP и NOP) и предшественников опиоидных пептидов — pDyn и pNoc в вентральных областях среднего мозга, вентральных областях стриатума и миндалине мозга крыс с растущим и стабильно низким уровнем предпочтения алкоголя.
4. Изучить возможные сопряженные механизмы регуляции каппа-опиоидной и ноцицептиновой систем в мезолимбических областях мозга крыс с растущим и стабильно низким уровнем предпочтения алкоголя.

Научная новизна работы. В работе впервые проведена сравнительная оценка уровня экспрессии генов, кодирующих опиоидные рецепторы и их эндогенные лиганды, играющие ключевую роль в регуляции активности системы “награды”, у животных со стабильно низким и растущим уровнем предпочтения алкоголя, формирующимся в условиях свободного выбора.

Получены новые данные об особенностях экспрессии генов динорфин/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в зависимости от динамики предпочтения алкоголя. Впервые высказана гипотеза о том, что низкий уровень экспрессии генов KOP и NOP рецепторов и их эндогенных лигандов может являться одним из ключевых патогенетических факторов, определяющих рост добровольного потребления алкоголя.

В работе впервые описаны возможные сопряженные механизмы нарушений опиоидергической регуляции в мозге животных с растущим потреблением алкоголя, а именно, выраженное снижение уровня экспрессии гена дофаминового D1 рецептора в стриатуме и повышение экспрессии гена кортикотропин-релизинг-фактора (CRF) в миндалине.

На основе полученных данных высказано предположение о возможности синергизма динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем в регуляции мотивации и подкрепления. Впервые обсуждаются перспективы сочетанного воздействия на КОР и NOR рецепторы в качестве нового направления в поиске высокоэффективных лекарственных средств лечения алкогольной зависимости.

Практическая и теоретическая значимость. Результаты исследования позволили получить новые знания, необходимые для понимания патогенетических основ становления предпочтения алкоголя в самом начале его потребления. Теоретическая значимость исследования состоит в описании однонаправленного характера изменений экспрессии генов динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем, что предполагает потенциальную возможность их синергизма в регуляции функций мезолимбической нейротрансмиссии в норме и патологии. Можно предположить, что на ранних стадиях становления алкогольного предпочтения, низкий уровень экспрессии генов динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем, наряду с низким уровнем экспрессии гена дофаминового D1 рецептора и высокой транскрипционной активностью гена CRF в миндалине, выступают в качестве патогенетического механизма, определяющего рост алкогольной мотивации. В то же время высокий уровень экспрессии генов динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем может выступать в роли «протективного» фактора, противодействующего росту потребления алкоголя.

Полученные фундаментальные данные указывают на функциональную схожесть динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем, и имеют большое практическое значение, обосновывая необходимость их дальнейшего изучения в качестве единого механизма регуляции мезолимбической системы «награды» и единой мишени для разработки новых лекарственных средств профилактики и лечения алкоголизма.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Использование экспериментальной модели «свободный выбор» позволяет выделить среди крыс с изначально низким уровнем предпочтения алкоголя две

группы животных – сохраняющих этот низкий уровень и увеличивающих потребление в процессе тестирования.

2. На ранних этапах формирования предпочтения алкоголя, рост его добровольного потребления сопровождается низким уровнем экспрессии генов, кодирующих каппа-опиоидный (КОР) и ноцицептиновый (НОР) рецепторы, а также предшественники их эндогенных лигандов — продинорфин (pDyn) и проноцицептин (pNoc), в вентральных областях стриатума и миндалине мозга.
3. Рост добровольного потребления алкоголя не связан с нарушением экспрессии генов мю-опиоидного (МОР) и дельта-опиоидного (ДОР) рецепторов в мезолимбических областях мозга.
4. У крыс с растущим уровнем добровольного потребления алкоголя относительно низкий уровень экспрессии генов каппа-опиоидной и ноцицептиновой систем сопровождается низким уровнем экспрессии гена дофамина D1 рецептора в стриатуме и высоким уровнем экспрессии гена кортикотропин-релизинг фактора (CRF) в миндалине.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Междисциплинарный подход к психическим расстройствам и их лечению: миф или реальность?» (Санкт-Петербург, 2014); 12-й Всероссийской школе молодых психиатров "Суздаль-2015" (Суздаль, 2015); 6-й Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Клязьма, 2015); Российской конференции с международным участием «Биомаркеры в психиатрии: поиск и перспективы» (Томск, 2016); На 10-ом Нейробиологическом форуме Федерации европейского нейробиологического общества (10th FENS Forum of Neuroscience, July 2-6 2016, Copenhagen, Denmark).

Личный вклад автора. Автором проведены разработка основной научной идеи, анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации и планирование исследования. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени и статистическая обработка данных выполнены при непосредственном активном участии автора совместно с П.К. Анохиным – старшим научным сотрудником лаборатории психофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» МЗ РФ. Описание исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором

самостоятельно. Автор сформулировал выводы и опубликовал научные работы, отражающие основные результаты исследования.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в периодических изданиях, соответствующих Перечню ВАК и 3 сообщения в сборниках докладов научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 144 страницах, иллюстрирована 21 рисунком, 5 таблицами. Список цитируемой литературы включает 361 источник, из них 32 отечественных и 329 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Работа выполнялась на аутбредных половозрелых крысах-самцах Wistar (питомник лабораторных животных "Столбовая" ФГБУ "Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства") с соблюдением Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2010) и Принципов надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009). Протокол эксперимента соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных и был одобрен этическими комитетами ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН и ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ. На протяжении всего эксперимента животных содержали в условиях естественной освещенности, при температуре $22 \pm 2^\circ \text{C}$. В качестве пищевого рациона использовали гранулированный корм (ГОСТ Р 50258-92).

Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой потребления алкоголя. Задачей этого этапа исследования было формирование групп животных с одинаковым изначальным уровнем предпочтения алкоголя, но с различной динамикой его потребления во времени. Для изучения индивидуальных показателей динамики добровольного потребления раствора этанола и оценки изменений предпочтения алкоголя во времени крыс-самцов с изначальной массой 230–250 г

помещали в индивидуальные клетки (435x275x155мм) в условия «свободного выбора» между двумя поилками, содержащими 10% водный раствор этанола и воду (Рис. 1).

