ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПСИХИАТРИИ И НАРКОЛОГИИ им. В.П. СЕРБСКОГО» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Шагиахметов Фарид Шамилевич

Нарушение экспрессии генов опиоидной системы мозга в патогенезе экспериментальной алкогольной зависимости

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

14.03.03 — Патологическая физиология

Научные руководители:

доктор медицинских наук
Давыдова Татьяна Викторовна;

кандидат биологических наук
Шамакина Инна Юрьевна

Москва — 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ....10

1.1 Экспериментальные модели алкоголизма....10
1.1.1 Модели добровольного потребления алкоголя....10
1.1.1.1 Парадигма свободного выбора между алкоголем и водой....12
1.1.1.2 Инбредные линии грызунов с высоким и низким потреблением этанола....14
1.1.1.3 Оперантное самовведение и рецидив поиска алкоголя....16
1.1.1.4 Условнорефлекторное предпочтение места....17

1.2 Нейрохимические механизмы действия алкоголя....18
1.2.1 Глутамат....18
1.2.2 ГАМК....20
1.2.3 Дофамин....21
1.2.4 Влияние алкоголя на транскрипционные факторы....24
1.2.5 Эпигенетические эффекты алкоголя....25

1.3 Состояние системы «награды» при алкогольной зависимости....26

1.4 Аллостатическая модель зависимости....30

1.5 Эндогенная опиоидная система....33
1.5.1 Номенклатура и филогенез....33
1.5.2 Эндорфин/MOP-рецепторная и энкефалин/DOP-рецепторная системы....37
1.5.3 Динорфин/KOP-рецепторная система....39
1.5.4 Ноцицептин (орфанин FQ)/NOP (ORL_1)-рецепторная система....47

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ....54

2.1 Экспериментальные животные....54

2.2 Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой потребления алкоголя....55

2.3 Области мозга, выбранные для исследования....56

2.4 Биохимические методы исследования....57

2.5 Дизайн исследования....60

2.6 Статистическая обработка данных....62

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ....64

3.1 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы интактных животных....64

3.2 Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя....69

3.3 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения....71

3.3.1 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в вентральной области среднего мозга. 72

3.3.2 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в вентральном стриатуме....76

3.3.3 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в миндалине мозга....79

3.4 Сопряженные механизмы регуляции динорфин/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в стриатуме и миндалине мозга....82

3.4.1 Уровень экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора в стриатуме крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения....84

3.4.2 Уровень экспрессии мРНК CRF и CRF1 рецептора в миндалине крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения 87

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 97

ВЫВОДЫ....102

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ....104

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ....106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)[1], 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 (МОР) рецепторов в механизмах «подкрепления» и формирования зависимости, обосновавших целесообразность применения антагониста МОР 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 МОР 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

[1] Global status report on alcohol and health 2018 [Electronic resource] // WHO. URL: www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/ (дата обращения: 10.10.2019).

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/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в регуляции мотивации и подкрепления. Впервые обсуждаются перспективы сочетанного воздействия на KOP и NOP 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/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-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/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-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/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем может выступать в роли «протективного» фактора, противодействующего росту потребления алкоголя.

Полученные новые данные указывают на функциональную схожесть динорфин/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-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 (KOP) и ноцицептиновый (NOP) 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 (MOP) и дельта-опиоидного (DOP) 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 дофаминового 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 сообщений 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 источников из них 32 отечественных и 329 зарубежных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Экспериментальные модели алкоголизма

Экспериментальные модели являются важным инструментом в изучении злоупотребления алкоголем и алкогольной зависимости, поскольку позволяют использовать методы, которые невозможно применять у человека.

Учитывая широкий спектр теорий, описывающих становление и течение зависимости, не удивительно, что единой целостной экспериментальной «модели алкоголизма» не существует.

Методы алкоголизации можно грубо разделить на «принудительные» и «добровольные». Принудительная индукция зависимости может быть достигнута прямым введением алкоголя внутрижелудочно, внутрибрюшинно, путем воздействия паров этанола, кормлением алкогольной пищей с жидким этанолом [Bell et al., 2017]. Однако эти методы используются, главным образом, для изучения влияния острой и хронической алкогольной интоксикации, а также синдрома отмены алкоголя.

Модели добровольного потребления алкоголя, в свою очередь, представлены (1) парадигмой свободного выбора между алкоголем и водой; (2) инбредными линиями животных с различным уровнем алкогольного предпочтения; (3) оперантными моделями самовведения и рецидива потребления алкоголя; а также (4) условнорефлекторным предпочтением места [Bell et al., 2017; Ripley et Stephens, 2011; Ciccocioppo, 2013; Spanagel, 2000].

1.1.1 Модели добровольного потребления алкоголя

Исследования влияния алкоголя на поведение лабораторных животных проводятся, начиная с 40-х годов XX века. Известно, что некоторые грызуны потребляют этанол в лабораторных условиях добровольно, хотя он и обладает аверсивным вкусом [Spanagel, 2000]. Это делает возможным использование мышей и крыс в качестве объектов для моделирования различных аспектов

потребления алкоголя человеком, в частности, для изучения его подкрепляющих свойств.

В начале 1970-х гг., David Lester и Earl Freed сформулировали несколько принципов моделирования алкоголизма на животных. Главным принципом является оральное потребление алкоголя в отсутствие пищевой или питьевой депривации. Во-вторых, алкогольная интоксикация должна существовать на протяжении длительного периода времени, сопровождаться формированием синдрома отмены – то есть, развитием физической зависимости. После отмены алкоголя и угашения (extinction) реакции, связанной с его потреблением, повторный эпизод интоксикации приводит к увеличению потребления алкоголя – так называемому рецидиву (reinstatement) [Lester et Freed, 1973].

Одной из самых простых и известных методик является модель добровольного потребления раствора этанола в двухбутылочном тесте. В данной парадигме, животным предоставляется свободный доступ к двум поилкам, одна из которых содержит раствор этилового спирта (обычно 9-10%), а другая – воду. Доступ к этанолу может быть свободным, когда животное имеет доступ к алкоголю в любое время, либо ограниченным, в частности, когда доступ осуществляется только в определенное время суток. Парадигма свободного выбора может использоваться для оценки общей аддиктивности алкоголя [Tabakoff et Hoffman, 2000]. Данная модель и ее модификации могут оказаться полезными для изучения базовых молекулярных механизмов, вовлеченных в формирование алкогольной зависимости. Наиболее типичным является определение количества этанола, потребляемого за сутки, в граммах на килограмм массы тела животного [Tabakoff et Hoffman, 2000]. Не являясь генетически выведенными на основании высокого предпочтения алкоголя, лабораторные грызуны демонстрируют различные показатели предпочтения, на основании которых их можно условно разделить на малопьющих и многопьющих. Такое потребление (до 5-6 г/кг/день у мышей, и до 2-2,5 г/кг/день у крыс) очевидно не связано с положительными подкрепляющими свойствами этанола

[Tabakoff et Hoffman, 2000]. Эти животные, вероятно, потребляют этанол из-за его вкуса. Высоких уровней (12-20 г/ кг/ день у мышей и 5-10 г/кг/день у крыс) добровольного потребления этанола в условиях тестирования в парадигме «свободный выбор» удается добиться у небольшого процента (около 10% крыс Wistar) животных лишь спустя 3 – 4 недели тестирования [Tabakoff et Hoffman, 2000].

1.1.1.1 Парадигма свободного выбора между алкоголем и водой

Эти модели подразделяются на две основные категории: (1) с неограниченным круглосуточным доступом (Unlimited access 2-bottle choice; UA2BC); и (2) с прерывистым доступом (Intermittent access 2-bottle choice; IA2BC). Одной из разновидностей прерывистого доступа является «питье в темноте» (Drinking in the Dark; DID), когда доступ к алкоголю предоставляется лишь в темную фазу светового цикла [Carnicella, 2014; Spanagel, 2000; Holgate et al., 2017]. В обоих случаях используется так называемый «двухбутылочный тест» (2-bottle choice; 2BC), когда животные получают доступ к двум бутылкам; одна содержит раствор этанола, а другая — воду.

Неограниченный доступ (UA2BC)

Модель подразумевает свободный доступ к раствору этанола, воде и еде в неограниченном количестве. Иногда предоставляется несколько вариантов растворов этанола, что увеличивает общий объем потребления алкоголя [Bell et al., 2017].

Прерывистый доступ (IA2BC)

Модели 2BC с прерывистым доступом используются для увеличения добровольного потребления алкоголя. Повторные циклы потребления/отмены приводят к становлению паттерна интоксикации аналогичного «эпизодическому пьянству» (binge drinking) у человека и развитию синдрома отмены во время периодов депривации алкоголя [Holgate et al., 2017].

Используя половозрелых самцов крыс в модели IA2BC, Козлов и др. (2015) предоставляли доступ к поилке с 5% раствором этанола на 3 часа в сутки по рабочим дням. В течение остального времени животные имели доступ только к поилке с водой. Уровень предпочтения алкоголя рассчитывали, как долю раствора этанола в объеме всей потребляемой за 3 часа жидкости. Полученные для каждого животного индивидуальные показатели предпочтения были усреднены за 27 циклов IA2BC. Полученные средние величины позволили разделить животных на 5 групп в следующей пропорции: (1) 3,5% крыс не потребляли алкоголь вообще; (2) 19,8% — предпочитали воду (доля раствора этанола, в среднем — 0,18 [0,02 — 0,27]); (3) 51,1% — приблизительно в равной степени предпочитали алкоголь и воду (доля раствора этанола, в среднем — 0,48 [0,3 — 0,64]); (4) 23,3% — предпочитали алкоголь (доля раствора этанола, в среднем — 0,76 [0,65 — 0,88]); (5) 2,3% — воду практически не потребляли (доля раствора этанола, в среднем — 0,94 [0,9 — 0,96]) [Козлов и др., 2015]. Однако данное исследование не дает представления о динамике алкогольного предпочтения во времени и не отражает пропорцию животных, обнаруживавших его неуклонный рост.

Питье в темноте

Экспериментальная модель «питье в темноте» (DID) преимущественно используется для изучения потребления этанола у грызунов [Holgate et al., 2017; Bell et al., 2017; Ripley et Stephens, 2011]. В модели DID животные получают доступ к этанолу в течение темного периода суток. Например, в модели DID у мышей потребление 20% этанола может достигать ~2–3 г/кг/2 ч или ~7 г/кг/4 ч и приводить к концентрации этанола в крови выше 100 мг% [Holgate et al., 2017; Bell et al., 2017; Ripley et Stephens, 2011].

Также используется модификация процедуры DID — с многократным доступом — DID-MSA (-multiple scheduled access). Как и в других протоколах добровольного потребления, вода и еда находятся в неограниченном доступе. Крысам предоставляется от двух до четырех эпизодов доступа длительностью в 1 час, разделенных двумя или более часами, в течение 12-часовой темной фазы цикла. Инбредные линии крыс с высоким предпочтением алкоголя, в протоколе

DID-MSA, легко достигают концентраций этанола в крови, превышающих 80 мг% (обычно >100 мг%). Адаптация DID-MSA для использования в оперантных камерах позволяет достигать концентраций этанола в крови у крыс, превышающих 250 мг% [Bell et al., 2017].

1.1.1.2 Инбредные линии грызунов с высоким и низким потреблением этанола

В 1950-х годах стали развиваться программы по получению линий крыс, генетически предрасположенных к чрезмерному потреблению алкоголя. Осуществлялось это путем инбридинга животных с высоким предпочтением алкоголя [Ciccocioppo, 2013; Bell et al., 2017].

Параллельно проводили селекцию линий с низким предпочтением алкоголя [Ciccocioppo, 2013; Bell et al., 2017]. Первая программа селекционного разведения крыс, различающихся по потреблению алкоголя, началась в 1950 году в университете Чили (UCh) с разработки линий с высоким (UChB) и низким (UChA) потреблением алкоголя [Mardones et al. 1953]. Позже в исследовательской лаборатории Alko в Финляндии была инициирована программа, в которой путем двунаправленного отбора были получены две линии крыс с высоким AA (alcohol-accepting) и низким ANA (alcohol-non-accepting) предпочтением алкоголя [Eriksson, 1968]. Впоследствии были инициированы аналогичные программы в США (Индианаполис, Индиана) и в Италии (Кальяри, Сардиния). Эти программы привели к созданию соответственно двух пар линий крыс: предпочитающих P (Preferring) / непредпочитающих NP (Non-preferring) и сардинских предпочитающих sP (Sardinian preferring) / сардинских непредпочитающих sNP (Sardinian non-preferring) алкоголь крыс [Ciccocioppo, 2013]. Позже в Университете Индианаполиса была инициирована новая программа селекции линий предпочитающих и не предпочитающих алкоголь крыс. В результате была выведена пара линий с высоким HAD (High alcohol-drinking) и низким LAD (Low alcohol-drinking) потреблением алкоголя [Ciccocioppo, 2013]. В 1998 году после 20

поколений селекционного разведения сардинских предпочитающих (sP) крыс в лаборатории Университета Камерино, эта линия была переименована в msP (Marchigian Sardinian alcohol-preferring) (см. таблицу 1.1). Генотипические и фенотипические характеристики крыс sP и msP могут различаться, причем, у крыс линии msP отсутствует соответствующая парная «непредпочитающая» линия. В Канадском фонде исследований зависимостей (Addiction Research Foundation, Toronto, Canada), была проведена программа селекционного выведения крыс для оценки потребления этанола в условиях ограниченного доступа. В результате были получены линии крыс с высоким HARF (High, Addiction Research Foundation) и низким LARF (Low, Addiction Research Foundation) уровнем потребления этанола [Bell et al., 2017; Ciccocioppo, 2013].

Таблица 1.1 — Селекционно выведенные линии крыс с высоким и низким потреблением этанола [Crabbe et al., 2010; Bell et al., 2017]

Линии	**Фенотип**
Предпочитающие и непредпочитающие алкоголь (P/NP) *США, Индианаполис, Индианский университет*	Высокое/Низкое потребление 10% этанола vs воды
Предпочитающие и непредпочитающие алкоголь (UChB/UChA) *Чили, Сантьяго, Университет Чили*	Высокое/Низкое потребление 10% этанола vs воды
Принимающие и отвергающие алкоголь (AA/ANA) *Финляндия, Хельсинки, Лаборатория ALKO*	Высокое/Низкое потребление 10% этанола vs воды
Линии с высоким и низким потреблением алкоголя (HARF/LARF) *Канада, Торонто, Фонд исследований зависимости*	Высокое/Низкое потребление 12% этанола vs воды втечение 20 минутного периода ограниченного доступа
Линии с высоким и низким потреблением алкоголя (HAD-1(2)/LAD-1(2)) *США, Индианаполис, Индианский университет*	Высокое/Низкое потребление 10% этанола vs воды
Сардинские предпочитающие и непредпочитающие алкоголь (sP/sNP) *Италия, Сардиния, Университет Кальяри*	Высокое/Низкое потребление 10% этанола vs воды
Маркиджанские сардинские предпочитающие алкоголь (msP) *Италия, Университет Камерино*	Высокое потребление 10% этанола vs воды

1.1.1.3 Оперантное самовведение и рецидив поиска алкоголя

В отличие от потребления этанола в домашней клетке, для оперантного самовведения требуется извлечь животное из привычной среды. Удаление животного из домашней клетки, транспортировка в испытательную комнату и помещение в оперантную камеру приводит к формированию множества ассоциаций между стимулами окружающей среды и предвкушением доступа к алкоголю [Bell et al., 2017].

Считается, что условно-рефлекторные стимулы окружающей среды, связанные с субъективными эффектами этанола, играют решающую роль в рецидивирующей природе алкогольной зависимости [Ripley et Stephens, 2011]. Воздействие этих сигналов, стресс или провокационная доза алкоголя могут привести к рецидиву пьянства у детоксифицированных алкоголиков [Ripley et Stephens, 2011]. В оперантной модели восстановления (reinstatement) поведения поиска алкоголя (alcohol seeking behavior) животное должно нажать рычаг, чтобы получить этанол. Доставка этанола сопряжена с условным сигналом (например, светом или звуком). После выработки, условно-рефлекторное нажатие на рычаг угашается отсутствием подачи этанола. На заключительном этапе тестирования регистрируется способность этанола, условно-рефлекторного стимула или стресса, вызванного электрошоком, восстанавливать нажатие рычага для получения этанола.

Степень восстановления реагирования принимается как мера мотивации к поиску этанола [Le et Shaham, 2002]. Существует два режима подкрепления, определяемых соотношением количества оперантных действий (обычно нажатий на рычаг), необходимых для получения порции подкрепления (например, дозы алкоголя). Подкрепление с фиксированным отношением (Fixed ratio; FR) определяет получение положительного подкрепления всегда после одного и того же количества нажатий. Подкрепление с прогрессивным отношением (Progressive ratio; PR) предусматривает получение положительного подкрепления (дозы алкоголя) каждый раз после все большего и большего количества нажатий. PR

показывает, какой объем работы животное готово произвести ради получения порции награды. Таким образом, можно измерить мотивационные (влечение), а не количественные характеристики потребления [Spanagel, 2000; Ripley et Stephens, 2011; Bell et al., 2017].

1.1.1.4 Условнорефлекторное предпочтение места

Условный рефлекс предпочтения места (Conditioned place preference; CPP) используют для определения возможного «подкрепляющего эффекта» различных психоактивных веществ, в том числе, алкоголя [Bardo et Bevins, 2000]. Этот метод основан на характерных особенностях поведения грызунов — предпочтении темного и избегании ярко освещенного пространства. Наиболее часто используется автоматизированная камера, состоящая из центрального отсека и сообщающихся с ним двух отсеков с различным цветом стен и пола, освещенностью (светлый — темный), а также тактильно отличающейся текстурой пола [Bardo et Bevins, 2000]. Стандартная методика включает четыре последовательных этапа. Первый — фоновое тестирование предпочтения одного из отсеков камеры. На этом этапе крысу помещают на 10-30 мин. в установку при открытых дверцах, соединяющих отсеки, для ознакомления и определения исходного предпочтения одного из отсеков установки. Второй этап эксперимента — «обусловливание», может проводиться с использованием двух схем [Bardo et Bevins, 2000].

Согласно первой схеме — животным опытной группы вводят исследуемый препарат, а животным контрольной группы — физиологический раствор перед помещением в не предпочитаемый отсек камеры (30-60 мин в течение 3-7 дней). Согласно второй схеме — каждой крысе, перед помещением в установку, вводят либо исследуемое вещество (четные дни), либо физиологический раствор (нечетные дни): в непредпочитаемый отсек в случае введения препарата и в предпочитаемый отсек в случае введения физиологического раствора. Дверцы

между отсеками установки на этом этапе эксперимента закрыты [Bardo et Bevins, 2000].

Финальное тестирование проводят через 24 часа по схеме, используемой при фоновом тестировании. Животное помещают в камеру при открытых дверцах и регистрируют время нахождения в каждом из отсеков, двигательную активность и число переходов из отсека в отсек [Bardo et Bevins, 2000].

Увеличение времени в исходно не предпочитаемом отсеке камеры трактуют как условное предпочтение места. Дополнительным критерием предпочтения служит увеличение числа переходов из отсека в отсек и увеличение двигательной активности в ранее не предпочитаемом отсеке [Bardo et Bevins, 2000].

1.2 Нейрохимические механизмы действия алкоголя

Разработка эффективных методов лечения алкоголизма зависит от понимания механизмов действия этанола на нейромедиаторные системы мозга.

На заре исследований биологических эффектов алкоголя считалось, что клинические эффекты этанола связаны, главным образом, с его липофильными свойствами и способностью менять физические свойства мембран нейронов. Однако позже было показано, что алкоголь взаимодействует с липидным бислоем лишь в концентрациях, значительно превышающих достигаемые клинически [Peoples et al., 1996]. В настоящее время известно, что в основе острого и хронического действия алкоголя при формировании зависимости лежит его влияние на ключевые нейромедиаторные системы мозга [Анохина, 2017; Koob et Volkow, 2016].

1.2.1 Глутамат

Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в мозге. Глутамат имеет как ионотропные — NMDA, AMPA, каинатные, так и метаботропные — mGluR (сопряженные с G-белками) рецепторы [Most et al.

2014]. Как правило, все рецепторы глутамата ингибируются алкоголем [Most et al. 2014]. В ряде поведенческих тестов алкоголь вызывает тот же ответ, что и NMDA-антагонист MK-801 [Sasabe et Ishiura, 2010; Most et al. 2014]. Кроме того, у больных алкоголизмом после разрешения синдрома отмены, NMDA-антагонист кетамин воспроизводит клинические эффекты алкоголя [Sasabe et Ishiura, 2010; Most et al. 2014].

Считается, что взаимодействие этанола с NMDA рецепторами лежит в основе явления «острой толерантности». «Острая толерантность» — это термин, используемый для описания снижения ингибиторного влияния алкоголя в течение короткого периода времени. Активность NMDA рецепторов в культивируемых нейронах возвращается к исходному уровню менее чем через 1 час после воздействия алкоголя [Lai et al., 2004]. Острое воздействие алкоголя подавляет активацию NMDA рецепторов, в то время как хроническое — увеличивает их экспрессию в мозге грызунов и человека [Sasabe et Ishiura, 2010; Most et al. 2014]. При отмене алкоголя наблюдается «рикошетное» гиперглутаматергическое состояние, лежащее в основе абстинентного синдрома и характеризующееся возбуждением, тревогой, дезориентацией, снижением судорожного порога и эксайтотоксической гибелью нейронов [Hoffman et al., 1995].

Наряду с увеличением экспрессии NMDA рецепторов наблюдается снижение их чувствительности к этанолу после его хронического воздействия, что связано с изменениями в их субъединичном составе. NMDA-рецептор представляет собой гетеромерный белок, состоящий из по меньшей мере одной субъединицы NR1 и одной субъединицы NR2. Предполагают, что этанол связывается с субъединицей NR1 в гидрофобном кармане третьего трансмембранного домена [Sasabe et Ishiura, 2010]. NMDA-рецептор – это катионный канал с высокой проницаемостью для Ca2+. Субъединица NR1 необходима для сопряжения функции рецептора и канала, а субъединица NR2 модулирует свойства канала. Субъединица NR1 имеет восемь изоформ, образованных в результате альтернативного сплайсинга экзонов 5, 21 и 22. Пропуск экзона 5 приводит к образованию варианта NR1-a в ходе экспрессии гена

на основе первичного транскрипта. При сохранении экзона 5 образуется вариант NR1-b. Изоформы NR1 обладают различной чувствительностью к ингибированию, вызванному этанолом. При экспрессии в ооцитах Xenopus, чувствительность изоформ к этанолу снижается в ряду NR1-1b>NR1-2b>NR1-1a> NR1-2a. При экспрессии в клетках HEK-293, когда все восемь изоформ NR1 коэкспрессируются в различных комбинациях с одним из четырех подтипов NR2, чувствительность рецептора к этанолу зависит от их комбинации. Например, наиболее сильно ингибируется этанолом (>50% ингибирования) пара NR1-2b/NR2C [Jin et Woodward, 2006].

В коре крыс, подвергшихся воздействию паров этанола и эмбрионов мыши, подвергшихся воздействию этанола внутриутробно, отношение мРНК вариантов сплайсинга NR1, содержащих экзон 5 (т.е., NR1-b) к тем, у которых он отсутствует (NR1-a) — уменьшается. Таким образом, потребление алкоголя увеличивает экспрессию изоформ NR1, которые слабо ингибируются этанолом [Sasabe et Ishiura, 2010], что, как предполагают, лежит в основе формирования толерантности к эффектам алкоголя.

1.2.2 ГАМК

ГАМК(А) рецептор представляет собой канал для ионов Cl^- и является наиболее распространенным тормозным рецептором в головном мозге млекопитающих [Sasabe et Ishiura, 2010]. Быстрое синаптическое торможение в ЦНС опосредуется, главным образом, активацией ГАМК(А) рецепторов [Sasabe et Ishiura, 2010].

Острое воздействие алкоголя повышает ГАМКергический тонус [Sasabe et Ishiura, 2010]. Молекулярные механизмы, посредством которых алкоголь может оказывать свое влияние на ГАМКергическую нейротрансмиссию, определяются его непосредственным связыванием с этим рецептором, увеличением высвобождения самой ГАМК и эндогенных ГАМК-миметиков, таких как нейростероиды (Lobo et Harris, 2008).

Алкогольная интоксикация характеризуется анксиолизом, седацией, а также нарушением когнитивных и моторных функций. Многие из этих эффектов воспроизводятся введением агонистов ГАМК(А) рецепторов, таких как мусцимол и бензодиазепины. При этом, эффекты алкоголя нивелируются введением антагонистов ГАМК(А) рецепторов [Sasabe et Ishiura, 2010].

Хроническое введение этанола компенсаторно снижает ГАМКергический тонус. При острой отмене алкоголя, избыток глутаматных рецепторов, в сочетании со сниженным ГАМКергическим тонусом, вызывает тревогу, дисфорию, бессонницу и, в тяжелых случаях, генерализованные судороги [Johnson et al., 2008].

Рецептор ГАМК является гетеромером из пяти субъединиц. Почти все ГАМК(А) рецепторы состоят из двух α, двух β и одной γ-субъединицы. Наиболее частыми комбинациями являются α1β2γ2, α2β3γ2 и α3β3γ2 [Sasabe et Ishiura, 2010].

Субъединица γ2 имеет два варианта сплайсинга: один длинный (γ2L) и один короткий (γ2S). Вариант γ2L отличается от варианта γ2S тем, что он содержит вставку из восьми аминокислот во внутриклеточной петле между трансмембранными доменами 3 и 4. Вариант γ2L, в отличие от γ2S, чувствителен к этанолу [Sasabe et Ishiura, 2010]. Хронический прием алкоголя изменяет субъединичный состав ГАМК(А) рецепторов. Так, у крыс хроническое прерывистое введение этанола снижает отношение γ2L / γ2S в гиппокампе [Petrie et al., 2001].

1.2.3 Дофамин

О центральной роли дофаминергической нейротрансмиссии в реализации острых эффектов алкоголя известно достаточно давно, когда предпринимались попытки предотвратить его эйфоризирующее действие при помощи ингибитора тирозингидроксилазы α-метил-*p*-тирозина [Ahlenius et al., 1973]. В действительности, снижение дофаминергического тонуса производит

субъективно неприятное и неприемлемое аверсивное действие [Melis et al., 2005; Diana et al., 1996].

В доклинических исследованиях было показано, что алкоголь увеличивает освобождение DA в прилежащем ядре (NAc) вентрального стриатума [Koob, 1992; Di Chiara 2002; Boileau et al., 2003; Volkow et Morales 2015]. Освобождение дофамина в стриатуме опосредует положительные подкрепляющие эффекты алкоголя, необходимые для становления алкогольного предпочтения [Raeder et al., 2008]. Более того, степень предпочтения алкоголя определяется величиной дофаминергического ответа в мезолимбической системе [Yim et Gonzales, 2000]. Это подтверждается тем, что крысы, инбридинг которых проводят по признаку предпочтения алкоголя, обнаруживают более выраженное повышение внеклеточного уровня дофамина в NAc, чем крысы дикого типа [Weiss et al., 1993; Crabbe et al., 2006; Ciccocioppo et al., 2006]. Katner и Weiss (2001), с помощью микродиализа, провели анализ эффектов алкоголя у крыс линий AA/ANA, HAD/LAD, Wistar и показали, что степень повышения внеклеточной концентрации дофамина при остром системном введении этанола определяет уровень предпочтения алкоголя [Katner et Weiss, 2001; Tuomainen et al., 2003]. Схожий эффект был показан для миндалины мозга (амигдалы), также имеющей дофаминергические входы [Морозов и др., 2015; Yoshimoto et al., 2000]. Как внутрибрюшинное, так и локальное введение алкоголя в CeA повышает локальный внеклеточный уровень дофамина [Yoshimoto et al., 2000].

Если острое воздействие алкоголя активирует мезолимбический путь дофаминергической системы «награды», то хроническая алкоголизация вызывает гиподофаминергическое состояние, сопряженное с дисфорией [Koob et Volkow, 2016]. Хроническая алкогольная интоксикация в течение 1 года у крыс снижает активность тирозингидроксилазы и увеличивает обратный захват дофамина в стриатуме [Rothblat et al., 2001].

В клинических исследованиях, визуализирующих степень повышения уровня DA в мозге человека, используются радиолиганды (радиотрейсеры) для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), а также однофотонной эмиссионной

компьютерной томографии (SPECT), которые связываются с D2 и D3 рецепторами с относительно низкой аффинностью, что делает их чувствительными к конкуренции с эндогенным DA, так что когда уровень DA увеличивается, их связывание с D2 и D3 рецепторами уменьшается. Впервые эти методы были клинически использованы с целью исследования эффектов внутривенного введения метилфенидата [Volkow et al. 1994] и впоследствии для изучения эффектов амфетамина [Laruelle et al. 1996]. Эти исследования продемонстрировали, что оба психостимулятора значительно повышают внеклеточный уровень DA в головном мозге. Однако в первых клинических исследованиях изменения уровня стриарного DA в ответ на введение алкоголя были получены неоднозначные результаты [Boileau et al., 2003; Urban et al. 2010]. В частности, исследование ПЭТ с внутривенной инфузией алкоголя показало значительное повышение уровня DA в правом вентральном стриатуме больных алкоголизмом, не обращавшихся за лечением (non-treatment-seeking alcoholics), но не среди изредка пьющих (social drinkers) [Yoder et al. 2016], что согласуется с первым исследованием ПЭТ, в котором не было показано значимых эффектов у здоровых добровольцев [Salonen et al., 1997].

Противоречивость этих данных контрастирует с согласованностью результатов, полученных в исследованиях на животных, большинство из которых отчетливо демонстрирует повышение уровня DA в NAc [Pierce et Kumaresan 2006; Lindman et al. 2000]. В другом исследовании использовалась болюсная инъекция [11C]раклоприда, с последующей постоянной инфузией для поддержания его равновесной концентрации в крови. Алкоголь также вводился внутривенно. Данное исследование выявило выраженное и быстрое повышение уровня DA, вызванное этанолом, в вентральном стриатуме здоровых добровольцев [Aalto et al. 2015].

1.2.4 Влияние алкоголя на транскрипционные факторы

Транскрипционные факторы служат ключевым звеном реализации различных генных программ, поскольку высокоспецифично связываются с соответствующими промоторными последовательностями ДНК [Renthal et Nestler, 2008; Rahman, 2012]. Активация чувствительных к алкоголю транскрипционных факторов приводит к изменениям в экспрессии определенных генов.

Фактор теплового шока-1 (HSF1) является фактором транскрипции, активность которого меняется после острого воздействия алкоголя. Было показано, что алкоголь увеличивает экспрессию мРНК субъединицы G4A-R ГАМК(А) рецептора за счет увеличения связывания HSF1 с его промоторной областью [Pignataro et al., 2007]. Острое введение алкоголя также облегчает активацию HSF1 в промоторной области синаптотагмина-1 — белка, участвующего в процессах высвобождения нейромедиаторов из пресинаптических окончаний, что позволяет предполагать, что алкоголь меняет кинетику освобождение различных нейромедиаторов [Pignataro et al., 2007, 2009]. Было обнаружено (*post mortem*), что уровень мРНК HSF в коре лобной доли больных алкоголизмом значимо отличается от контрольного [Lewohl et al., 2000].

Под действием алкоголя также происходит активация нескольких внутриклеточных сигнальных путей, определяющих уровень цАМФ, Ca2+ и активность регулируемой внеклеточным сигналом киназы (ERK). Эти события приводят к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB [Winstanley et al., 2007]. Как было сказано выше, при фосфорилировании CREB взаимодействует с CBP — разновидностью гистоновой ацетилтрансферазы. Было показано, что длительное воздействие алкоголя увеличивает активность фактора транскрипции CREB и, в свою очередь, его связывание с промотором NMDA рецептора, специфически увеличивая транскрипцию NR2B субъединицы. Мутация этого гена в промоторной области, где связывается CREB, устраняет стимулирующий эффект алкоголя, подтверждая, что CREB опосредует активацию транскрипции гена NR2B [Rani et al., 2005]. Это один из примеров чувствительного к алкоголю

транскрипционного фактора, влияющего на экспрессию рецепторов, участвующих в механизмах реакции на алкоголь [Most et al. 2014].

1.2.5 Эпигенетические эффекты алкоголя

Эпигенетические механизмы являются важным компонентом процессов обучения и долговременной памяти [Levenson et Sweatt, 2005], а также химических зависимостей [Renthal et Nestler, 2008]. Эпигенетические механизмы могут определять долгосрочные изменения функций мозга, связанные с развитием алкогольной зависимости [Waddington, 2012]. Метилирование ДНК, ацетилирование и фосфорилирование гистоновых белков представляют собой три фундаментальных механизма модификации структуры хроматина, делающих ДНК менее или более доступной для факторов транскрипции. Было показано, что хроническое введение алкоголя вызывает характерные изменения в структуре хроматина [Guerri et Pascual, 2010; Ponomarev et al., 2012].