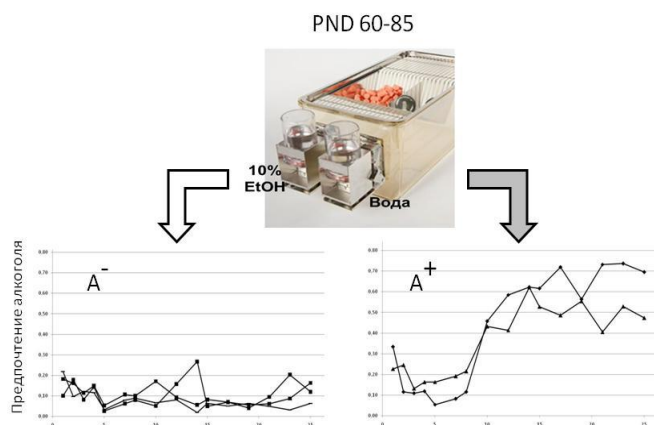


Рис.1. Схема отбора животных с постоянно низким и растущим уровнем потребления алкоголя в модели «свободный выбор» между 10% раствором этанола и водой

Потребление алкоголя и воды измеряли ежедневно путем взвешивания поилок, уровень потребления этанола рассчитывали в г/кг массы тела животного. Уровень предпочтения алкоголя оценивали как отношение массы потребляемого раствора этанола к общей массе потребляемой жидкости (в %). Для формирования репрезентативной выборки было проведено 3 серии экспериментов, в каждой из которых использовано по 40 животных. Критерием отбора «предпочитающих» алкоголь животных для дальнейшего исследования экспрессии генов служило достоверное увеличение среднесуточного потребления/предпочтения алкоголя животными на последней неделе (с 18 по 25 дни) по сравнению с показателями среднесуточного потребления/предпочтения алкоголя на первой неделе тестирования (группа A⁺). В качестве группы сравнения были использованы животные с постоянно низким уровнем потребления алкоголя (группа A⁻). Чтобы избежать влияния изначальных вкусовых или обонятельных предпочтений на потребление алкоголя, для дальнейшего изучения экспрессии генов не использовались животные с изначально высоким уровнем потребления (среднесуточный показатель более 5 г/кг в первую неделю тестирования) и «отвергающие» алкоголь животные (менее 1 г/кг/сутки в первую неделю тестирования).

Области мозга, выбранные для исследования. Для выделения структур мозга животных декапитировали, структуры мезолимбической системы – вентральные отделы среднего мозга, стриатума и миндалину (Рис. 2) выделяли на льду, замораживали в жидком азоте и в дальнейшем хранили при температуре -70°C .

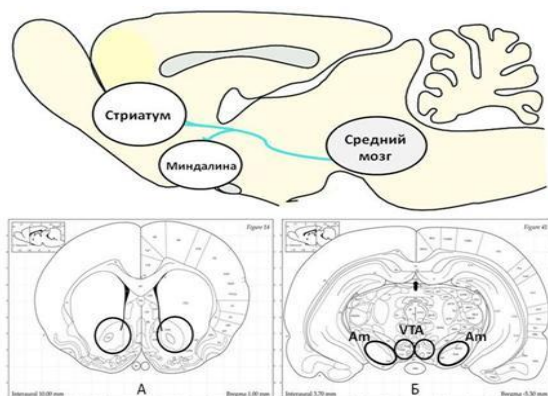


Рис.2. Структуры мезолимбической системы – вентральный стриатум (А), средний мозг (вентральная покрывка – VTA) и миндалина (Am) (Б) (*Paxinos et Watson, 1986*).

Количественное определение экспрессии генов было основано на трех последовательных операциях: выделение тотальной РНК из образцов ткани мозга, проведение реакции обратной транскрипции с получением к-ДНК, проведение реакции амплификации в режиме реального времени.

Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора «RNeasy Lipid Tissue Mini Kit» (QIAGEN, США). Образцы замороженных структур мозга (40-50 мг ткани) гомогенизировали в 1 мл лизирующего раствора (QIAzol Lysis Reagent), добавляли 200 мкл хлороформа (“Fluka”, США), и центрифугировали при 4°C при 12.000 g в течение 15 мин на центрифуге “Eppendorf 5804R”. К супернатанту добавляли 400 мкл 70% этанола и наносили на колонку (RNeasy column) и центрифугировали при 4°C и 10.000 g (“Eppendorf 5804R”). Дальнейшие этапы очистки и элюирования РНК проводили согласно инструкциям производителя (QIAGEN, США). Аликвоты водного раствора РНК по 50 мкл замораживали и хранили при –70°C до следующих манипуляций. **Концентрацию РНК** определяли на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer (Германия) при 260 нм в кювете с длиной оптического пути 1 мм. Значение концентрации РНК в исходном растворе выражали в мкг/мкл. Чистоту препарата РНК определяли по отношению поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм, а также 260 нм и 230 нм. Качество выделения РНК определяли посредством электрофореза в 1%-ном агарозном геле (“Promega”, США) на 1× TAE буфере (2 mM ЭДТА, 20 mM CH₃COOH, 40 mM Tris, pH 8.3), окрашенном бромистым этидием (1 мкг/мл; “AppliChem,” Германия), по наличию в ультрафиолете двух полос, соответствующих 28 и 18S РНК.

Синтез к-ДНК осуществляли с использованием набора «Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Fermentas). К водному раствору тотальной РНК (1 мкг РНК в 11 мкл воды) добавляли 1 мкл Random hexamer – праймеры и инкубировали 5 мин. при +65°C (Thermo Shaker PST-60HL, BioSan, Латвия), после чего сразу помещали на лёд. Обратную

транскрипцию проводили в объёме 20 мкл: к смеси «РНК-матрица + праймеры» добавляли 4 мкл 5х буфера (10 мМ буфер Tris-HCl, pH 8.3, 25 мМ KCl, 0,6 мМ MgCl₂, 2 мМ дитиотреитол), 1 мкл ингибитора РНКазы (RiboLock RNase Inhibitor), 2 мкл 10 мМ dNTP и 1 мкл ревертазы (RevertAid M-MuLV Reverse transcriptase, 200 ед./мкл), перемешивали и инкубировали 5 мин при 25⁰С и затем 60 мин при 42⁰С. Фермент инактивировали нагреванием до 70⁰С в течение 5 мин. кДНК разводили деионизированной водой и хранили при -70⁰С.

Уровень экспрессии мРНК определяли, используя полимеразную цепную реакцию после обратной транскрипции (RT-PCR) в режиме реального времени на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQTM5 (BioRad, Германия). Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ и 5 мкл 5х реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия) в течение 40 циклов (исходная денатурация матрицы – 3 мин при 95⁰С; денатурация – 15 сек при 95⁰С; отжиг праймеров – 15 сек при 60⁰С; элонгация – 30 сек при 72⁰С) с последующим анализом кривых плавления полученных продуктов амплификации. Для проведения RT-PCR были использованы специфические олигонуклеотидные праймеры (ДНК-синтез, Россия): MOP – F: gtagtgggcctcttcggaac, R: gttggtggcagctcttcatttg; DOP – F: tgggtcttgcttcaggtgt; R: cgtgcataccactgctccat; KOP – F: tcaggaagatgtggatgtcaatt, R: tgaagaggccaccaggaa; NOP – F: gagaccgtacccaccacctg, R: cccgatgcaccagccaag; продинорфин (pDyn) – F: cagcggactgectgtcctt, R: tcagggtgagaaaagacaaaag; проноцицептин (pNoc) – F: aagcggttcagtgagtttatg; R: cacctggatgctcatggg; D1 рецептор – F: ctctgatgtgttggtggtt; R: tcttcctcttcaggctctcag; CRF – F: ctgtgcctgtctgccttgc, R: gttgctggggctgctccggt; CRFR1 – F: ctctgggatgctggagcgatcca, R: cagtgaccaggtagttgat; β-актин (референс) – F: cactgccgcatcctcttct, R: aaccgctcattgccgatagtg.