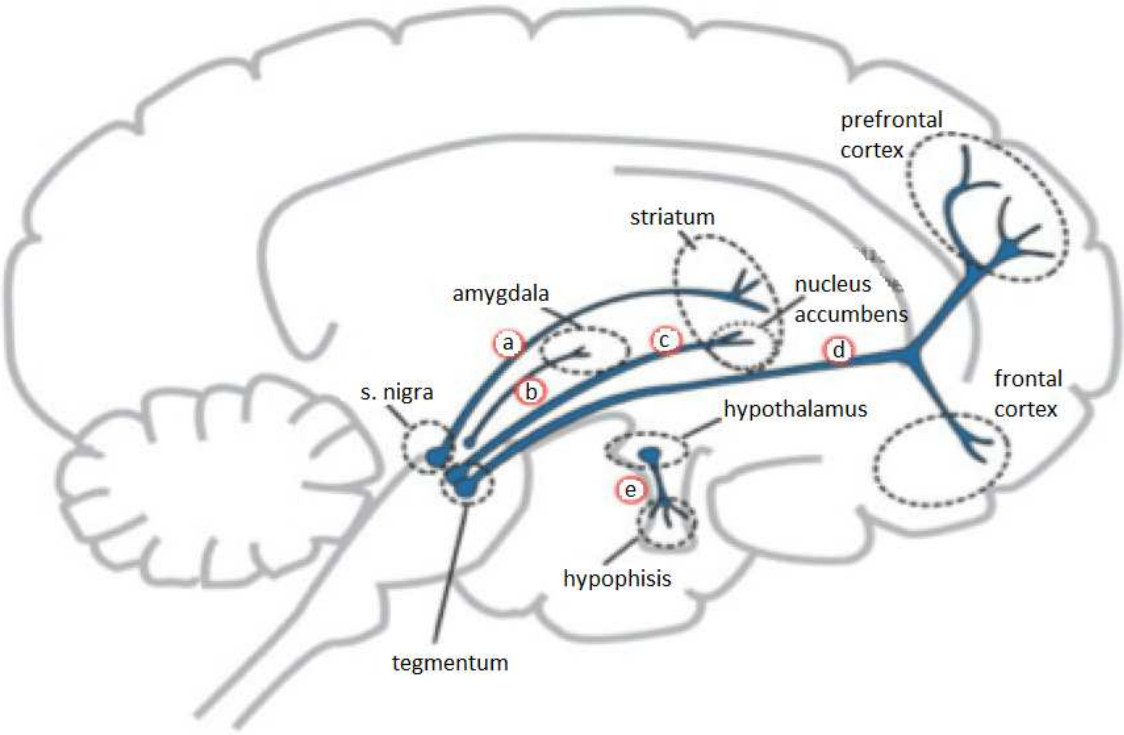
Гистондеацетилаза (HDAC) представляет собой фермент, который удаляет ацетильные группы из гистоновых белков, делая ДНК менее доступной для факторов транскрипции. Острое введение алкоголя снижает активность HDAC и увеличивает ацетилирование гистонов (H3 и H4) в миндалине мозга. С другой стороны, на фоне длительной абстиненции после хронического приема алкоголя активность HDAC постепенно восстанавливается и ацетилирование гистонов H3 и H4 в миндалине снижается [Pandey et al., 2008]. CREB-связывающий белок (CREB-binding protein; CBP) представляет собой гистонацетилтрансферазу (HAT), которая ацетилирует гистоны, обеспечивая активацию транскрипции. Острое воздействие алкоголя увеличивает уровень CBP, в то время как абстиненция наоборот — снижает. Более того, вызванное абстиненцией тревожное поведение коррелирует с уровнем CBP в миндалине [Pandey et al., 2008]. Мишенью изоформы гистондеацетилазы HDAC5, при хроническом воздействии алкоголя, является ген, кодирующий рецептор нейрокинина 1 (NK1). Было установлено, что подавление трансляции NK1 рецептора посредством РНК-интерференции,

снижает потребление алкоголя у мышей [Baek et al., 2010]. NK1-антагонист L822429 уменьшает добровольное потребление алкоголя, подавляет вызванное стрессом восстановление его поиска и чувствительность к его седативным эффектам [Schank et al., 2011]. Аналогичные эффекты наблюдались и клинически. Введение антагониста NK1 рецепторов LY686017 больным алкоголизмом после разрешения синдрома отмены алкоголя подавляло спонтанную актуализацию крейвинга, улучшало общее самочувствие и ослабляло сопутствующие кортизоловые реакции [George et al., 2008].

1.3 Состояние системы «награды» при алкогольной зависимости

В исследованиях с использованием электрической стимуляции отдельных областей головного мозга установлено, что центральным звеном эндогенной системы формирования удовольствия (системы «награды») является медиальный пучок переднего мозга (medial forebrain bundle), соединяющий вентральную область покрышки среднего мозга (ventral tegmental area; VTA) [Анохина, 2018; Дробленков и др., 2018] с прилежащим ядром (nucleus accumbens; NAc), расположенным в вентральном стриатуме, а также миндалиной (amygdala) и префронтальной корой (prefrontal cortex; PFC) [Olds et Milner, 1954) (рисунок 1.1). Восходящая дофаминергическая система мозга определяет не только гедонический ответ на внешние стимулы [Шабанов и др., 2014], но также придает внешним стимулам положительную мотивационную значимость [Шевелева и др., 2013; Robinson et Berridge, 2000; Robbins et Arnsten, 2009], являясь, таким образом, биологическим субстратом побуждения — поведения, направленного на достижение цели [Котов, 2003, 2008; Salamone et al., 2007]. Неотъемлемым свойством всех ПАВ, вызывающих зависимость, является способность вызывать острое и значительное повышение уровня дофамина в вентральном стриатуме [Анохина и др., 2017, 2018; Лебедев и др., 2014; Роик и др., 2014, 2015; Nestler, 2005; Koob, 2006]. Важно сказать, что предрасположенность к расстройствам

зависимости коррелирует с уровнем антител к нейромедиаторам [Давыдова и др., 2018; Ветрилэ и др. 2017].



a — нигростриарный путь; b + c — мезолимбический путь; d — мезокортикальный путь; e — тубероинфундибулярный путь

Рисунок 1.1 —Дофаминергические пути в мозге человека

У животных, в условиях хронической алкоголизации, 8-часовая отмена этанола приводила к выраженному снижению внеклеточной концентрации дофамина и ее восстановлению при возобновлении доступа к алкоголю. У зависимых от алкоголя грызунов регистрируется значительное снижение как вспышек активности, так и спонтанных разрядов дофаминергических нейронов VTA, проецирующихся в NAc и PFC [Diana et al., 1993; Bailey et al., 2001], что обнаруживается снижением уровня дофамина в микродиализате этих структур [Rossetti et al., 1992; Diana et al., 1993]. Эти данные позволяют предположить, что низкий уровень внеклеточного дофамина может определять отрицательный эмоциональный фон в период отмены алкоголя и лежать в основе мотивации его потребления [Weiss et Porrino, 2002].

В большинстве клинических исследований пресинаптических изменений дофаминергических нейронов у алкоголиков, использовались радиолиганды (радиотрейсеры) белка-переносчика (транспортера) дофамина (dopamine transporter; DAT). Эти исследования показали, что в остром периоде отмены алкоголя доступность DAT в стриатуме снижается [Laine et al. 1999a]. В то же время, большинство исследований, проведенных в хроническом периоде отмены алкоголя, не выявили различий с контролем [Heinz et al. 2000; Laine et al. 1999b; Volkow et al. 1996]. Таким образом, уровень DAT, вероятно, снижается на фоне острого синдрома отмены алкоголя, что, возможно, является адаптацией к низкому уровню дофамина в этом периоде, и повышается в дальнейшем, когда уровень внеклеточного DA возрастает [Laine et al. 1999b]. Хотя, в некоторых случаях, уровень DAT может оставаться хронически пониженным [Repo et al. 1999].

Поскольку количество DAT снижается, когда понижается экстраклеточный уровень дофамина и наоборот, использование радиолигандов, нацеленных на VMAT2 (vesicular monoamine transporter 2), было предложено в качестве более стабильного маркера уровня дофамина внутри пресинаптических окончаний. Единственное клиническое исследование, проведенное на добровольцах с тяжелой формой алкоголизма (по DSM-III), воздерживающихся от приема алкоголя на протяжении 3 — 9 месяцев до ПЭТ сканирования, обнаружило сниженное, по сравнению с контрольной группой, связывание радиолиганда VMAT2 [18F](+)дигидротетрабеназина в стриатуме, что может свидетельствовать о снижении запасов везикулярного DA в пресинаптических окончаниях даже в случае длительной абстиненции [Gilman et al. 1998].

Существует обширная литература, свидетельствующая о том, что алкоголизм сопряжен с уменьшением доступности D2 / D3 рецепторов и снижением дофаминергической нейротрансмиссии в стриатуме [Ravan et al. 2014; Volkow et al. 2017]. Искусственное увеличение экспрессии дофаминовых D2 рецепторов посредством введения в NAc аденовирусных векторов, содержащих ген D2 рецептора [Thanos et al., 2001, 2004, 2005], либо посредствам введения

каберголина [Анохин и др., 2017; Шамакина и др., 2017] снижают потребление алкоголя у крыс.

Два длительных клинических исследования оценивали восстановление численности D2 / D3 рецепторов в стриатуме после детоксикации. Одно исследование показало стойкое снижение стриарной доступности D2 / D3 рецепторов у зависимых субъектов даже после 4 месяцев воздержания от алкоголя [Volkow et al. 2002]. Другое исследование не показало никаких межгрупповых различий после детоксикации, однако у 4 из 17 алкоголиков, которые воздерживались от алкоголя в течение 1 года, наблюдалось значимое увеличение стриарной доступности D2 / D3 рецепторов [Rominger et al. 2012]. Оба исследования были хорошо спланированными и контролируемыми. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, у кого и в какие сроки возможно восстановление популяции D2 / D3 рецепторов в мезолимбических структурах мозга, и может ли этот показатель служить эффективным предиктором дальнейшей клинической динамики состояния больного.

Немногие исследования оценивали влияние алкоголя на другие рецепторы дофамина (D1, D3, D4 и D5). Хотя для D4 и D5 подтипов пока не существует селективныхрадиолигандов, созданы радиотрейсеры для D1 рецептора. Было показано, что у лиц, злоупотребляющих кокаином, низкая доступность D1 рецепторов в вентральном стриатуме была связана с высоким риском рецидива его потребления [Martinez et al. 2009]. Тем не менее, в настоящее время отсутствуют нейровизуализационные исследования доступности D1 рецепторов у больных алкоголизмом.

Известно, что при кокаиновой и метамфетаминовой зависимости [Martinez et al. 2009; Volkow et al. 2014; Volkow et al. 1997; Wang et al. 2012] наблюдается снижение высвобождения DA [Martinez et al. 2005; Volkow et al. 2007, 2014]. В этих исследованиях в качестве фармакологической пробы для измерения величины дофаминергического ответа использовались либо метилфенидат (ингибитор DAT), либо амфетамин (индуктор высвобождения дофамина).

Аналогичные исследования показали, что при алкоголизме дофаминергический ответ также значимо снижен [Martinez et al. 2005; Volkow et al. 2014; Volkow et al. 2007].

У здоровых субъектов, увеличение уровня дофамина, вызванное метилфенидатом, отрицательно коррелировало с базальной метаболической активностью во фронтальных областях мозга (ACC, OFC и DLPFC). То есть, чем выше была метаболическая активность в этих областях в покое, тем ниже был уровень экстраклеточного DA в стриатуме [Volkow et al. 2007]. Отсутствие такой ассоциации при алкоголизме согласуется с дефицитом префронтальной регуляции высвобождения DA в стриатуме [Volkow et al. 2007; Volkow et al. 2013].

1.4 Аллостатическая модель зависимости

Зависимость от психоактивных веществ является психическим расстройством, характеризующимся компульсивным влечением к поиску и употреблению ПАВ, потерей количественного контроля над употреблением с последующим развитием отрицательных аффектов в виде тревоги, дисфории, раздражительности и депрессивных состояний, характеризующих мотивационный компонент синдрома отмены в отсутствие доступа к ПАВ [Котов, 2010, 2012; Веретило и др., 2014; Арзуманов, Судаков, 2016; Koob et Moal, 2001]. Зависимость от ПАВ можно представить в виде трехфазного цикла — (1) интоксикация (эйфория), (2) синдром отмены и (3) антиципация (крэйвинг — влечение к повторной интоксикации) (Koob et Volkow, 2016).

В долгосрочной стабилизации механизмов зависимости выделяют два главных психофизиологических процесса — положительное подкрепление (positive reinforcement) и отрицательное подкрепление (negative reinforcement) [Koob, 2013].

Положительное подкрепление определяется как положительный эмоциональный ответ на воздействующий фактор (например, на прием алкоголя или наркотика), отрицательное подкрепление — как положительный

эмоциональный ответ на прекращение воздействия фактора (например, когда прием алкоголя или наркотика облегчает отрицательные эмоции и ангедонию). Иными словами, положительное подкрепление сопряжено с возникновением положительных эмоций, а отрицательное подкрепление — с разрешением отрицательных эмоций [Koob, 2013].

Нейробиологическими субстратами положительного и отрицательного подкрепления служат две ключевые системы мотивации, необходимые для выживания индивида — система «награды» (reward system) и система ее отрицательной регуляции — система «анти-награды» (anti-reward system) (стресс-реактивности) [Koob, 2013].

Согласно теории Solomon (1980), гедонический ответ в ЦНС автоматически активирует противоположный процесс, призванный уменьшать интенсивность возникшего удовольствия. Эти два противоположно направленных взаимно компенсирующих процесса были названы a-процессом (гедонический ответ) и b-процессом (ответ, противоположный гедоническому). A-процесс, таким образом, запускает b-процесс, призванный восстанавливать гомеостатическое равновесие. Особенностью b-процесса является медленное развитие и большая продолжительность по сравнению с a-процессом (Solomon, 1980). Согласно Koob et Moal (2001), по мере развития зависимости, тонус b-процесса начинает все больше преобладать, смещая точку гомеостатического равновесия в положение аллостаза (Koob et Moal, 2001) (рисунок 1.2).

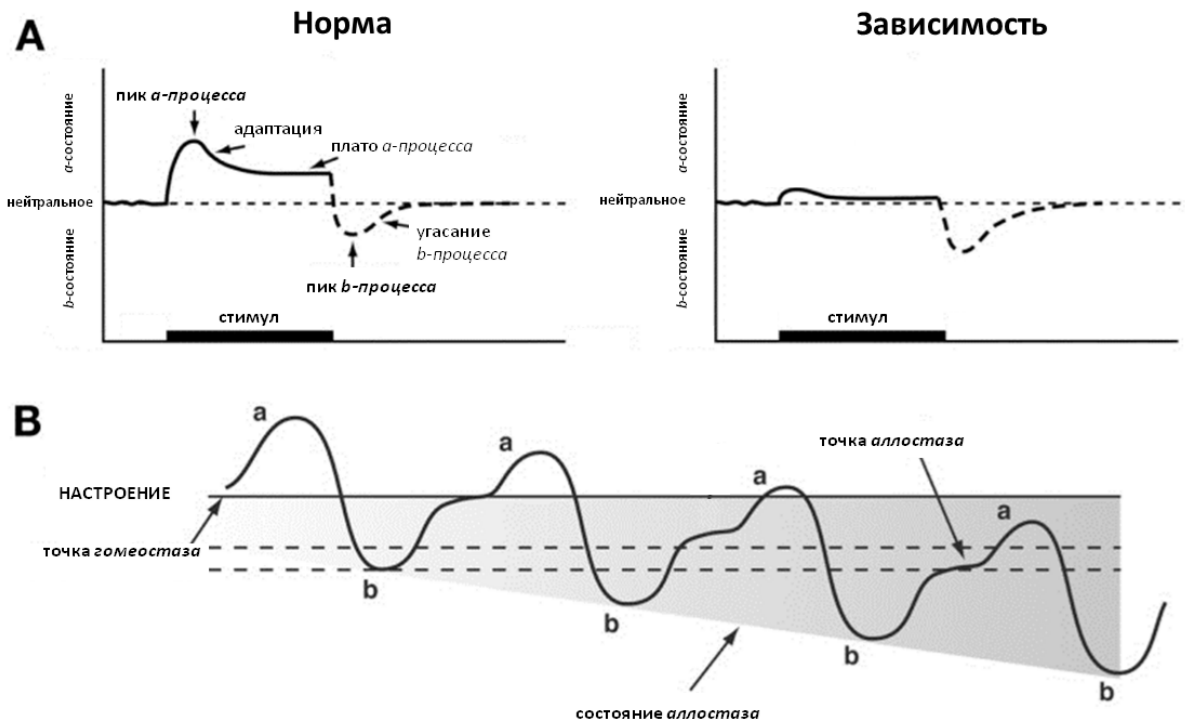


Рисунок 1.2 — Формирование состояния гедонического аллостаза [из Koob et Moal, 2001]

Согласно Koob (2013), состояние аллостаза характеризуется стойким повышением активности системы «анти-награды» и персистенцией таких симптомов как ангедония, дисфория, депрессия, тревога и раздражительность, даже после разрешения острого абстинентного синдрома, посредством двух механизмов: (1) индукции CRF стрессогенных реакций и анксиогенеза в распространенной миндалине и (2) индукции депрессивных и дисфорических состояний в результате подавления мезокортиколимбической дофаминергической нейротрансмиссии динорфином. Хроническая гипофункция системы «награды» и гиперфункция системы «анти-награды» является стойким источником отрицательного подкрепления, поддерживающего компульсивное стремление к приему алкоголя [Koob, 2013].