В качестве отрицательного контроля служили пробы, содержащие вместо матрицы соответствующий объем воды. Измерения проводили не менее чем в 3 параллельных образцах. Для наблюдения за ходом реакции и регистрации данных использовали компьютерную программу «Opticon Monitor 3.1». Целостность и специфичность продуктов амплификации подтверждали, проводя электрофорез в 2,0%-ном горизонтальном агарозном геле на 1×TAE буфере, окрашенном бромистым этидием по наличию полосы, соответствующей фрагменту ожидаемой длины. Для визуализации результатов использовали трансиллюминатор (UVC Inc., USA) и систему геледокументирования (Gel Imager-2, Helicon, Россия) (Рис.3).

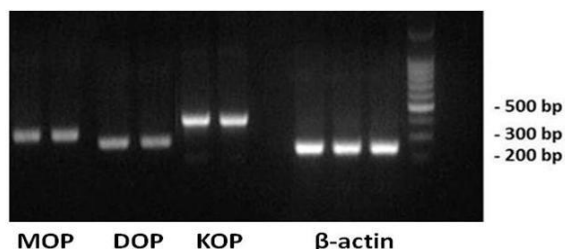


Рис.3. Электрофорез продуктов RT-PCR в 2,0%-ном агарозном геле.

Дизайн исследования

Серия 1. Определение относительного уровня мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в различных областях мезолимбической системы интактных животных. Исследование проводили на половозрелых самцах Wistar (n=10), находившихся с 60-го по 85-й дни жизни в индивидуальных клетках при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Животные были декапитированы в возрасте 85 дней, структуры мезолимбической системы выделяли и использовали в дальнейшем для анализа экспрессии генов.

Серия 2. Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя. На этом этапе были сформированы группы животных с одинаковым изначальным уровнем предпочтения алкоголя, но с различной динамикой его потребления во времени по ранее описанной схеме. Через 25 дней тестирования в модели «свободный выбор» животных декапитировали, структуры мезолимбической системы выделяли на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . В дальнейшем полученные образцы были использованы для:

- 1) *определения относительного уровня экспрессии мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в мезолимбической системе животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.*
- 2) *определения относительного уровня экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора в стриатуме, CRF и CRF1 рецептора в миндалине животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.*

Статистическая обработка данных. Расчет относительной экспрессии проводили на основании сравнительной оценки величин Ct (threshold cycle), получаемых после проведения ПЦР. Для сравнения уровней экспрессии интересующих генов в опыте и контроле использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 8.0» («Statsoft», США). Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты представлены в виде значений среднего \pm ошибка среднего. Для проверки достоверности различий в потреблении этанола был использован

двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений с последующим апостериорным (post-hoc) анализом. Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали t-критерий Стьюдента. Для выявления статистической взаимосвязи между количественными показателями экспрессии мРНК и уровня потребления алкоголя рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r). Статистически значимыми считались значения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительный уровень экспрессии мРНК MOR, DOR, KOR, NOP рецепторов и опиоидных пептидов – продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы интактных животных

Данная серия экспериментов была проведена на интактных крысах для сравнительного анализа экспрессии мРНК MOR, DOR, KOR, NOP рецепторов и опиоидных пептидов – продинорфина и проноцицептина в вентральной области среднего мозга – области локализации тел дофамин-синтезирующих нейронов, вентральной области стриатума и миндалине – основных структурах-мишенях дофаминергических нейронов.

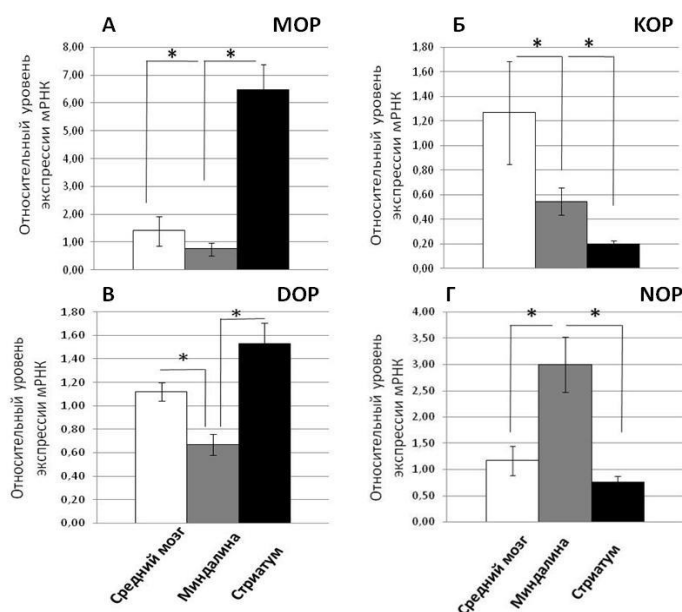


Рис.4. Относительный уровень экспрессии мРНК MOR (А), KOR (Б), DOR (В) и NOP (Г) рецепторов в среднем мозге, миндалине и стриатуме интактных животных.

По оси ординат – относительные показатели экспрессии мРНК. * $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента). Количество животных $n=10$.

Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК MOR и DOR рецепторов детектировался в стриатуме. Показатель экспрессии мРНК MOR рецептора в этой структуре был в 6,0 и 6,2 раза выше по сравнению со средним мозгом и миндалиной соответственно ($p < 0,05$; t-критерий Стьюдента) (Рис.4А и 4В). Полученные результаты согласуются с данными литературы: показано, что только 28% MOR и 30% DOR рецепторов стриатума в мозге крыс локализовано на пресинаптических окончаниях

дофаминергических нейронов (т.е. кодируются мРНК, локализованной в среднем мозге), и 72% – на телах нейронов стриатума [Trovero et al., 1990]. Таким образом, полученное соотношение уровня мРНК MOP рецептора в этих структурах соответствует картине локализации самих рецепторов. Экспрессия мРНК DOP также была максимальной в стриатуме, однако разница в уровне мРНК DOP рецептора между исследуемыми областями мозга была менее выражена, чем для MOP рецептора (Рис.4В). Показатель экспрессии мРНК DOP рецептора в среднем мозге в наших исследованиях составил 52% от уровня экспрессии в стриатуме. Эти результаты не противоречат литературным данным, показавшим присутствие мРНК DOP рецептора как в черной субстанции (SN), так и в вентральной покрывке среднего мозга, что обеспечивает участие этих рецепторов в регуляции двигательной активности, обучения моторным навыкам, импульсивности, механизмах мотивации и положительного подкрепления [Pellissier et al., 2018]. Для каппа-опиоидного рецептора (KOP) получена обратная картина распределения мРНК между структурами по сравнению с MOP и DOP. Максимальный уровень экспрессии мРНК KOP рецептора детектировался в среднем мозге (Рис.4Б). Показатель экспрессии мРНК KOP в миндалине был в среднем в 2 раза, а в стриатуме в 5 раз ниже по сравнению со средним мозгом ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента). MOP/DOP и KOP рецепторы представляют две функционально антагонистичные друг другу системы, обеспечивающие функции системы «награды» («reward system») и её отрицательной регуляции («anti-reward system») [Koob et al., 2013]. Предполагают, что KOP рецепторы могут быть непосредственно ассоциированы с дофамин-транспортным белком (DAT) на пресинаптических окончаниях, причем активация KOP потенцирует активность DAT и, как следствие, усиливает обратный захват дофамина [Thompson et al., 2000].

Наименее изучена роль ноцицептинового рецептора (NOP) в механизмах формирования аддиктивного поведения. На Рисунке 4Г видно, что у интактных животных наиболее высокий уровень экспрессии мРНК этого рецептора детектировался в миндалине. Показатель экспрессии мРНК NOP рецептора в среднем мозге был в среднем в 3 раза, а в стриатуме в 3,2 раза ниже по сравнению с миндалиной ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента). Высокий уровень экспрессии мРНК NOP и, соответственно, высокая плотность NOP рецепторов в миндалине мозга животных [Andero et al., 2013] могут объяснять их роль в генезе тревожных расстройств и аддиктивного поведения. Однако в настоящее время нет ясного понимания роли NOP в механизмах действия алкоголя и формирования зависимости.

Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя. Задачей этого этапа исследования было

формирование групп животных с одинаковым изначальным уровнем потребления алкоголя, но с различной динамикой потребления во времени. Рост предпочтения алкоголя у крыс в условиях «свободного выбора» рассматривался в качестве показателя роста алкогольной мотивации на ранних этапах формирования экспериментального алкоголизма [Green et Grahame, 2008; Gilpin et Koob, 2008].

По результатам исследования были выделены две группы животных. Начиная с 7-го дня тестирования уровень предпочтения алкоголя (отношение массы потребляемого раствора этанола к общей массе потребляемой жидкости) рос в группе A^+ , оставаясь на стабильном уровне в группе A^- (Рис.5). Исходные показатели предпочтения алкоголя между группами достоверно не различались. Показатели среднесуточного исходного (Дни 1 – 7) и конечного (Дни 18–25) уровня *потребления* алкоголя составляли: в группе A^+ : $3,2 \pm 0,2$ и $7,2 \pm 0,9$ г/кг (* $p < 0,05$, ANOVA для повторных измерений), а в группе A^- : $3,0 \pm 0,6$ и $3,6 \pm 0,4$ г/кг соответственно. Показатели исходного и конечного *предпочтения* алкоголя составляли: в группе A^+ : $0,35 \pm 0,026$ и $0,50 \pm 0,041$ (* $p < 0,05$), а в группе A^- : $0,32 \pm 0,046$ и $0,3 \pm 0,03$ соответственно. В группе A^- показатели потребления и предпочтения алкоголя в начале и конце тестирования достоверно не различались.

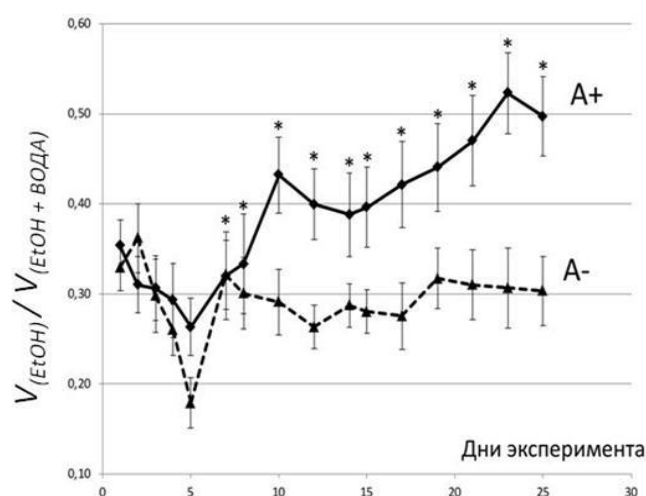


Рис.5. Динамика предпочтения алкоголя в экспериментальных группах.

A^- – крысы со стабильно низким уровнем предпочтения этанола ($n=14$); A^+ – крысы с растущим уровнем предпочтения этанола ($n=12$).

По оси ординат – средний по группе показатель предпочтения этанола ($V_{(EtOH)} / V_{(EtOH + ВОДА)}$), * $p < 0,05$ – по отношению к соответствующему показателю в группе A^- .

Описанные особенности динамики предпочтения алкоголя в группах не были связаны с различиями в общем объеме потребляемой жидкости или массе животных в процессе тестирования (Рис.6).

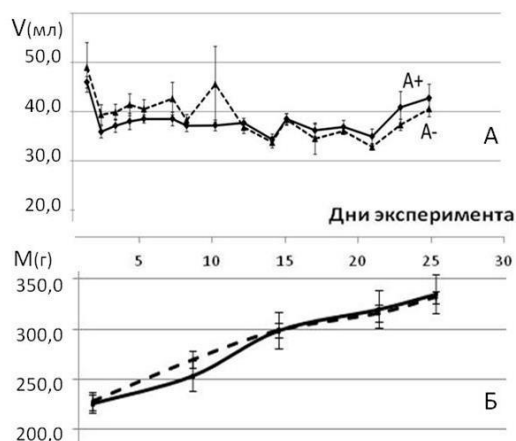


Рис.6. Динамика общего суточного объема потребляемой жидкости (А) и массы тела животных (Б) в экспериментальных группах.

А: по оси ординат – средний по группе показатель потребления жидкости ($V_{\text{ЕЮН}} + \text{ВОДА}$),

В: по оси ординат – масса животных в граммах

Обозначения как на Рис.5.

Задачей следующего этапа исследования было установить различия между исследуемыми группами животных в уровне экспрессии мРНК белков опиоидной системы в ключевых мезолимбических структурах мозга, ответственных за формирование мотивации поиска и потребления алкоголя.

Относительный уровень экспрессии мРНК MOR, DOR, KOR, NOP рецепторов и опиоидных пептидов – продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы крыс с различной динамикой добровольного потребления алкоголя

Вентральная область среднего мозга. Уровень экспрессии генов MOR, DOR, KOR и NOP рецепторов в среднем мозге достоверно не различался в исследуемых группах. Однако была установлена тенденция к повышенной экспрессии мРНК MOR и сниженной экспрессии мРНК KOR рецептора в группе животных A^+ по сравнению с группой A^- (Рис.7). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК эндогенных лигандов KOR и NOP рецепторов продинорфина и проноцицептина также не наблюдалось (данные не приведены). Показано, что одним из механизмов активации этанолом дофаминергической нейротрансмиссии может служить освобождение β -эндорфина, активирующего MOR рецепторы, локализованные на ГАМКергических нейронах вентральной покрышки (VTA) среднего мозга и, как следствие, дисингибирование дофаминергических нейронов и освобождение дофамина в областях-мишенях [Berrettini, 2016]. Динорфин (Dyn) является антиподом β -эндорфина: введение Дун или агонистов KOR оказывает аверсивное, протисфорическое и депрессогенное действие у человека и у животных [Shippenberg et al., 2007]. Активация KOR, локализованных на телах и пресинаптических окончаниях дофаминовых нейронов VTA, наблюдается при действии алкоголя и, как полагают, лежит в основе эффекта его «последствия» [Chavkin and Koob, 2016].

Однако, несмотря на то, что MOR и KOR рецепторы, локализованные на телах и пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов среднего мозга, являются доказанной мишенью действия этанола, мы не обнаружили достоверных различий в экспрессии кодирующих их генов в этой области мезолимбической системы между исследуемыми группами.