Несмотря на правдоподобность, модель аллостаза имеет очевидные недостатки. Во-первых, главный постулат данной концепции, что крейвинг и потребление алкоголя являются следствием отрицательных аффектов, нуждается в экспериментальном подтверждении. Во-вторых, переход гомеостаза в аллостаз

сложно зарегистрировать в эксперименте. И, наконец, акцент на отрицательном подкреплении приводит к явной недооценке положительного подкрепления как ведущей мотивации возобновления алкоголизации.

Таким образом, аллостатическая модель предполагает прогрессивное снижение дофаминергического ответа с увеличением продолжительности алкоголизации у зависимых субъектов. Тем не менее, применимость этой концепции к механизмам рецидива зависимости, либо выработки предпочтения — не очевидна [Hansson et al., 2018].

1.5 Эндогенная опиоидная система

1.5.1 Номенклатура и филогенез

Эндогенные опиоидные пептиды являются производными четырех пептидных предшественников: проопиомеланокортина, проэнкефалина, продинорфина и проноцицептина, являющихся продуктами экспрессии четырех одноименных генов (POMC, PENK, PDYN и PNOC).

Эндогенные опиоидные пептиды являются лигандами четырех типов опиоидных рецепторов: μ, δ, κ и ноцицептинового, обозначаемых по номенклатуре IUPHAR как MOP, DOP, KOP и NOP соответственно. Преимущественными эндогенными лигандами этих рецепторов являются: эндорфины (End), энкефалины (Enk), динорфины (Dyn) и ноцицептин (Noc) соответственно [Pfaff, 2013] (Рисунок 1.3, Таблица 1.2).

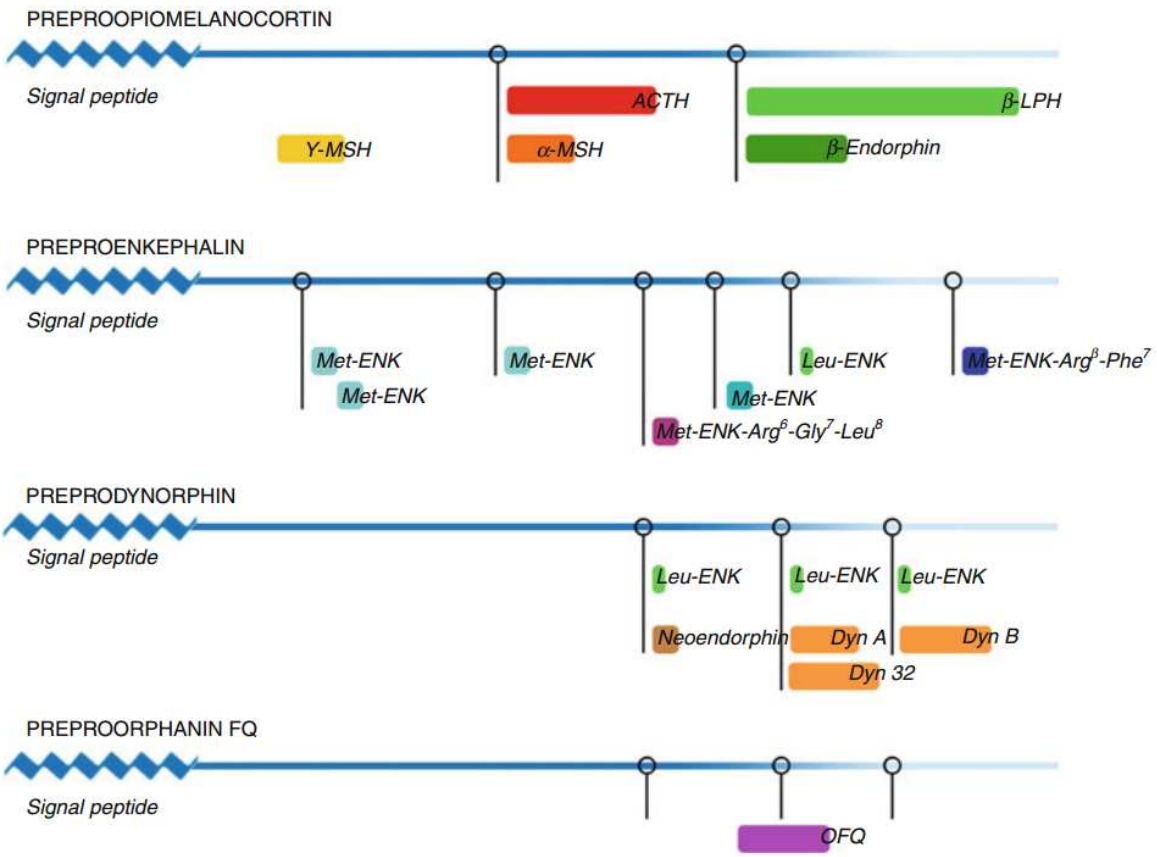


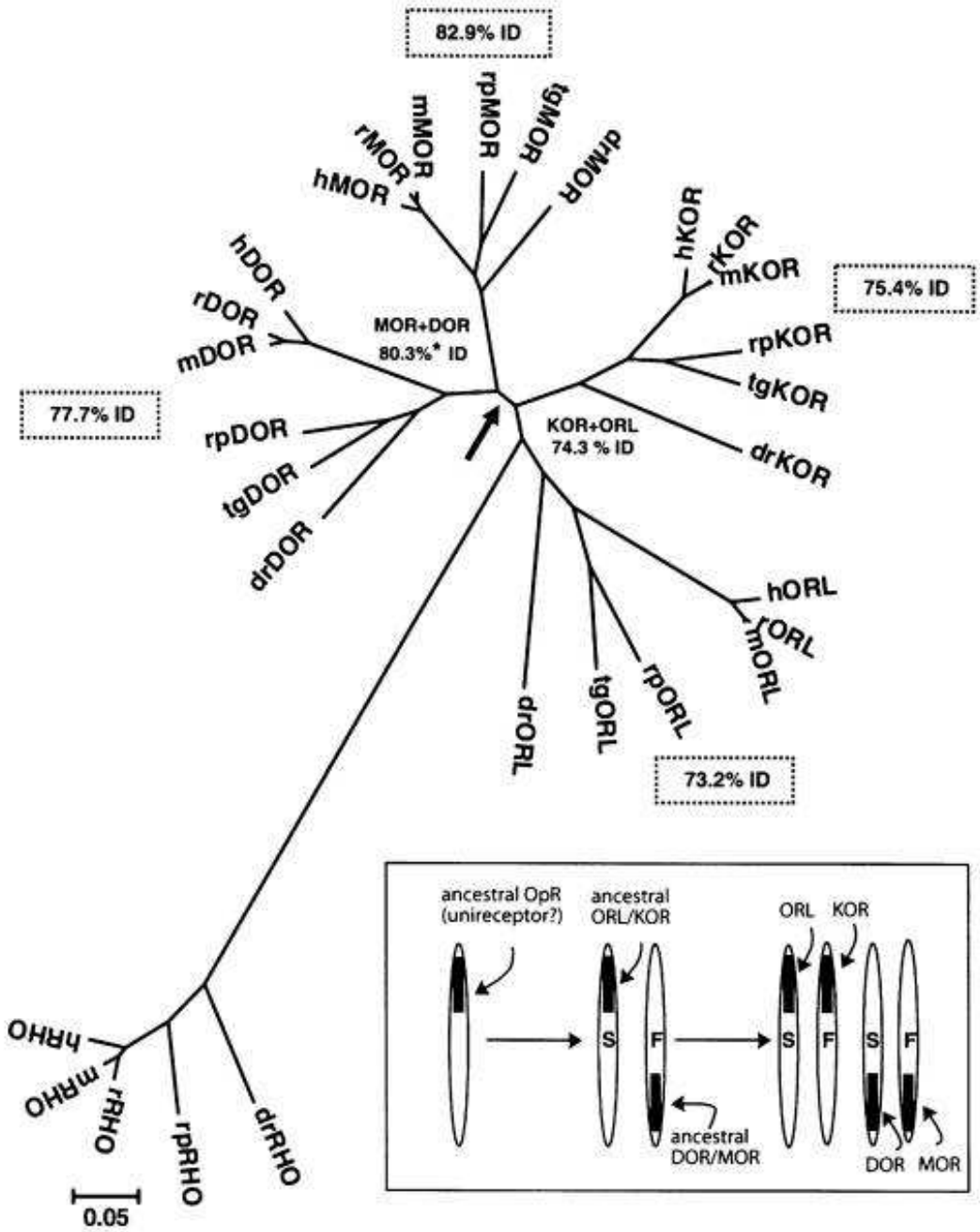
Рисунок 1.3 — Карта предшественников опиоидных пептидов (по [Pfaff, 2013])

Таблица 1.2 — Структура некоторых эндогенных опиоидных пептидов (по [Pfaff, 2013])

α-Endorphin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr
β-Endorphin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
γ-Endorphin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu
α-Neoendorphin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β-Neoendorphin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
Leu-Enkephalin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu
Met-Enkephalin	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Met
Dynorphin A	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Arg-Asn-Gln
Dynorphin B	**Tyr-Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
Nociceptin	**Phe-Gly-Gly-Phe**-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln

На рисунке 1.4 представлена четырехлепестковая диаграмма эволюционной дивергенции генов, кодирующих опиоидные рецепторы. Все четыре типа опиоидных рецепторов млекопитающих образовались в процессе эволюции из единого гена предшественника в результате квадрипликации обширных хромосомных регионов, предположительно в ходе двух раундов глобальной дупликации генома позвоночных в раннем палеозое [Dreborg et al. 2008; Larhammar et al., 2009; Stevens et al., 2007; Stevens, 2015].

Иными словами, наибольшая степень эволюционно-генетического родства наблюдается внутри пар генов, кодирующих KOP/NOP и MOP/DOP рецепторы. Таким образом, соответствующая функциональная поляризация, наблюдаемая на уровне регуляции дофаминергической нейротрансмиссии в мезокортиколимбических контурах (супрессия и индукция соответственно), представляется вполне закономерной. В свете этого крайне интересно рассмотреть фармакодинамические характеристики недавно описанного первого опиоидного панантагониста AT-076. Показано, что данное соединение проявляет свойства неконкурентного инактивирующего антагониста в отношении пары KOP/NOP рецепторов и, в то же время, ведет себя как конкурентный короткодействующий антагонист в отношении пары MOP/DOP рецепторов [Zaveri et al., 2015].



Стрелка указывает на филогенетическую бифуркацию последовательностей анцестральных генов-предшественников MOP/DOP и KOP/NOP рецепторов (первый раунд глобальной дупликации генома позвоночных)

%ID — процент идентичности последовательностей

«**S**» медленный темп адаптивной эволюции, «**F**» высокий темп адаптивной эволюции

MOR — MOP рецептор; **DOR** — DOP рецептор; **KOR**– KOP рецептор; **ORL**– NOP рецептор; **RHO** — родопсин;

h — Homo sapiens; **rp** — Rana pipiens; **dr** –Dano rerio; **tg** –Taricha granulosa; **m** — Mus musculus; **r** — Rattus norvegicus

Рисунок 1.4 — Филогенетический анализ генов, кодирующих опиоидные рецепторы позвоночных (по [Stevens et al., 2007])

1.5.2 Эндорфин/MOP-рецепторная и энкефалин/DOP-рецепторная системы

Показано, что острые положительные подкрепляющие эффекты алкоголя (эйфория) частично опосредуются эндорфинами и энкефалинами [Weerts et al., 2011], взаимодействующими с MOP и DOP рецепторами соответственно. Связывание β-эндорфина и энкефалинов со своими рецепторами увеличивает уровень экстраклеточного дофамина в вентральном стриатуме и, таким образом, может являться важным звеном в механизме развития алкогольной эйфории [Панченко и др., 2002]. Дофаминергическая нейротрансмиссия в мезолимбической системе контролируется MOP рецепторами, локализующимися на ГАМКергических нейронах VTA. Последние осуществляют ингибиторный контроль биоэлектрической активности дофаминергических нейронов. Поскольку все типы опиоидных рецепторов сцеплены с ингибиторными G-белками, активация MOP рецепторов данной локализации приводит к дезингибированию дофаминергических нейронов и повышению уровня дофамина в вентральном стриатуме [Xia et al., 2011]. Показано, что фармакологическая блокада MOP рецепторов налоксоназином в значительной степени предотвращает высвобождение дофамина в NAc, вызванное алкоголем [Tanda et Di Chiara, 1998]. Тем не менее, результаты многих исследований роли MOP рецепторов VTA в индукции дофаминергической нейротрансмиссии алкоголем противоречивы. В частности, микроинъекция MOP-антагониста налтрексона в VTA снижала способность алкоголя индуцировать высвобождение дофамина в NAc с большой задержкой, в отличие от немедленной блокады аналогичного эффекта экзогенных опиоидов [Крупицкий и др., 2017]. Авторы пришли к заключению, что MOP рецепторы в VTA играют роль не в инициации алкоголь-индуцированной аккумбеальной дофаминергической нейротрансмиссии, а в ее поддержании [Valenta et al., 2013]. Более того, условный нокаут гена (conditional gene knockout) MOP рецептора в переднем мозге, но не в среднем и промежуточном мозге, снижает потребление алкоголя [Ben Hamida et al., 2019]. Среди различных стриарных популяций MOP рецепторов, положительное подкрепление

обеспечивают те, что локализуются на D1-MSN прямого пути [Cui et al., 2014]. Таким образом, однозначно локализовать MOP рецепторы, опосредующие дофаминергический ответ на алкоголь, в настоящее время затруднительно [Hansson et al., 2018].

ПЭТ исследования доступности MOP рецепторов в головном мозге недавно детоксифицированных алкоголиков обнаружили снижение их количества в DLPFC и теменной коре [Bencherif et al., 2004], но увеличение в вентральных отделах стриатума, таламусе и других лимбических структурах, сохранившееся через 5 недель после отмены алкоголя [Heinz et al., 2005a; Weerts et al., 2011].

Выраженность крейвинга коррелировала с доступностью MOP рецепторов в определенных областях мозга. В префронтальных регионах, связанных с исполнительными функциями, плотность MOP рецепторов отрицательно коррелировала с выраженностью крейвинга, эффект был наиболее выражен в правой DLPFC. Кроме того, плотность MOP рецепторов в DLPFC также отрицательно коррелировала с подавленным настроением [Bencherif et al., 2004; Weerts et al. 2011]. Это указывает на общность нейронных контуров, связанных с крэйвингом и депрессивными симптомами при алкоголизме [Bencherif et al., 2004]. Напротив, в структурах мезолимбической системы награды, уровень экспрессии MOP рецепторов положительно коррелировал с интенсивностью крейвинга [Heinz et al., 2005a; Williams et al., 2009].

Следует отметить, что данные нейровизуализационных исследований с использованием [11C]карфентанила трудно интерпретировать однозначно. Карфентанил является агонистом, конкурирующим за сайт связывания с эндогенным лигандом. По этой причине кажущаяся доступность MOP рецепторов зависит от уровня эндорфинов [Zubieta et al., 2001]. То есть, увеличение связывания [11C]карфентанила может отражать как увеличение количества рецепторов так и снижение концентрации эндорфинов. Для решения этой проблемы, Hermann et al. (2017) сравнили количество MOP рецепторов в тканях мозга, больных алкоголизмом (postmortem; n = 43) с группой контроля (postmortem; n = 43) при помощи авторадиографии и ПЦР в реальном времени.