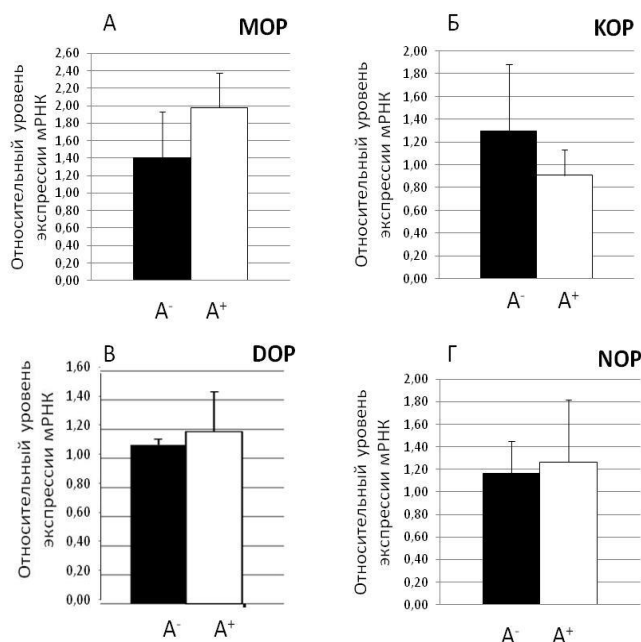


Рис.7. Относительный уровень экспрессии мРНК MOR (А), KOR (Б), DOR (В) и NOP (Г) рецепторов в среднем мозге животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.

A⁻ – крысы со стабильно низким уровнем предпочтения этанола (n=14);

A⁺ – крысы с растущим уровнем предпочтения этанола (n=12).

По оси ординат – относительные показатели экспрессии мРНК. *p<0.05 (t-критерий Стьюдента).

Выявленная тенденция к снижению уровня мРНК KOR не противоречит ранее полученным данным о 85%-ном снижении уровня мРНК KOR в вентральной покрывке среднего мозга после 2-х недельной алкоголизации крыс (2 г/кг, 2 раза в сутки, i.p.) [Rosin et al.,1999], что может быть объяснено более высокой «уязвимостью» KOR-зависимого механизма регуляции в этой области мозга при использовании принудительного, а не добровольного пути алкоголизации.

Вентральный стриатум. В вентральном стриатуме не наблюдалось различий в уровне мРНК ни одного из типов опиоидных рецепторов. Вместе с тем, показаны достоверно более низкие уровни мРНК продинорфина (в 2,9 раз) и проноцицептина (в 1,4 раза) у крыс A⁺ по сравнению с группой A⁻ (Рис.8). Можно предположить, что недостаток эндогенных лигандов KOR и NOP рецепторов может быть компенсирован введением синтетических агонистов этих рецепторов. Действительно, показано подавление положительно-подкрепляющего эффекта этанола, формирования условно-рефлекторного предпочтения места и добровольного потребления алкоголя у грызунов под действием селективных агонистов каппа опиоидных рецепторов [Logrip et al., 2009; Aziz et al., 2016].

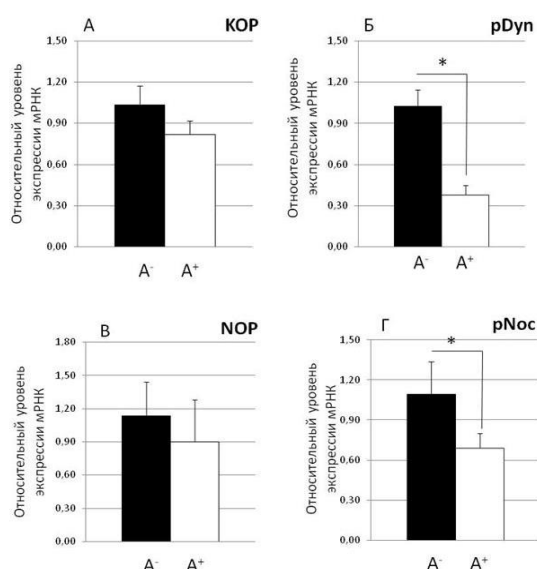


Рис.8. Относительный уровень экспрессии мРНК KOR (А), pDyn (Б), NOP (В), pNoc (Г) в стриатуме животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.

Обозначения как на Рис.7.

* $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

В нашей работе не было выявлено изменений в экспрессии мРНК MOR и DOR рецепторов в стриатуме на ранних стадиях формирования экспериментальной зависимости (данные не приведены). Противоречивость результатов исследований, полученных с использованием ПЭТ, показавших как увеличение [Mitchell et al., 2012], так и снижение плотности MOR рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом [Hermann, et al., 2017] свидетельствуют против целесообразности применения блокатора MOR рецепторов налтрексона на ранних стадиях формирования алкогольной зависимости.

Миндалина. В миндалине животных группы A⁺ экспрессия мРНК KOR и NOP рецепторов, а также продинорфина, была достоверно ниже, чем в группе A⁻ в 3,1, 1,7 и 2 раза соответственно (Рис.9). Различий между группами в уровне экспрессии генов MOR и DOR рецепторов и проноцицептина не наблюдалось.

Согласно литературным данным, введение этанола и острая экспозиция стрессу вызывают освобождение динорфина в CeA [Karkhanis et al., 2017]. Локальное введение динорфина непосредственно в миндалину мозга сопровождается аверсивным поведением и усиливает тревогу [Carlezon et Krystal, 2016]. Учитывая центральную роль миндалины мозга в генезе отрицательных аффектов тревоги, страха и поведения, степень повышения уровня динорфина в ответ на воздействие алкоголя в данной структуре, может определять выраженность его отрицательных подкрепляющих эффектов. Можно предположить, что снижение уровня экспрессии мРНК pDyn в миндалине мозга крыс A⁺ косвенно свидетельствует о снижении аверсивных свойств алкоголя в этой группе животных.

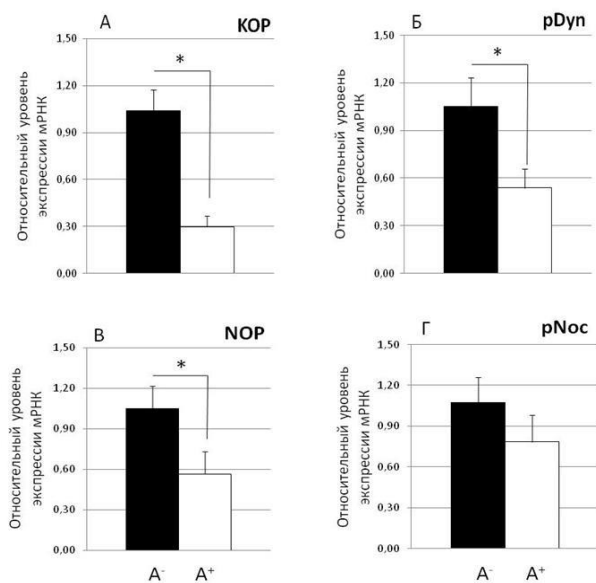


Рис.9. Относительный уровень экспрессии мРНК KOP (А), pDyr (Б), NOP (В), pNoc (Г) в миндалине животных с различным уровнем предпочтения алкоголя.