Для сравнения авторы провели ПЭТ сканирование с использованием [11C]карфентанила в группе добровольцев (n = 38), страдающих алкоголизмом. Авторы обнаружили значительное снижение (23-51%) количества MOP рецепторов и кодирующей их мРНК в стриатуме алкоголиков [Hermann et al., 2017]. По результатам исследования авторы пришли к заключению, что наблюдающееся при алкоголизме повышенное связывание [11C]карфентанила, в действительности является следствием снижения концентрации эндорфинов. Авторы полагают, что обнаруженное снижение абсолютного количества MOP рецепторов в стриатуме алкоголиков, может отражать развитие толерантности к положительным подкрепляющим эффектам алкоголя и натуральных стимулов [Hermann et al., 2017]. Кроме того, в плазме алкоголиков было обнаружено снижение уровня β-эндорфина [Williams et al., 2009], а генетические исследования выявили полиморфизмы, ассоциированные с низким уровнем β-эндорфина и риском развития алкоголизма [Del Arbol et al., 2007]. Таким образом, увеличение доступности MOP рецепторов на ПЭТ при алкоголизме вероятно отражаетвыраженное снижение уровня β-эндорфина, а не увеличение абсолютного количества MOP рецепторов [Volkow et al., 2017].

Лишь одно ПЭТ исследование измеряло доступность DOP рецепторов при алкоголизме, и выявило незначительную тенденцию к увеличению их доступности. Повышенное связывание антагонистического радиолиганда [11C]метилналтриндола положительно коррелировало с недавним употреблением алкоголя [Weerts et al., 2011]. Это свидетельствует о том, что DOP рецепторы тоже могут быть вовлечены в патогенез алкоголизма, однако для подтверждения этого требуются дополнительные исследования [Volkow et al., 2017].

1.5.3 Динорфин/KOP-рецепторная система

Динорфины — эндогенные опиоидные пептиды, проявляющие преимущественную тропность к KOP рецепторам. Их психотропные эффекты во многом противоположны таковым эндорфинов и энкефалинов. Динорфины

являются продуктами экспрессии гена продинорфина. Они включают динорфин A, динорфин B, α-, β-неоэндорфины и др. [Pfaff, 2013] (Рисунок 1.3, табл.1.1). Аффинность и агонистическая эффективность динорфинов в отношении KOP рецептора различается. Динорфин A имеет максимальную активность, а β-неоэндорфин — минимальную [Chen et al., 2007]. Для их обозначения, в тексте настоящей работы используется собирательный термин «динорфин».

Высокий уровень экспрессии динорфина и KOP рецепторов характерен для базальных ганглиев, миндалины, таламуса гиппокампа, коры и моноаминергических ядер ствола мозга. Стриатум состоит главным образом из ГАМКергических средних шипиковых нейронов [Medium Spiny Neurons; MSN], составляющих ~90% популяции всех нервных клеток в этой структуре [Sesack et Grace, 2010]. MSN имеют разветвленные дендриты и получают конвергирующуюглутаматергическуюи дофаминергическуюиннервацию со стороны мезенцефальных, таламических и корковыхструктур. Такая конвергенция отражает интегративные функции MSN, на телах которых происходит суммация дендритных возбуждающих и тормозных потенциалов [Sesack et Grace, 2010]. Активность MSN управляется глутаматергическими афферентами, при этом дофамин выполняет модулирующую функцию [O'Donnell et al., 2003; Surmeier et al., 2007]. В стриатуме дофамин взаимодействует главным образом с D1 и D2 рецепторами, локализованными на разных популяциях MSN проекции которых образуют два стриомезенцефальных пути: 1) прямой — однонейронный, оканчивающийся синаптическими контактами на мезолимбических дофаминергических нейронах мезостриарной порции и 2) непрямой — двухнейронный, имеющий переключение в бледном шаре. MSN прямого пути экспрессируют на своих телах D1 рецепторы (возбуждающие). MSN непрямого пути — D2 рецепторы (тормозные) [Francis et Lobo, 2017].

В стриатуме динорфин экспрессируется в ГАМКергических MSN, которые экспрессируют D1 рецепторы (D1-MSN) [Al-Hasani et al., 2015; Tejeda et al., 2017; Tejeda et Bonci, 2019]. D1-MSN устанавливают синаптические контакты на телах D2-MSN, и наоборот — образуя реципрокную систему [Tejeda et al., 2017]. D1-

MSN считаются основным источником динорфина в стриатуме и устанавливают коллатеральные контакты на пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов [Svingos et al., 1999; Muschamp et Carlezon, 2013]. D2-MSN стриатума ко-экспрессируют энкефалин [Smith et al., 2013].

Экспрессия динорфина в стриатуме индуцируется одновременной активацией D1 и NMDA рецепторов [Smith et al., 2013]. Интрастриарная перфузия агониста D1 рецепторов SKF38393, приводит к повышению концентрации динорфина в диализате, что коррелирует с локальным снижением уровня дофамина [Wang et al., 1999]. Антагонисты D1 или NMDA рецепторов [Daunais et McGinty, 1996; Drago et al., 1996; Wang et al., 1999], либо нокаут гена D1 рецептора предотвращают влияние непрямых дофаминомиметиков на уровень динорфина. В оболочке NAc активация дофаминовых D1 рецепторов, расположенных на телах и дендритах MSN прямого пути, запускает внутриклеточные каскады, приводящие к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB. CREB (cAMP response element-binding protein) — транскрипционный фактор, специфически связывающийся с последовательностями ДНК, именуемыми CRE (cAMP response elements), в промоторах определенных генов. Активация D1 рецепторов приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB и, в свою очередь, активации транскрипции мРНК продинорфина. Таким образом, каппа-опиоидная система выступает в роли отрицательной обратной связи, призванной подавлять избыточную дофаминергическую и глутаматергическуюнейротрансмиссию [Steiner et Gerfen, 1995; Bailey et al., 2007; McClung et Nestler, 2008; McCarthy et al., 2012; Muschamp et Carlezon, 2013; Trifilieff et Martinez, 2013; Bilbao et al., 2014; Nestler, 2015; Resendez et al., 2016].

D1-MSN, коэкспрессирующие динорфин и субстанцию P [Korotkova et al., 2006], в составе прямого пути направляют проекции в VTA и SNc [Smith et al., 2013; Tejeda et Bonci, 2019]. Амигдаларные динорфин-положительные ГАМКергические нейроны, собранные в латеральной порции CeA, ко-экспрессируют CRF и иннервируют дорсальную часть VTA, SNc и LC (в

медиальной порции CeA располагаются энкефалин-положительные ГАМКергические нейроны). VTA получает иннервацию также динорфин-положительными глутаматергическими нейронами латерального и медиального гипоталамуса. Динорфин-положительные нейроны латерального гипоталамуса ко-экспрессируют орексин [Chou et al., 2001; Ma et al., 2003; Marchant et al, 2007; Reyes et al., 2008; Tejeda et Bonci, 2019]. Следует заметить, что перечисленные ко-экспрессируемые нейропептиды опосредуют реакции стресса и играют важную роль в механизмах развития алкогольной и наркотической зависимости [Schank et al., 2012].

Голубое пятно [locus coeruleus; LC] является главным источником норадренергической иннервации структур ЦНС и играет ключевую роль в поддержании уровня бодрствования, когнитивном функционировании и развитии стрессовых реакций [Robbins et Arnsten, 2009]. Норадренергические нейроны LC получают обильную иннервацию динорфин-содержащими нервными окончаниями, большинство из которых является глутаматергическими [Reyes et al., 2007]. Локализуясь пресинаптически, KOP рецепторы снижают высвобождение возбуждающих аминокислот из афферентов LC [Kreibich et al., 2008; Reyes et al., 2009]. KOP рецепторы экспрессируются также на телах и дендритах норадренергических нейронов [Tejeda et Bonci, 2019].

Дорсальное ядро шва (dorsal raphe nucleus; DRN) является главным источником серотонинергической иннервации ЦНС. KOP рецепторы экспрессируются на телах серотонинергических нейронов DRN и пресинаптических окончаниях их проекций в стриатуме. Помимо снижения освобождения серотонина из пресинаптических окончаний, стимуляция KOP рецепторов приводит к транслокации серотонин-транспортного белка (SERT) из цитоплазмы в плазматическую мембрану и усилению его обратного захвата [Lalanne et al., 2014].

В VTA KOP рецепторы локализуются на телах и дендритах дофаминергических нейронов. Под воздействием KOP-агониста U69593 наблюдается гиперполяризация только мезокортикальных и мезоамигдаларных

дофаминергических эфферентов среднего мозга, но не мезолимбических. Это свидетельствует о том, что в VTA KOP рецепторы на телах и дендритах дофаминергических нейронов мезостриарной порции отсутствуют [Margolis et al., 2006; Devine et al., 1993; Spanagel et al., 1992]. KOP рецепторы в VTA локализуются также на пресинаптических окончаниях ГАМКергических нейронов, образующих синапсы на телах дофаминергических нейронов [Polter et al., 2017]. KOP рецепторы данной локализации играют ключевую роль в стресс-индуцированном восстановлении и поддержании угашенного поведения, направленного на поиск наркотика [Polter et al., 2017]. К сожалению, на сегодняшний день, проекционная специфичность источников динорфина, регулирующих активность конкретных порций дофаминергических эфферентов среднего мозга, остается малоизученной [Tejeda et Bonci, 2019].

Стриарные KOP рецепторы локализуются на пресинаптических окончаниях дофаминергических и глутаматергических афферентов [Svingos et al., 2001; Hjelmstad et Fields, 2001], а также на телах, дендритах и окончаниях D1/D2-MSN [Svingos et al., 1999; Meshul et McGinty, 2000; Tejeda et al., 2017]. Ультраструктурные исследования показали, что динорфин-положительные окончания располагаются в непосредственной близости от KOP-иммунореактивных терминалей [Svingos et al., 1999]. Это свидетельствует о том, что основным источником динорфина, воздействующим на пресинаптические KOP рецепторы является его локальное освобождение из коллатералей D1-MSN [Tejeda et Bonci, 2019].

KOP-иммунореактивность в области тел MSN тесно связана с эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи, тогда как в области проксимальных дендритов — с плазматической мембраной [Tejeda et Bonci, 2019]. Такая проксимальная локализация KOP рецепторов на мембране дендритов имеет стратегическое значение, поскольку их активация приводит к гиперполяризации мембраны, препятствуя прохождению конвергирующих возбуждающих сигналов и активации нейрона [Tejeda et Bonci, 2019].

КОР рецепторы, имеющие пресинаптическую локализацию на дофаминергических окончаниях в стриатуме, могут быть непосредственно ассоциированы с DAT, положительно модулируя его активность и усиливая обратный захват дофамина [Thompson et al., 2000; Kivell et al., 2014]. Кроме того, многократное введение селективного КОР-агониста U69593 снижает количество пресинаптических D2 рецепторов, что позволяет предположить, что в стриатуме КОР рецептор является частью макромолекулярного гетеромерного комплекса, включающего DAT и D2 рецептор [Acri et al., 2001].

У здоровых добровольцев введение агонистов КОР рецепторов оказывает аверсивное, анксиогенное, седативное, продисфорическое, депрессогенное, диссоциативное и галлюциногенное действие. Все эти эффекты снимаются налоксоном [Pfeiffer et al., 1986; Chappell et al., 1993; Rimoy et al., 1994; Ur et al., 1997; Walsh et al., 2001; Shippenberg et al., 2007; Lange et al., 2010].

Показано, что у депрессивных пациентов, совершивших суицид, как и у животных, находящихся в условиях хронического неизбежного стресса, наблюдается значительное увеличение уровня мРНК продинорфина и самого динорфина в стриатуме и гиппокампе [Shirayama et al., 2004; Hurd et al., 1997; Bruchas et al., 2010].

Доклинические и клинические данные говорят о том, что антагонисты КОР рецепторов оказывают анксиолитическое действие [Knoll et al., 2007]. Антагонисты КОР рецепторов проявляют антидепрессивные свойства в моделях стресса, индуцированного многократными процедурами принудительного плавания [Mague et al. 2003], либо социальным поражением (social defeat) [McLaughlin et al. 2003, 2006; Shirayama et al. 2004; Lalanne et al., 2014]. Мыши с нокаутом гена продинорфина также демонстрируют значительно сниженную тревогу и антидепрессивный фенотип в соответствующих поведенческих моделях [Wittmann et al., 2009; Bruchas et al., 2010].

Процедура интракраниальной самостимуляции (ICSS) широко применяется для изучения влияния различных соединений на гедонический порог (hedonic threshold]. В данной парадигме принципиальная роль отводится величине «порога

ICSS», индивидуальные значения которого стабильны и отражают фоновый уровень активности эндогенной системы «награды». Ангедонические состояния, такие как синдром отмены алкоголя, сопровождаются повышением порога ICSS, проявляясь необходимостью производить бóльшую самостимуляцию, для поддержания физиологических значений гедонического потенциала [Carlezon et al., 2007]. Системное введение агонистов KOP рецепторов интактным животным повышает порог ICSS [Carlezon et al., 2006; Todtenkopf et al., 2004], тогда как введение антагонистов KOP рецепторов не изменяет его, свидетельствуя о том, что система «награды» в обычных условиях не находится под тоническим ингибирующим влиянием каппа-опиоидной системы [Todtenkopf et al., 2004].

Агонисты KOP рецепторов, снижают подкрепляющее действие алкоголя [Башкатова и др., 2014; Тригуб и др., 2013; Судаков и др., 2017; Anderson et Becker, 2017; Lindholm et al., 2001] и наркотиков за счет подавления мезолимбической дофаминергической нейротрансмисси [Wee et Koob, 2010]. Так, системное введение KOP-агонистов дозозависимо снижает самовведение кокаина и морфина у интактных крыс [Glick et al., 1995; Schenk et al., 1999]. Однако у обезьян с выработанным предпочтением — восстанавливает угашенное самовведение кокаина [Valdez et al., 2007]. Агонист KOP рецепторов U50488 снижает положительное подкрепляющее действие алкоголя и уровень его добровольного потребления интактными животными [Lindholm et al., 2001]. Однако у зависимых животных после разрешения синдрома отмены алкоголя, введение KOP-агониста энадолина повышает его потребление и может быть интерпретировано, как попытка животного преодолеть ангедонию, вызванную стимуляцией KOP рецепторов [Hölter et al., 2000]. norBNI предотвращает возобновление самовведения алкоголя у зависимых от этанола крыс после абстиненции [Walker et al., 2011]. Антагонисты KOP рецепторов предотвращают рост потребления алкоголя, обусловленный предъявлением стимулов, предварительно ассоциированных с синдромом его отмены [Berger et al. 2013].

У грызунов и приматов метамфетамин и кокаин, значительно повышают уровень экспрессии мРНК продинорфина и самого динорфина в стриатуме и

латеральном гипоталамусе [Turchan et al., 1998; Zhou et al. 2002; Fagergren et al., 2003; Schlussman et al., 2005; Zhou et al. 2008]. Алкоголь также повышает экспрессию динорфина в NAc [Anderson et Becker, 2017; Lindholm et al., 2000; Marinelli et al., 2006], CeA [Lam et al., 2008; Chang et al., 2010], mPFC и гипоталамусе [Chang et al., 2010]. Острое введение этанола вызывает более выраженное повышение уровня дофамина в NAc у мышей с инактивированным геном KOP рецептора, либо на фоне введения KOP-антагонистов [Zapata et Shippenberg, 2006].

Хронический неизбегаемый стресс приводит к восстановлению угашенного самовведения алкоголя [Funk et al., 2014] и кокаина [Beardsley et al., 2010] у крыс и потенцирует их поведенческие эффекты в тесте предпочтения места [Schindler et al., 2012]. Этого не наблюдается на фоне введения антагониста KOP рецепторов norBNI, либо при нокауте гена продинорфина [McLaughlin et al., 2003, 2006]. С другой стороны, синдром отмены алкоголя и наркотиков характеризуется манифестацией признаков острого стресса [Koob et Kreek, 2007]. На фоне синдрома отмены алкоголя наблюдается увеличение экспрессии продинорфина в NAc [Przewłocka et al., 1997]. Также показано, что острый синдром отмены кокаина сопровождается значительным увеличением степени KOP/G-белкового сопряжения, определяемого по связыванию меченного устойчивого к гидролизу аналога GTP — [35S]GTPγS [Piras et al., 2010].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что активация KOP-рецепторов вызывает подавление дофаминергической, норадренергической, серотонинергической и глутаматергической нейротрансмиссии в ЦНС [Lalanne et al., 2014; Tejeda et Bonci, 2019].

Активация динорфинергической нейротрансмиссии, снижает биоэлектрическую активность мезокортиколимбических дофаминергических нейронов [Koob et Volkow, 2016], а также ингибирует освобождение дофамина и глутамата за счет гиперполяризации пресинаптической мембраны [Hjelmstad et Fields, 2001]. Показано, что дисфория и депрессивные проявления, вызванные повторной экспозицией стрессу, связаны с повышением уровня Dyn в

мезолимбических структурах — VTA, NAc и CeA [Цой-Подосенин и др., 2009; Bruchas et al., 2010; Knoll et Carlezon, 2010] чего не обнаруживается у грызунов с нокаутом генов, кодирующих pDyn или KOP рецептор [McLaughlin et al., 2003].

Корреляционный анализ клинического течения алкоголизма показывает, что стрессовые жизненные события положительно соотносятся с тяжестью злоупотребления алкоголем и частотой рецидивов пьянства [Dawson et al., 2007]. Известно, что стресс-индуцированный анксиогенез и дисфория повышают риск злоупотребления ПАВ у человека [Kloet et al., 2005; Судаков и др., 2011] и приводят к возобновлению угасшего поведения, направленного на поиск наркотика у крыс [Трусова и др., 2018; Shaham et al., 2000].

В первом исследовании Vijay et al. (2015), изучавшем доступность KOP рецепторов посредством ПЭТ сканирования при алкоголизме, было показано, что мужчины имеют более высокую доступность KOP рецепторов, чем женщины, однако различий между 14 добровольцами с алкогольной зависимостью и 18 здоровыми выявлено не было [Vijay et al. 2015]. Однако в более позднем исследовании Vijay et al. (2018), изучавшем доступность KOP рецепторов с использованием того же радиотрейсера [11C]LY2795050, было показано снижение доступности KOP рецепторов у больных алкоголизмом (n = 36) в миндалине и бледном шаре по сравнению с контрольными (n = 28) субъектами [Vijay et al. 2018].

1.5.4 Ноцицептин (орфанин FQ)/NOP (ORL_1)-рецепторная система

Рецептор ноцицептина, ранее известный как ORL_1 рецептор, в настоящее время Международным союзом фармакологии (IUPHAR) отнесен к семейству опиоидных рецепторов на основании структурной гомологии с другими опиоидными рецепторами, достигающей в области трансмембранных доменов 80% [Witkin et al., 2014; Mollereau et al., 1994; Mogil et Pasternak, 2001; Foord et al., 2005]. Рецептор ноцицептина обозначается как NOP [Cox et al., 2015].

Гептадекапептид ноцицептин, был открыт в 1995 году параллельно двумя исследовательскими группами и получил два альтернативных названия: ноцицептин [Meunier et al., 1995] и орфанин FQ [Reinscheid et al., 1995]. Ноцицептин является продуктом экспрессии и посттрансляционного процессинга гена проноцицептина [Mollereau et al., 1996].

Ноцицептин лишен значимого сродства к иным опиоидным рецепторам, кроме NOP рецептора [Foord et al. 2005], а его фармакологические эффекты не предотвращаются введением универсального опиоидного антагониста налоксона [Mogil et Pasternak, 2001]. Ноцицептин получил свое название в связи с гипералгезией, вызываемой егосупраспинальным введением. На уровне болевых центров спинного мозга ноцицептин, однако вызывает аналгезию [Fioravanti et Vanderah, 2008]. Ноцицептин также играет важную роль в регуляции настроения [Gavioli et al., 2019], аддиктивного [Ciccocioppo et al., 2019] и пищевого [Micioni Di Bonaventura et al., 2019] поведения, а также реакции на стресс [Zaveri, 2016]. Кроме того, показана роль ноцицептина в регуляции когнитивных функций [Khan et al., 2018] и в патогенезе болезни Паркинсона [Collins et al., 2016; Toll et al., 2016].

Как и другие опиоидные рецепторы, NOP рецептор сопряжен с ингибиторными Gi/o-белками. Его активация сопряжена с открытием калиевых каналов, закрытием кальциевых каналов и ингибированием аденилатциклазы [Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Murphy et al., 2004b; Witkin et al., 2014; Khan et al., 2018].

Как сказано выше (Рисунок 1.4), KOP и NOP рецепторы имеют тесное эволюционное родство [Dreborg et al. 2008; Larhammar et al., 2009; Stevens et al., 2007; Stevens, 2015]. Филогенетическая близость, вероятно, определяет их морфофункциональную схожесть, наблюдаемую в коре илимбических областях мозга. Любопытно, однако, что, в отличие от динорфина, ноцицептин не вызывает ни условно-рефлекторного предпочтения места, ни его условно-рефлекторного избегания [Devine et al., 1996].

В исследовании Norton et al. (2002) вызывали одностороннее поражение дофаминергических нейронов VTA и SNc 6-гидроксидофамином (6-OHDA), чтобы определить какие популяции нейронов экспрессируют мРНК про ноцицептина, а какие NOP рецептора. Тирозингидроксилаза (TH) — ключевой фермент синтеза дофамина и является маркером катехоламинергических нейронов. Как и в случае динорфин/каппа-опиоидной системы, было показано, что 75% нейронов, экспрессирующих мРНК NOP рецептора, экспрессирует также мРНК TH и около половины популяции нейронов, экспрессирующих TH, ко-экспрессировали мРНК NOP рецептора. 50 — 60% нейронов экспрессирующих мРНК pNoc, ко-экспрессировали ключевой фермент синтеза ГАМК — глутаматдекарбоксилазу — маркер ГАМКергических нейронов. После введения 6-OHDA в VTA и SNc количество нейронов экспрессирующих мРНК NOP рецептора снизилось на 80 и 85% по сравнению с интактной стороной [Norton et al., 2002]. Эти данные свидетельствуют о том, что в среднем мозге мРНК NOP рецептора экспрессируется преимущественно в дофаминергических нейронах, а мРНК проноцицептина — преимущественно в ГАМКергических.

Такая ко-локализация ноцицептина и NOP рецепторов свидетельствует о том, что ноцицептин может наравне с динорфином подавлять биоэлектрическую активность дофаминергических нейронов VTA и SNc [Norton et al., 2002; Gavioli et al., 2013].

Данные о локализации NOP рецепторов на телах дофаминергических нейронов среднего мозга были позже подтверждены Di Benedetto et. al. (2009), которые вдобавок продемонстрировали, что при уничтожении популяции дофаминергических нейронов среднего мозга нейротоксином 6-OHDA, совместно с потерей экспрессии TH (показатель гибели катехоламинергических нейронов) в VTA, наблюдалось снижение уровня мРНК, кодирующей проноцицептин и NOP рецептор в дорсальном стриатуме [Di Benedetto et. al., 2009]. Кроме того, Olianas et al. (2008) показали ингибиторное влияние ноцицептина на активность TH в пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов стриатума [Olianas et al., 2008].

Аналогично динорфину, ноцицептин и его агонисты снижают положительные подкрепляющие свойства алкоголя и наркотиков (морфин, кокаин, амфетамины) предотвращая выработку рефлекса предпочтения места [Дубынин и др., 2017; Sakoori et Murphy, 2004; Murphy, 2004a; Rutten et al., 2010], локомоторную сенситизацию [Vazquez-DeRose et al., 2013] и условно-рефлекторное восстановление угашенного поведения, направленного на поиск наркотика [de Guglielmo et al., 2017]. Любопытно, что нокаут гена NOP рецептора ослаблял выработку алкогольного предпочтения в двух-бутылочном тесте. При этом, в условиях хронической алкоголизации/наркотизации, животные с нокаутом гена NOP рецептора не обнаруживали нарастания условно-рефлекторного предпочтения места, в отличие от крыс дикого типа. Кроме того, нокаут гена NOP рецептора, как и селективный NOP-антагонист, снижал сенситизацию к поведенческим эффектам метамфетамина [Sakoori et Murphy, 2008].

Интрацеребровентрикулярное введение ноцицептина увеличивало количество подходов к поилке с сахарозой у мышей, предполагая, что активация данной системы увеличивает пищевую мотивацию [Mendez et al., 2016]. В то же время, крысы с нокаутом гена NOP рецептора не отличаются от крыс дикого типа по предпочтению сахарина, хотя обнаруживают значительно сниженную мотивацию к самовведению кокаина, героина и алкоголя [Kallupi et al., 2017]. Ноцицептин снижает глутаматергическую трансмиссию и блокирует вызванные этанолом эффекты в центральной миндалине наивных и этанол-зависимых крыс [Kallupi et al., 2014].

Таким образом, влияние ноцицептина на функциональное состояние эндогенной системы «награды» является супрессивным и схоже с таковым динорфина [Ciccocioppo et al., 2019].

Активация ноцицептин/NOP-рецепторной системы снижает выраженность положительных подкрепляющих эффектов алкоголя по ряду поведенческих характеристик, включая уровень его добровольного потребления [Ciccocioppo et al., 1999], условно-рефлекторное предпочтение места [Kuzmin et al., 2003] и возобновление угашенного поведения, направленного на поиск алкоголя, в ответ

на условно-рефлекторный стимул [Ciccocioppo et al., 2004] или стресс [Martin-Fardon et al., 2000].

Эффекты ноцицептина подробно изучались на особой алкоголь-предпочитающей линии крыс msP (Marchigian Sardinian Alcohol-Preferring rats). Эта линия обнаруживает повышенную уязвимость стрессу, тревожно-депрессивный фенотип и высокую чувствительность к эффектам ноцицептина [Economidou et al., 2006]. Эти данные могут быть объяснены тем, что ноцицептин оказывает выраженное антистрессорное действие [Witkin et al., 2014].

Важно отметить, что крысы msP имеют повышенный уровень мРНК, кодирующей проноцицептини NOP рецептор, особенно в CeA, BNST и VTA [Economidou et al., 2008].

Интракраниальное введение ноцицептина полностью предотвращало развитие соматических симптомов острого синдрома отмены алкоголя и значительно снижало тревогу, наблюдающуюся через неделю после его отмены [Economidou et al., 2011]. Введение этанола само по себе, либо его отмена у крыс Sprague-Dawley значительно повышает уровень мРНК проноцицептина в миндалине [D’Addario et al., 2013a].

Бупренорфин — опиоидный анальгетик — агонист MOP и антагонист KOP рецепторов. Исследования на аутбредных крысах и макаках Резус показали, что бупренорфин в высоких (но не в низких) дозах снижает потребление этанола животными. Низкие и средние дозы бупренорфина, напротив, увеличивают потребление алкоголя. MOP-антагонист налтрексон аннулирует способность низких доз бупренорфина стимулировать потребление алкоголя, в то время как NOP-антагонист UFP-101, селективно предотвращает способность высоких доз бупренорфина снижать потребление алкоголя, что свидетельствует о том, что в высоких дозах он также проявляет свойства агониста NOP рецепторов [Witkin et al., 2014; Ciccocioppo et al., 2007].

В небольшом открытом исследовании было показано, что лица, находящиеся на заместительной терапии высокими дозами бупренорфина с коморбидностью опиоидной и алкогольной зависимостей, значительно снижают

потребление алкоголя в отличие от пациентов, получающих низкие и средние дозы бупренорфина [Nava et al., 2008].

Ноцицептин действует на высвобождения нейротрансмиттеров (в частности, дофамина, ГАМК и глутамата) и биоэлектрическую активность мезолимбических дофаминергических нейронов аналогично динорфину. Было показано, что экзогенное введение ноцицептина снижает как базальное, так и вызванное освобождение дофамина в NAc, а также аннулирует положительные подкрепляющие эффекты наркотиков и алкоголя [Lutfy et Zaveri, 2016; Zaveri, 2016; Zaveri et al., 2018]. Также было показано, что низкомолекулярный NOP-агонист Ro 64-6198 снижает самовведение алкоголя крысами [Kuzmin et al., 2007]. Другие селективные NOP-агонисты MT-7716 и SR-8993 снижают потребление алкоголя у предпочитающих алкоголь крыс линии msP, и ослабляют симптомы отмены алкоголя у зависимых от алкоголя крыс Wistar [Ciccocioppo et al., 2014; Aziz et al., 2016]. В то же время, у животных, нокаут гена, кодирующего ноцицептин, или введение NOP-антагонистов также снижают самовведение алкоголя [Tollefson et al., 2017]. Эти фундаментальные научные открытия стимулировали интерес к первому плацебо-контролируемому клиническому исследованию, в котором введение селективного NOP-антагониста LY2940094 страдающим аклоголизмом не влияло на среднесуточное потребление алкоголя, но снижало количество эпизодов тяжелого пьянства и увеличило число дней трезвости в месяце [Post et al., 2016].

До недавнего времени NOP-специфичные радиотрейсеры для ПЭТ у человека отсутствовали. В период с 2011 по 2016 г. исследовательские лаборатории Merck и Национального института психического здоровья США независимо друг от друга разработали и валидировали два радиотрасера для NOP рецепторов [18F]MK-0911 и [11C]NOP-1A соответственно. [11C]NOP-1A представляет собой радиотрейсер с необходимой липофильностью, высокой аффинностью и селективность, а также благоприятной фармакокинетикой и высокой степенью воспроизводимости результатов при повторных измерениях [Lohith et al., 2012]. В единственном на сегодняшний день клиническом ПЭТ

исследовании Narendran et al. (2018), проведенном с использованием радиотрейсера [11C]NOP-1A, различий в доступности NOP рецепторов между алкоголиками через 28 дней после детоксикации (n = 15) и здоровыми добровольцами (n = 15) обнаружено не было [Narendran et al., 2018]. Тем не менее, ранее проведенное исследование (*post mortem*) экспрессии NOP рецепторов обнаружило 40% снижение уровня соответствующей мРНК в головном мозге больных алкоголизмом по сравнению с контролем. Однако уровень белкового продукта не определялся, поэтому судить о том, на сколько снижение уровня мРНК отражало количество NOP рецепторов судить трудно [Kuzmin et al., 2009; Best et Boileau, 2018]. Все же, не следует забывать о том, что первое ПЭТ исследование доступности KOP рецепторов, в отличие от второго, тоже не выявило различий между больным алкоголизмом и здоровыми добровольцами [Vijay et al., 2015; 2018]. Возможно, дальнейшие исследования смогут выявить подгруппы больных, характеризующихся нарушениями в экспрессии NOP рецепторов или ноцицептина [Best et Boileau, 2018].

Очевидно, ноцицептин имеет не только структурное сходство с динорфином, но и в функциональном плане оказывает схожее влияние на гедонический ответ и гедонический фон в покое [Jones et al., 2016; Mendez et al., 2016; Lalanne et al., 2014; Gavioli et al., 2013; Sakoori et Murphy 2008; Marquez et al., 2008 ab; Murphy, 2004a]. Учитывая эволюционно-генетическое родство ноцицептин/NOP-рецепторной и динорфин/KOP-рецепторной систем, их общность во влиянии на дофаминергический тонус и гедонический гомеостаз, а также фармакодинамическую гомологичность внутри пар KOP/NOP и MOP/DOP рецепторов in vitro, продемонстрированную Zaveri et al. (2015), нам представляется крайне актуальным сопоставить уровень экспрессии генов опиоидных рецепторов и их лигандов в мозге крыс с различным уровнем алкогольного предпочтения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 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], требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 с приложением от 15.06.2006), правил Совета Европейского сообщества (Директива 86/609/EEC в пересмотре от 14.11.2005 г. и Директива 2010/63/EU от 22.09.2010 г.), а также Принципов надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009). На протяжении всех этапов исследования животных содержали в условиях естественной освещенности, при температуре 22±2° С. В качестве пищевого рациона использовали гранулированный корм (ГОСТ Р 50258-92). Соблюдены все положения, в том числе, использование минимального количества животных, которое требуется для получения научно достоверных результатов. Протокол эксперимента соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных и был одобрен этическими комитетами ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН и ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ.

2.2 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 (435 х 275 х 155 мм) в условия «свободного выбора» между двумя поилками, содержащими 10% водный раствор этанола и воду (рисунок 2.1).

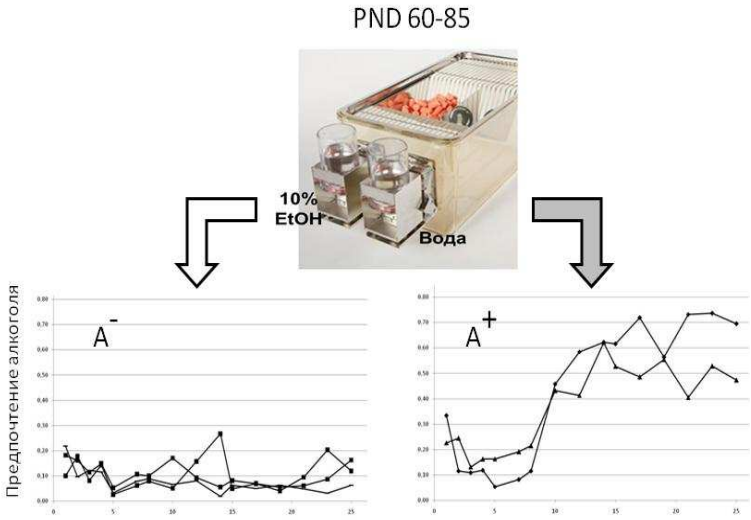


Рисунок 2.1 — Схема отбора животных с постоянно низким и растущим уровнем потребления алкоголя в модели «свободный выбор» между 10% раствором этанола и водой

Потребление алкоголя и воды измеряли ежедневно путем взвешивания поилок и рассчитывали уровень потребления этанола 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).