Обозначения как на Рис.7.

* $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента для независимых выборок).

Таким образом, наиболее выраженные изменения наблюдались в стриатуме (снижение уровня мРНК эндогенных лигандов KOP и NOP – pDyr и pNoc) и в миндалине (снижение уровня KOP, NOP и pDyr) животных с растущим уровнем потребления алкоголя.

Возможные сопряженные механизмы регуляции KOP/Dyr и NOP/Noc в стриатуме и миндалине мозга.

Снижение уровня мРНК pDyr в *стриатуме* животных с высоким уровнем потребления алкоголя может быть обусловлено нарушением функций дофаминового рецептора первого подтипа (DRD1). Показано, что динорфин-позитивные средние шипиковые нейроны (medium spiny neurons, MSN) стриатума имеют преимущественно D1-фенотип [Tejeda et al., 2017, 2018], а активация DRD1 приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB и, в свою очередь, активации транскрипции мРНК продинорфина [Muschamp et Carlezon, 2013].

Определение относительного уровня мРНК D1 рецептора в стриатуме крыс с различной динамикой добровольного потребления алкоголя показало, что уровень экспрессии мРНК в стриатуме животных A+ был в 3,7 раз ниже, чем у животных с постоянно низким предпочтением алкоголя (Рис.10).

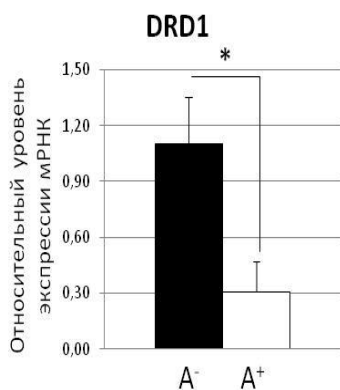


Рис.10. Относительный уровень экспрессии мРНК DRD1 в стриатуме животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.

Обозначения как на Рис.7.

* $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента для независимых выборок)

D1 подтип представлен в стриатуме исключительно в качестве постсинаптических дофаминовых рецепторов [Beaulieu et al., 2015], а нарушение их функций с помощью фармакологических либо генетических методов приводит к изменению поведения, связанного с естественными формами подкрепления или действием психоактивных веществ [Koob et Volkow, 2010; Baik, 2013]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о снижении количества D1 рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом (post mortem) [Hirth et al., 2016; Vazov et al., 2018] и позволяют предполагать, что низкий уровень мРНК DRD1 и рДуп в стриатуме могут обуславливать неэффективность механизма отрицательной обратной связи и представлять один из важнейших факторов патогенеза алкогольной зависимости на ранних стадиях ее формирования.

В *миндалине* мозга животных с растущим уровнем потребления алкоголя экспрессия генов KOR, NOP рецепторов и продинорфина была достоверно ниже, чем у животных со стабильно низкой алкогольной мотивацией. Нейроны центральной мидалины (CeA) характеризуются высоким уровнем экспрессии кортикотропин-рилизинг фактора (CRF) и его рецепторов и их взаимодействие с каппа-опиоидной системой играет, по-видимому, важную роль в экстрагипоталамической CRF-зависимой регуляции функций мозга при формировании аддиктивного поведения [Gilpin et al., 2014].

Определение относительного уровня мРНК CRF и CRF1 рецептора в миндалине крыс с различной динамикой добровольного потребления алкоголя показало, что уровень экспрессии мРНК CRF в группе животных A⁺ был в 5,5 раз выше, чем у животных с постоянно низким предпочтением алкоголя, при неизменном уровне CRFR1 (Рис.11).

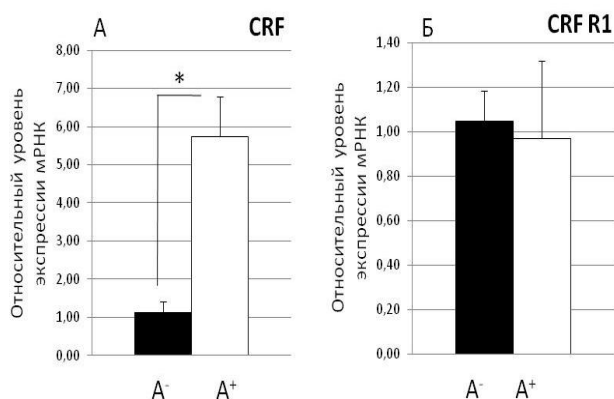


Рис.11. Относительный уровень экспрессии мРНК CRF (А) и CRFR1 (Б) в миндалине животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.

Обозначения как на Рис.7.

* $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента для независимых выборок)

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Известно, что антагонисты CRF-рецепторов подавляют реакцию самовведения алкоголя у зависимых от него крыс [Funk et al., 2007], во время эпизодов отмены алкоголя наблюдается активация нейронов CeA, 80% которых составляют CRF-позитивные клетки, а подавление активности этих клеток приводит к снижению потребления алкоголя [Guglielmo et al., 2019]. Данные о взаимодействии CRF и каппа-опиоидной систем CeA противоречивы, однако большинство авторов склоняется к мнению о реципрокных отношениях этих систем. Результаты наших исследований подтверждают гипотезу, рассматривающую CRF и диноρφин/каппа-опиоидную систему миндалины как взаимозависимые звенья одной цепи.

Анализ статистической взаимосвязи между уровнем экспрессии генов и потребления алкоголя выявил достоверную положительную корреляцию между уровнем мРНК CRF в миндалине и отрицательную корреляцию между уровнем мРНК рDyn и D1 в вентральном стриатуме и NOP и KOP в миндалине (Табл.1).

Таблица 1 — коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнем экспрессии мРНК и среднесуточным потреблением алкоголя (в г/кг, за последнюю неделю) (* $p < 0,05$)

Ген / Область	pDYN вентральный стриатум	D1 вентральный стриатум	NOP миндалина	KOP миндалина	CRF миндалина
r	-0,69371	-0,66848	-0,79556	-0,81621	0,749848

Полученные результаты кратко представлены в сводной Таблице 2.

Таблица 2 — уровень экспрессии мРНК в мозге животных с растущим предпочтением алкоголя по сравнению с животными со стабильно низкой алкогольной мотивацией

Область / Ген	KOR	pDyn	NOR	pNoc	D ₁	CRF ₁	CRF
Стриатум	>.05	↓	>.05	↓	↓	—	—
Миндалина	↓	↓	↓	>.05	—	>.05	↑
Средний мозг	>.05	>.05	>.05	>.05	—	—	—

На основе полученных в работе данных можно усовершенствовать схему регуляции дофаминергической нейротрансмиссии опиоидной системой на ранних стадиях формирования алкогольной зависимости (Рис.12).