2.3 Области мозга, выбранные для исследования

Для выделения структур мозга животных декапитировали, структуры мезолимбической системы — вентральные отделы среднего мозга, стриатума и миндалину (рисунок 2.2) выделяли на льду, замораживали в жидком азоте и в дальнейшем хранили при –70° С.

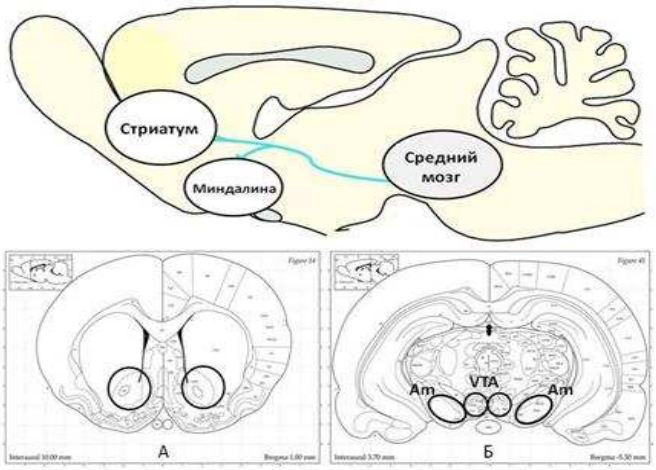


Рисунок 2.2 — Структуры мезолимбической системы — вентральный стриатум (А), средний мозг (вентральная покрышка — VTA) и миндалина (Am) (Б) [Paxinos et Watson, 1986]

2.4 Биохимические методы исследования

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°С 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 4^0С 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°С до следующих манипуляций. *Концентрацию РНК* определяли на спектрофотометре Eppendorf Bio Photometer (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. Образец РНК считали чистым, если отношение значений 260 нм/280 нм было в пределах 2.0 — 2.8, а 260 нм/230 нм — в пределах 1.8 — 2.2. В случае меньших значений показателей 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм образец подвергали дополнительной очистке (набор для очистки и концентрирования РНК RNA Clean&Concentrator, ZymoResearch) от примесей белка, фенола или иных компонентов, остающихся после процедуры выделения РНК. Качество выделения РНК также определяли посредствам электрофореза в 1%-ном агарозном геле (“Promega”, США) на 1× ТАЕ буфере (2 мМ ЭДТА, 20 мМ CH_3COOH, 40 мМ Tris, pH 8.3), окрашенном бромистым этидием (1 мкг/мл; “AppliChem”, Германия), по наличию в ультрафиолете двух полос, соответствующих 28 и 18S РНК. Для удаления

возможных примесей геномной ДНК в образцах после выделения РНК использовали экзонуклеазу RQ1 (“Promega”, США) по следующему протоколу: к 16 мкл раствора РНК добавляли 2 мкл 10× буфера (40 мМ буфер Tris-HCl, pH 8.0, 10 мМ $MgSO_4$, 1 мМ $CaCl_2$) и 2 мкл фермента и термостатировали 30 мин при 37°С. Затем в реакционную смесь добавляли 2 мкл раствора 2 мМ этиленгликоль-тетрауксусной кислоты (pH 8.0) и прогревали при 65°С.

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 Randomhexamer — праймеры и инкубировали 5 мин. при +65^{0}С (Thermo Shaker PST-60HL, BioSan, Латвия), после чего сразу помещали на лед. Обратную транскрипцию проводили в объеме 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 $MgCl_2$, 2 мМ дитиотреитол), 1 мкл ингибитора РНКазы (Ribo Lock RNase Inhibitor), 2 мкл 10 mM dNTP и 1 мкл ревертазы (Revert Aid M-Mu LV Reverse transcriptase, 200 ед/мкл), перемешивали и инкубировали 5 мин при 25^{0}С и затем 60 мин при 42^{0}С. Фермент инактивировали нагреванием до 70°С в течение 5 мин. Концентрацию кДНК определяли на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer (Германия) при 260 нм в кювете с длиной оптического пути 1 мм. кДНК разводили деионизированной водой и хранили при –70°С.

Уровень экспрессии мРНК определяли, используя полимеразную цепную реакцию после обратной транскрипции в режиме реального времени (RT-PCR) на амплификаторе Multicolor Real-Time PCR Detection System iQTW5 (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 95°С; денатурация — 15 сек при 95°С; отжиг праймеров — 15 сек при 60°С; элонгация — 30 сек при 72°С) с последующим анализом кривых плавления полученных продуктов амплификации. Для проведения RT-PCR были

использованы специфические олигонуклеотидные праймеры (ДНК-синтез, Россия) (таблица 2.1).

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».

Таблица 2.1 — Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения ПЦР

Ген, кодирующий:	**Праймеры**	
	Прямой	**Обратный**
MOP рецептор	5’- gtagtgggcctcttcggaaac-3’	5’- gttggtggcagtcttcattttg- 3’
DOP рецептор	5’- tgggtcttggcttcaggtgt - 3’	5’- cgtgcataccactgctccat -3’
KOP рецептор	5’- tcagggaagatgtggatgtcaatt-3’	5’- tgaagaggtcccaccaggaa- 3’
NOP рецептор	5’- gagaccgtaccccaccacctg-3’	5’- ccccgatgcaccagccaag - 3’
Продинорфин	5’- cagcggactgcctgtcctt-3’	5’- tcagggtgagaaaagaccaaaag - 3’
Проноцицептин	5’- aagcggttcagtgagtttatg-3’	5’- cacctggatgctcatggg - 3’
D1 рецептор	5’-cttcgatgtgtttgtgtggttt-3’	5’-tcttccttcttcaggtcctcag-3’
Кортикотропин-релизинг фактор (CRF)	5’-ctgtcgccctgtctgccttgc-3’	5’-gttgctggggctgctccggtt-3’
CRF1 рецептор	5’-ctctgggatgtcggagcgatcca-3’	5’-cagtgacccaggtagttgat-3’
β-актин (референс)	5’- cactgccgcatcctcttcct-3’	5’- aaccgctcattgccgatagtg - 3’

Контроль целостности выделенной РНК и специфичности полученного в результате ПЦР продукта осуществляли при помощи электрофореза в агарозном геле. Для визуализации результатов использовали трансиллюминатор (UVC Inc., USA) и систему гель-документирования (Gel Imager-2, Helicon, Россия). При проведении горизонтального агарозного гель-электрофореза использовали электрофоретическую камеру «Submarine Gel Electrophoresis UnitHE 99» (Hoefer

Scientific instruments, USA) и источник питания «PS 500 XTDC Power Supple» (Hoefer Scientific instruments, USA). Целостность и специфичность продуктов амплификации подтверждали, проводя электрофорез в 2,0%-ном горизонтальном агарозном геле на 1× TAE буфере, окрашенном бромидом этидия по наличию полосы, соответствующей фрагменту ожидаемой длины (рисунок 2.3).

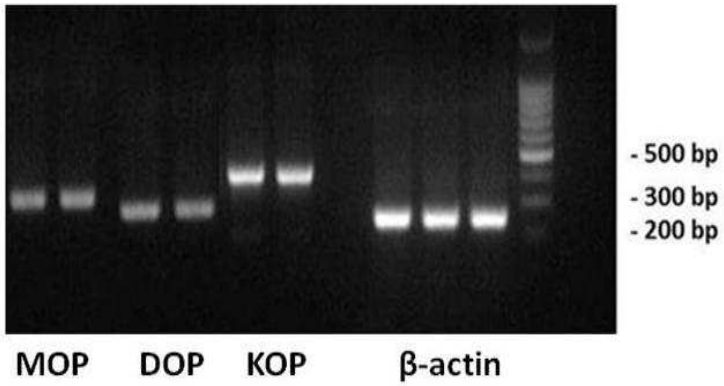


Рисунок 2.3 — Электрофорез продуктов ПЦР в 2,0%-ном агарозном геле

2.5 Дизайн исследования

Серия 1. *Определение относительного уровня мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в различных областях мезолимбической системы мозга 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 на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C до проведения ПЦР-анализа (рисунок 2.4).

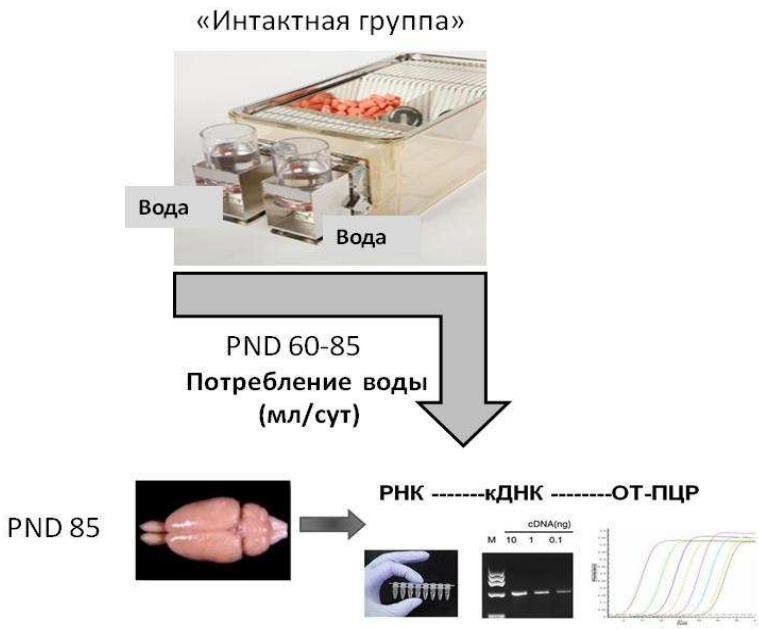


Рисунок 2.4 — Схема эксперимента: Определение относительного уровня мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в различных областях мезолимбической системы интактных животных

Серия 2. *Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.*

Экспериментальная модель «свободный выбор» была использована для формирования групп животных с одинаковым изначальным уровнем предпочтения алкоголя, но с различной динамикой его потребления во времени по ранее описанной схеме (раздел 2.2, рисунок 2.1). Через 25 дней тестирования в модели «свободный выбор» животных декапитировали, структуры мезолимбической системы выделяли на льду, замораживали в жидком азоте и хранили при –70° С до проведения ПЦР-анализа.

Серия 3. *Определение относительного уровня экспрессии мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в мезолимбической системе головного мозга животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.*

На этом этапе был проведен анализ уровня экспрессии изучаемых генов в среднем мозге, вентральном стриатуме и миндалине мозга животных с постоянно низким и растущим уровнем потребления алкоголя (рисунок 2.5).

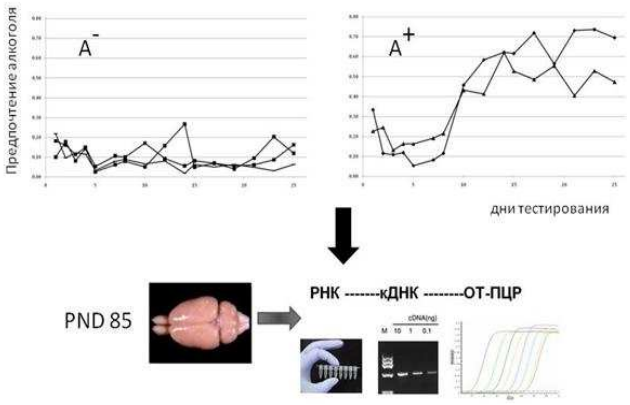


Рисунок 2.5 — Схема эксперимента: определение относительного уровня мРНК опиоидных рецепторов и их эндогенных лигандов в областях мезолимбической системы мозга животных с постоянно низким (A^-, n=14) и растущим (A^+, n=12) потреблением/предпочтением алкоголя

Серия 4. *Определение относительного уровня экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора в стриатуме, кортикотропин-релизинг фактора (CRF) и его рецептора (CRFR1) в миндалине животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя.*

Целесообразность последней серии экспериментов вытекала из полученных на предыдущем этапе исследования данных. Было высказано предположение о взаимосвязи экспрессии генов, кодирующих pDyn и дофаминовый рецептор первого подтипа (DRD1) в стриатуме, а также KOP рецептор и CRF– в миндалине.

2.6 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

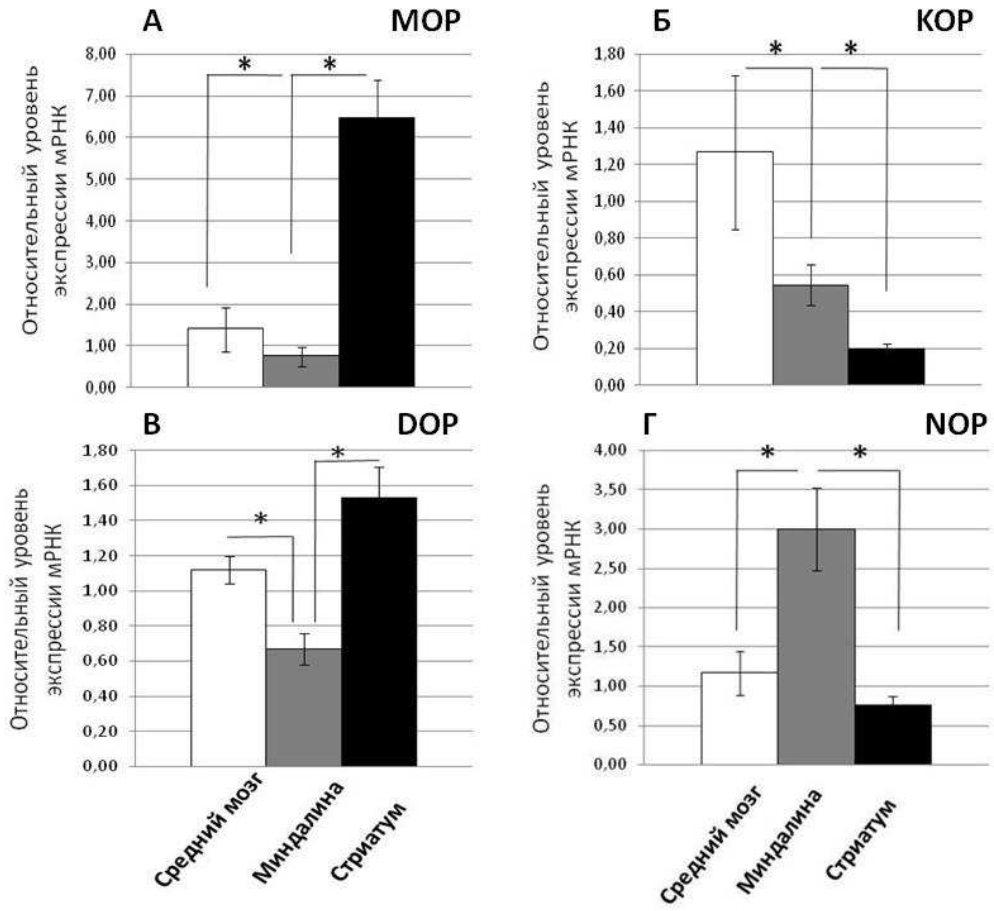
среднего ± ошибка среднего. Для проверки достоверности различий в потреблении этанола был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) для повторных измерений с последующим апостериорным (post-hoc) анализом. Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали t-критерий Стьюдента. Для оценки связи между данными об уровне мРНК и потреблением алкоголя, рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы интактных животных

Данная серия экспериментов была проведена на интактных крысах для определения относительного уровня экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в мезолимбических структурах мозга: вентральной части среднего мозга — области локализации тел дофаминергических нейронов, а также вентральной области стриатума и миндалине — основных структурах-мишенях дофаминергических нейронов. Целью исследования было количественное сопоставление уровня мРНК в этих областях для получения целостной картины транскрипционной активности генов опиоидной системы, которая в настоящее время в литературе практически не представлена. Важной задачей была оценка соответствия распределения мРНК, полученного в нашем исследовании и плотности рецепторов согласно имеющимся литературным данным [Bazov et al., 2018; Hirth et al., 2016; Sarkisyan et al., 2015].

На рисунке 3.1(А) видно, что наиболее высокий уровень экспрессии мРНК MOP рецепторов детектировался в стриатуме. Показатель экспрессии мРНК MOP рецепторов 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). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК MOP рецептора в среднем мозге и миндалине не наблюдалось.