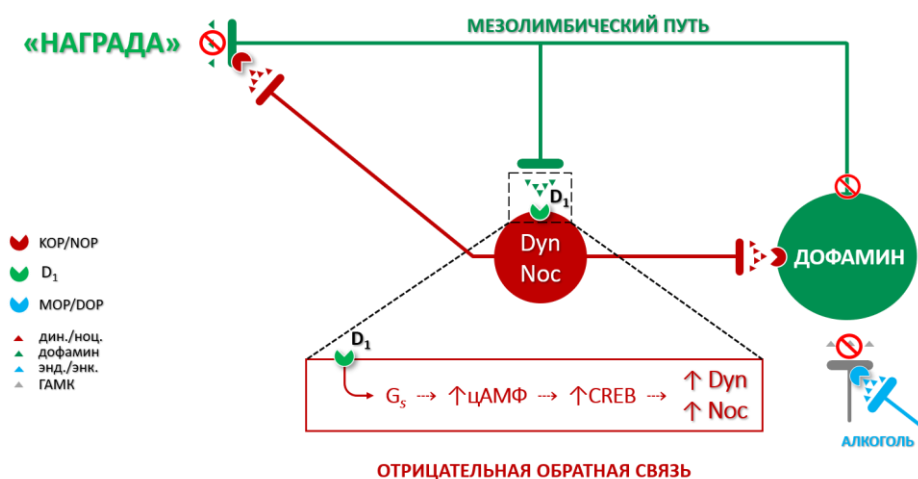


Рис.12. Схема регуляции дофаминергической нейротрансмиссии опиоидной системой на ранних стадиях формирования алкогольной зависимости

Алкоголь вызывает активацию MOR/DOP рецепторов эндорфинами/энкефалинами, ингибирование ГАМК в области вентральной покрышки среднего мозга, увеличение частоты разрядов дофаминергических нейронов и повышение освобождения дофамина в прилежащем ядре вентрального стриатума. В то же время, существует контур отрицательной обратной связи, призванный снижать уровень дофаминергической нейротрансмиссии. Активация D1 рецепторов, локализованных на телах и дендритах средних шипиковых нейронов (MSN) стриатума повышает уровень цАМФ, фосфорилирование CREB, что, в свою очередь, активирует экспрессию генов продинорфина и проноцицептина – ко-трансмиссив-синергистов ГАМК. Активация KOR и NOR рецепторов, расположенных на телах и пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов приводит к гиперполяризации мембраны и снижению высвобождения дофамина из пресинаптических окончаний. **Низкий уровень экспрессии мРНК продинорфина, проноцицептина и их рецепторов в стриатуме и миндалине мозга животных с ростом алкогольного предпочтения, предполагает более выраженный дофаминергический ответ на алкоголь, очевидно, определяя высокую гедоническую ценность**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день, эффективность профилактики и лечения злоупотребления алкоголем остается крайне низкой. В связи с этим актуальной задачей является изучение патогенетических механизмов становления алкогольной зависимости. Настоящее исследование было направлено на выявление различий в экспрессии генов опиоидной системы, кодирующих мю- (MOP), дельта- (DOP), каппа- (KOP) и ноцицептиновый (NOP) опиоидные рецепторы, а также эндогенные опиоидные пептиды – продинорфин и проноцицептин у животных со стабильно низким и растущим уровнем алкогольной мотивации в условиях свободного выбора между алкоголем и водой. В качестве ключевых структур мезолимбической системы были выбраны: вентральная часть среднего мозга – область локализации тел дофаминергических нейронов, а также вентральный стриатум и миндалина мозга (амигдала) – главные структуры-мишени, иннервируемые дофаминергическими нейронами. Сравнение уровня экспрессии исследованных генов в структурах мезолимбической системы интактных животных показало, что наиболее высокий уровень экспрессии мРНК MOP и DOP рецепторов наблюдается в стриатуме, KOP рецептора – в среднем мозге, а NOP рецептора – в миндалине мозга. Уровень экспрессии мРНК продинорфина был максимальным в миндалине, а мРНК проноцицептина – в среднем мозге. Эти результаты соответствуют данным литературы о соотношении плотности рецепторов и содержания пептидов в изучаемых областях мозга.

Использование в работе экспериментальной модели добровольного потребления алкоголя («свободный выбор» между 10% раствором этанола и водой) позволило выделить две характерные группы животных: со стабильно низким (A^-) и растущим (A^+) уровнем его потребления. В группе A^+ среднесуточное потребление алкоголя к концу тестирования возросло более чем в 2 раза по сравнению с начальным уровнем, тогда как в группе A^- достоверно не изменилось. Сравнительный анализ уровня мРНК показал, что у животных группы A^+ достоверно снижен уровень экспрессии мРНК продинорфина и проноцицептина в стриатуме и мРНК KOP, NOP рецепторов и продинорфина в миндалине мозга по сравнению с животными группы A^- . Достоверных различий между группами в уровне экспрессии мРНК MOP и DOP рецепторов ни в одной из исследуемых обнаружено не было. Учитывая супрессивное влияние динорфина и ноцицептина и их миметиков на уровень дофаминергической нейротрансмиссии в ЦНС, наблюдаемый низкий уровень экспрессии мРНК KOP, NOP рецепторов и их эндогенных лигандов в стриатуме и миндалине животных группы A^+ , по нашему мнению, может свидетельствовать о сниженной эффективности отрицательной обратной связи в микро- и макроконтурах мезолимбической системы и, как

следствие, более выраженном положительно-подкрепляющем эффекте алкоголя у этих животных. Согласно полученным данным, различия в уровне экспрессии мРНК КОР, NOP рецепторов и их эндогенных лигандов в мезолимбических структурах-мишенях дофаминергических нейронов, носят однонаправленный характер. Эти данные могут свидетельствовать в пользу функционального синергизма диноρφин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в механизмах регуляции дофаминергической нейротрансмиссии при действии алкоголя и позволяют предполагать наличие «защитной» функции этих систем на этапах, предшествующих формированию алкогольной зависимости.

Поскольку экспрессия мРНК продиноρφина сопряжена с активацией D1 рецепторов в стриатуме, мы исследовали уровень экспрессии мРНК D1 рецептора в данной структуре и показали, что у крыс группы A⁺ экспрессия мРНК D1 рецептора в вентральном стриатуме была достоверно ниже, чем у животных группы A⁻, что согласуется с наблюдаемым низким уровнем мРНК продиноρφина. Изучение экспрессии гена кортикотропин-релизинг фактора (CRF) в миндалине показало, что уровень экспрессии мРНК в группе животных A⁺ был в 5,5 раз выше, чем у животных группы A⁻, что подтверждает предположение о реципрокных отношениях CRF/каппа-опиоидной систем в миндалины мозга и представляется еще одним ключевым фактором риска роста потребления алкоголя.

Таким образом, в работе показано, что в условиях свободного доступа к алкоголю, крысы, демонстрирующие прогрессивный рост его предпочтения характеризуются: 1) сниженным уровнем экспрессии мРНК продиноρφина и проноцицептина в вентральной области стриатума, что, возможно, объясняется низким уровнем экспрессии мРНК D1 рецептора; 2) сниженным уровнем экспрессии мРНК КОР и NOP рецепторов и продиноρφина и повышенным уровнем мРНК CRF в миндалине мозга, что может быть одним из ключевых патогенетических факторов, определяющих рост добровольного потребления алкоголя.

На основе полученных данных высказано предположение о возможности синергизма каппа-опиоидной и ноцицептинергической систем в регуляции мотивации и подкрепления, открывающего перспективы для сочетанного воздействия на КОР и NOP рецепторы в качестве нового направления в поиске высокоэффективных лекарственных средств лечения алкогольной зависимости.

ВЫВОДЫ

1. Показана региональная специфичность экспрессии генов опиоидных пептидов и их рецепторов в структурах мезолимбической системы мозга: у интактных животных наиболее высокий уровень экспрессии мРНК мю- (MOP) и дельта- (DOP) опиоидных рецепторов детектировался в стриатуме, каппа- (KOP) – в среднем мозге, ноцицептинового (NOP) – в миндалине. Максимальный уровень мРНК продинорфина (pDyn) выявлен в миндалине, проноцицептина (pNoc) – в среднем мозге.
2. Выявлено, что крысы с изначально низким уровнем предпочтения алкоголя в процессе его добровольного потребления разделяются на две группы: первая группа животных сохраняет низкий уровень потребления алкоголя, вторая группа крыс в процессе наблюдения увеличивает его потребление более чем в два раза.
3. Сравнительный анализ экспрессии генов опиоидной системы в мозге не выявил достоверных различий между группами крыс с растущим и стабильно низким уровнем алкогольного предпочтения в уровне мРНК мю- (MOP) и дельта- (DOP) опиоидных рецепторов или изменений в распределении транскрипционной активности в структурах мезолимбической системы по сравнению с интактными животными.
4. В вентральном стриатуме крыс с растущим уровнем алкогольного предпочтения достоверно снижена экспрессия мРНК продинорфина и проноцицептина по сравнению с животными со стабильно низким уровнем алкогольного предпочтения.
5. В вентральном стриатуме крыс с растущим уровнем алкогольного предпочтения показано достоверное снижение экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора, участвующего в инициации транскрипции гена продинорфина. Выявлена отрицательная корреляция между уровнем добровольного потребления этанола животными и уровнем мРНК D1 рецептора.
6. В миндалине мозга крыс с растущим уровнем предпочтения алкоголя снижена экспрессия мРНК продинорфина, KOP и NOP рецепторов по сравнению с животными со стабильно низким уровнем алкогольного предпочтения.
7. Показано увеличение уровня мРНК кортикотропин-релизинг фактора (CRF) в миндалине крыс с растущим уровнем алкогольного предпочтения и выявлена положительная корреляция между уровнем добровольного потребления этанола и уровнем мРНК CRF.
8. Полученные данные подтверждают гипотезу о реципрокной регуляции функций миндалины опиоидными пептидами и CRF на ранних стадиях формирования аддиктивного поведения.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ
СТАТЬИ В НАУЧНЫХ ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК РФ:**

1. **Шагиахметов Ф. Ш.**, Анохин П. К., Шамакина И. Ю., Давыдова Т. В. Сравнительный анализ экспрессии генов опиоидной системы в мозге крыс с различным уровнем предпочтения алкоголя // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018. Т. 62. № 4. С. 53-57.
2. **Шагиахметов Ф.Ш.**, Шамакина И.Ю., Давыдова Т.В. Механизмы контроля потребления алкоголя: экспрессия генов ноцицептин/каппа-опиоидной системы в мозге крыс // Патогенез. 2018. Т. 16. № 4. С. 112-114.
3. **Шагиахметов, Ф. Ш.**, Проскурякова Т.В., Шамакина И.Ю. Динорфин/каппа-опиоидная система мозга как перспективная мишень для терапии зависимости от психоактивных веществ: обзор // Нейрохимия – 2015.-N 4.- С.285-294.
 - *Shagiakhmetov F.S., Proskuryakova T.V., Shamakina I.Y. The dynorphin/kappa-opioid system of the brain as a promising target for therapy for dependence on psychoactive substances. Neurochemical Journal. 2015. Vol. 9. № 4. P. 245-253.*
4. Анохин П.К., **Шагиахметов Ф.Ш.**, Проскурякова Т.В., Шамакина И.Ю. Алкогольная интоксикация в подростковом периоде: экспериментальное исследование // Вопросы наркологии. 2016. №3, С. 40-54.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА КОНФЕРЕНЦИЯХ:

5. **Шагиахметов Ф.Ш.**, Анохин П.К., Ульянова Е.В. Ранняя алкогольная интоксикация: влияние на алкогольную мотивацию и экспрессию гена CRF в мозге взрослых животных. XII Всероссийская школа молодых психиатров. Суздаль 2015. // Сборник тезисов. С. 367-369.
6. **Шагиахметов Ф. Ш.**, Анохин П. К., Ульянова Е. В., Шамакина И. Ю. Экспрессия генов каппа-опиоидного и ноцицептинового рецептора и их эндогенных лигандов в мозге предпочитающих и отвергающих алкоголь крыс. Российская конференция с международным участием «Биомаркеры в психиатрии: поиск и перспективы» Томск, 12-13 мая 2016 // Сборник тезисов. С. 148-150
7. Шамакина И.Ю., Анохин П.К., **Шагиахметов Ф.Ш.**, Проскурякова Т.В., Шохорова В.А., Ульянова Е.В. Экспериментальные модели алкогольной зависимости: сравнительный анализ экспрессии генов, контролирующих функциональное состояние дофаминовой системы мозга. 6-я Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» 9 – 13 ноября 2015, Клязьма, Россия // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78. № 5. С. 64.

IMPAIRMENT OF BRAIN OPIOID GENE EXPRESSION IN PATHOGENESIS OF ALCOHOL DEPENDENCE IN RATS

Abstract

Understanding the pathogenetic mechanisms underlying transition from moderate controlled voluntary alcohol intake to the maladaptive addictive behavior is actual and still unsolved problem. Taking into account that 1) endogenous opioids are powerful modulators of mesolimbic “reward” system and 2) κ -opiate (KOP) and nociceptin (NOP) receptors downregulate striatal dopamine release to arrest the excessive “reward system” activation, we performed a comparative analysis of opioid-related gene expression in the brain of male Wistar rats with low stable or progressive patterns of voluntary alcohol consumption using two-bottle (10% ethanol/water) free choice (PND60-85) and Real-Time Quantitative PCR method. A⁺-rats progressively increased ethanol consumption over the course of the experiment (from 3,2±0,2 g/kg at baseline to 7,2±0,9 g/kg; $p < 0,05$) while stably low-drinking animals (A⁻) maintained their alcohol intake near the baseline level (from 3,0±0,6 to 3,6±0,4 g/kg). A⁺ rats had significantly lower levels of prodynorphin (pDyn) and pronociceptin (pNoc) mRNA in striatum and pDyn, κ -opiate-(KOP) and nociceptin (NOP) receptors mRNA in amygdala compared to A⁻ group. There were no statistically significant differences between groups in mRNA encoding for μ - (MOP) and Δ (DOP) opioid receptors. Since expression of pDyn and pNoc mRNA in striatum is dopamine D1-receptor (D1R)-dependent we analyzed mRNA encoding for D1R and found A⁺ rats to have 4-fold decrease in D1R mRNA level. In amygdala low levels of opiate-related genes expression were accompanied by 5-fold increase in mRNA coding for corticotropin-releasing factor (CRF). Our results suggest that low level of the mesolimbic “anti-reward” opioid genes expression may represent a pathogenetic basis of the increase in alcohol intake in the very beginning of the formation of addiction-like behavior.