По оси ординат — относительные показатели экспрессии мРНК. *p<0.05 (t-критерий Стьюдента). Количество животных n=10

Рисунок 3.1 — Относительный уровень экспрессии мРНК MOP (А), KOP (Б), DOP (В) и NOP (Г) рецепторов в среднем мозге, миндалине и стриатуме интактных животных

Полученные результаты согласуются с данными литературы, так как именно в стриатуме обнаружена наиболее высокая плотность MOP рецепторов [Trovero et al., 1990]. Было показано, что у крыс только 28% MOP рецепторов в стриатуме локализовано на пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов (т.е. кодируются мРНК MOP рецептора, 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 мозга соответствует ранее полученной картине локализации самих рецепторов. Примерно такая же картина наблюдается для DOP рецепторов

(рисунок 3.1(В)). Установлено, что 30% DOP рецепторов локализовано на пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов, и 70% — на телах нейронов стриатума [Trovero et al., 1990]. В наших исследованиях экспрессия мРНК DOP рецептора также была максимальной в стриатуме, однако разница в уровне мРНК DOP рецептора между исследуемыми областями мозга была менее выражена, чем для MOP (рисунок 3.1 А и Б). Использование иммуногистохимических методов позволило создать достаточно подробную карту экспрессии мРНК и самих DOP рецепторов в мозге, причем только единичные работы не выявили соответствия уровня мРНК и белка DOP рецептора [Erbs et al. 2015; Pradhan et Clarke 2005; Scherrer et al. 2006]. Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК DOP рецептора показан для коры мозга, что согласуется с представлениями о роли этих рецепторов в регуляции когнитивных функций [Laurent et al. 2015; Le Merrer et al., 2013]. В стриатуме показана коэкспрессия мРНК DOP рецептора и ацетилхолинтрансферазы, что свидетельствует о локализации DOP рецептора в этой области мозга на холинэргических вставочных нейронах [Bertran-Gonzalez et al., 2013]. Высокий уровень транскрипции DOP рецептора в стриатуме обеспечивает их участие (наряду с MOP рецепторами) в регуляции двигательной активности, обучения моторным навыкам, импульсивности, механизмов мотивации и подкрепления [Pellissier et al., 2018].

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 покрышке среднего мозга, что также подтверждает их участие в регуляции локомоторных функций (SN) и процессов подкрепления (VTA).

Для KOP рецептора получена обратная картина распределения мРНК по структурам в сравнении с MOP и DOP рецепторами. Максимальный уровень экспрессии мРНК KOP рецептора детектировался в среднем мозге (Рисунок 3.1 Б). Показатель экспрессии мРНК KOP рецептора 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). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК KOP в миндалине и стриатуме не обнаружено (Рисунок 3.1 Б).

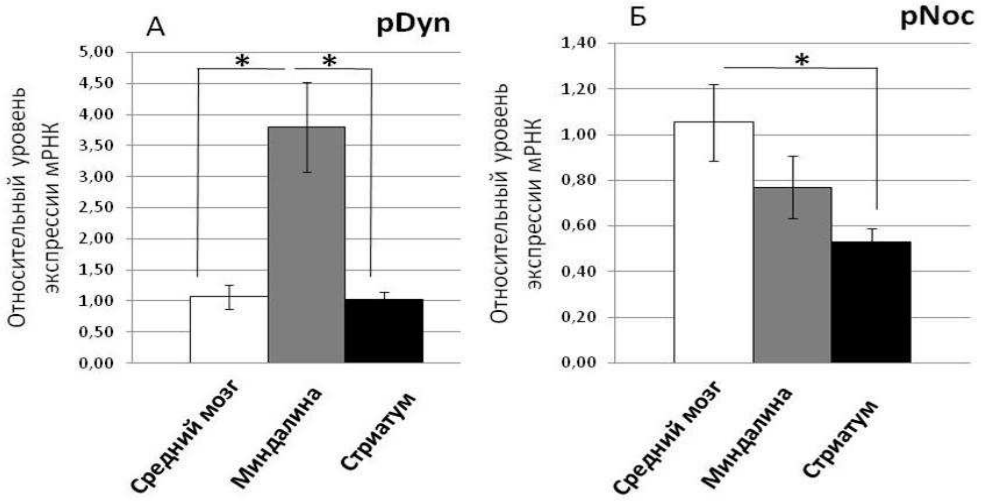
MOP/DOP и KOP/NOP рецепторы представляют две функционально антагонистичные друг другу опиоидные подсистемы, обеспечивающие положительную и отрицательную регуляцию эндогенной системы «награды» (reward system) соответственно [Koob et al., 2013]. Полученные нами данные о наиболее высоком уровне экспрессии мРНК KOP рецептора в среднем мозге согласуются с данными литературы [Thompson et al., 2000; Kivell, 2014]. Предполагают, что KOP-зависимый механизм регуляции мезолимбической дофаминергическойсистемы достаточно сложно организован [Thompson et al., 2000]. Показано, что KOP рецепторы могут быть непосредственно ассоциированы с дофамин-транспортным белком (DAT) на пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов среднего мозга, причем активация KOP рецепторов потенцирует активность DAT и, как следствие, усиливает обратный захват дофамина [Thompson et al., 2000; Kivell, 2014]. С другой стороны, введение селективного агониста KOP U69593 снижает количество пресинаптических D2 рецепторов, что дает основания предполагать, что в стриатуме KOP рецептор является частью макромолекулярного гетеромерного комплекса, состоящего из DAT, KOP и D2 рецепторов [Acri et al., 2001].

Наименее изученным из опиоидных рецепторов является NOP рецептор. На рисунке 3.1 Г видно, что у интактных животных наиболее высокий уровень экспрессии его мРНК определялся 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). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК NOP рецептора в среднем мозге и стриатуме не обнаружено. Полученные результаты согласуются с данными литературы, показавшими наибольшую плотность NOP рецепторов в миндалине мозга животных [Andero et al., 2013]. В настоящее время нет ясного понимания роли NOP рецепторов механизмах действия алкоголя. Большая часть работ,

исследовавших изменения экспрессии гена NOP рецептора, посвящена экспериментальным моделям посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [Andero et al., 2013, 2015]. Использование микрочипов (microarray) для анализа экспрессии большого числа генов позволило идентифицировать высокоспецифичное для миндалины повышение экспрессии мРНК NOP рецептора у животных со сформированным экспериментальным ПТСР [Andero et al., 2013, 2015].

На рисунке 3.2 А видно, что наиболее высокий уровень экспрессии мРНК продинорфина детектировался в миндалине. Показатель экспрессии мРНК продинорфина в среднем мозге был в 3,7 раза, а в стриатуме в 3,75 раза ниже по сравнению с миндалиной ($p < 0,05$; t-критерий Стьюдента). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК продинорфина в среднем мозге и стриатуме не обнаружено.

Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК проноцицептина детектировался в среднем мозге (рисунок 3.2 Б). Однако различия в транскрипционной активности гена между исследуемыми областями мозга были менее выражены по сравнению с продинорфином. Показатель экспрессии мРНК проноцицептина в миндалине был в среднем в 1,6 раз ($p > 0,05$), а в стриатуме в 2,0 раза ниже по сравнению с миндалиной ($p < 0,05$; t-критерий Стьюдента). Достоверных различий в уровне экспрессии мРНК проноцицептина в среднем мозге и миндалине, а также в миндалине по сравнению со стриатумом не обнаружено.



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

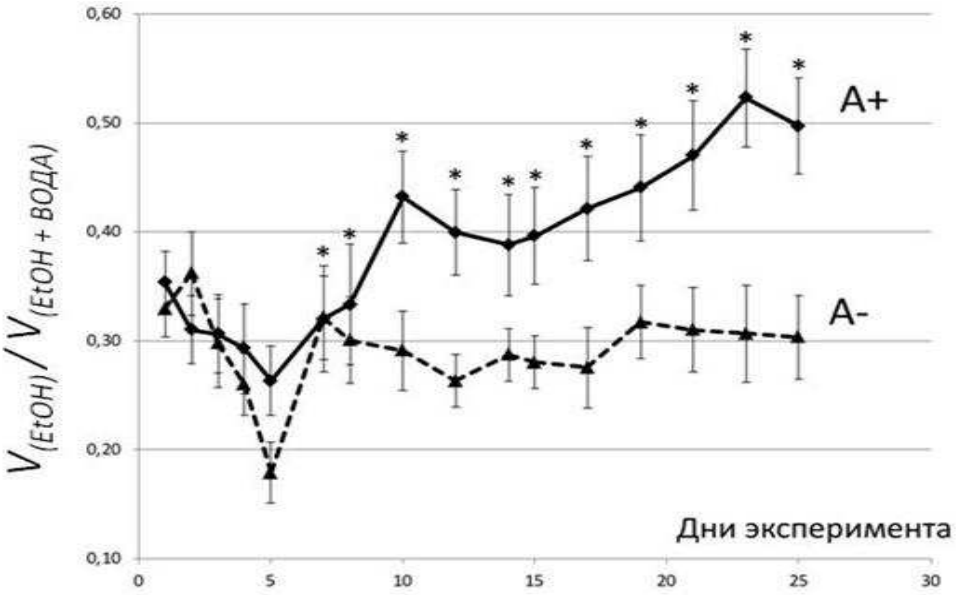
Рисунок 3.2 — Относительный уровень экспрессиим РНК pDyn(А) и pNoc (Б) в среднем мозге, миндалине и стриатуме интактных животных

3.2 Хроническая алкоголизация и отбор животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя

Задачей этого этапа исследования было формирование групп животных с одинаковым изначальным уровнем предпочтения алкоголя, но с различной динамикой его потребления во времени. Рост предпочтения алкоголя в условиях «свободного выбора» рассматривается в качестве показателя роста алкогольной мотивации на ранних этапах формирования экспериментальной алкогольной зависимости [Green et Grahame, 2008; Gilpin et Koob, 2008].

По результатам тестирования 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 $А^{+}$, оставаясь на стабильном уровне в группе $А^{–}$ (рисунок 3.3). Исходные показатели предпочтения алкоголя между группами достоверно не различались. Показатели среднесуточного исходного (Дни 1 — 7) и конечного

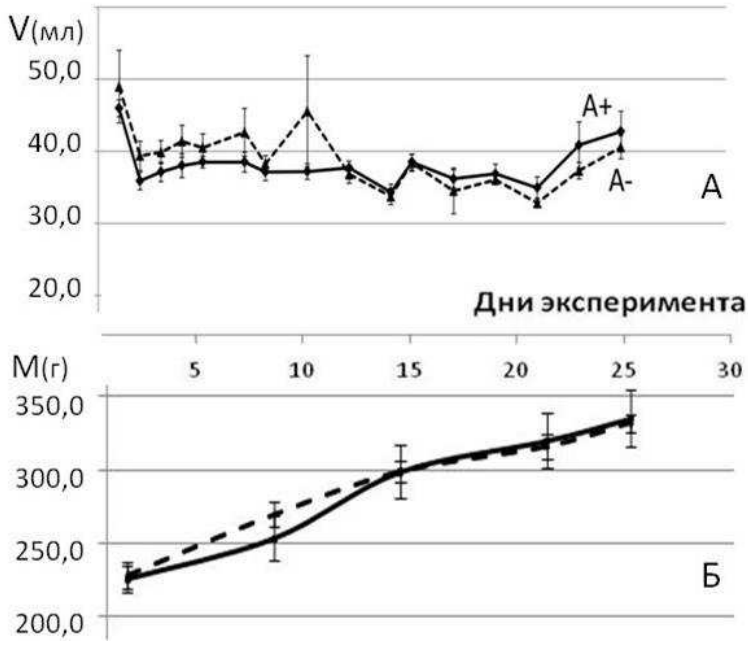
(Дни 18–25) уровня ***потребления*** алкоголя составляли: в группе A^+: 3,2±0,2 и 7,2±0,9 г/кг (*p<0,05;ANOVA для повторных измерений), а в группе A^-: 3,0±0,6 и 3,6±0,4 г/кг соответственно. Показатели исходного и конечного ***предпочтения*** алкоголя составляли: в группе A^+: 0,35±0,026 и 0,50±0,041(*p<0,05), а в группе A^-: 0,32±0,046 и 0,3±0,03 соответственно. В группе A^- показатели потребления и предпочтения алкоголя в начале и конце тестирования достоверно не различались.



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 — поотношению к соответствующему показателю в группе A^- (two-wayANOVA)

Рисунок 3.3 — Динамика предпочтения алкоголя в экспериментальных группах

Описанные различия в динамике предпочтения алкоголя в группах не были связаны с изменениями общего объема потребляемой жидкости или массы тела животных в процессе тестирования (рисунок 3.4 А, Б).



А: по оси ординат — средний по группе показатель потребления жидкости ($V_{EtOH + ВОДА}$), **В**: по оси ординат — масса животных в граммах (обозначения как на Рисунок 3.3)

Рисунок 3.4 — Динамика общего объема потребления жидкости (А) и массы тела животных (Б) в экспериментальных группах

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

3.3 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в структурах мезолимбической системы крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения

В работе исследовали экспрессию генов, кодирующих MOP, DOP, KOP и NOP рецепторы, а также продинорфин (pDyn) и проноцицептин (pNoc). Исследовались вентральные отделы среднего мозга (вентральная область покрышки; VTA), то есть, область локализации тел дофамин-синтезирующих

нейронов, вентральный стриатум — одна из основных структур, куда проецируются дофаминергические нейроны VTA — зона, ответственная за формирование чувства удовольствия и эйфории, и миндалина мозга (амигдала) — вторая основная мишень дофаминергических нейронов VTA, играющая ключевую роль в формировании тревоги и аверсивного опыта.

Эндогенные лиганды MOP и DOP рецепторов — эндорфины и энкефалины, кодируются единым геном проопиомеланокортина, который, кроме того, кодирует еще и ряд неопиоидных пептидов, таких как, адренокортикотропный гормон, а также альфа-, бета- и гамма-меланоцитстимулирующие гормоны, являющиеся лигандами других рецепторов (Рисунок 1.3). Таким образом, активность экспрессии гена проопиомеланокортина не является репрезентативной в плане уровня эндогенных лигандов MOP и DOP рецепторов. В связи с этим, исследование экспрессии гена проопиомеланокортина в настоящей работе не проводилось.

3.3.1 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в вентральной области среднего мозга.

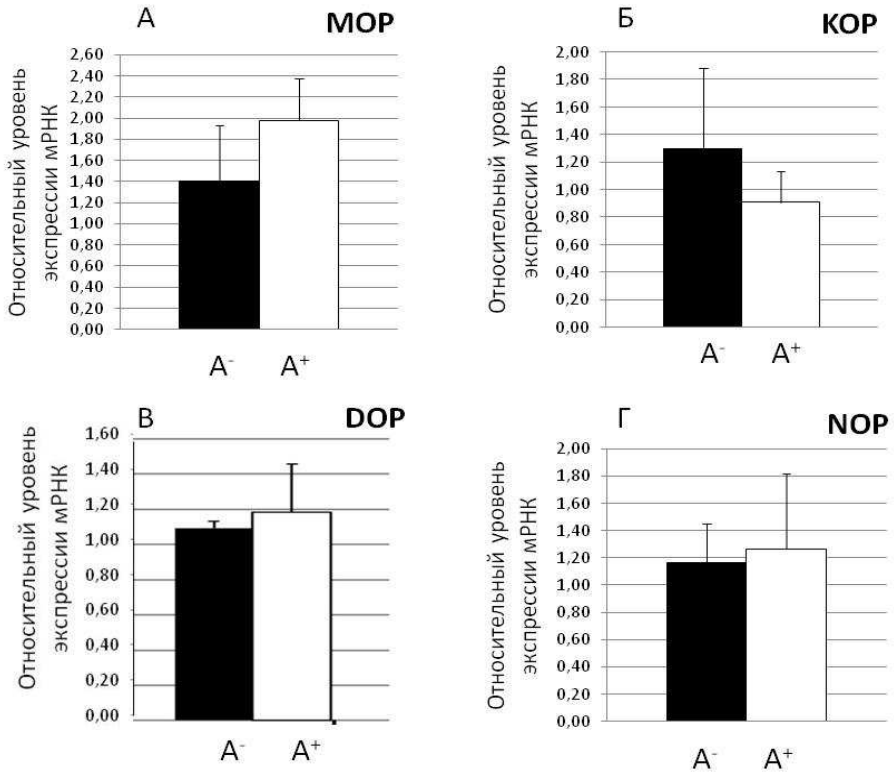
В вентральной области среднего мозга уровень экспрессии генов MOP, DOP, KOP и NOP рецепторов между экспериментальными группами достоверно не различался. Тем не менее, была установлена тенденция к повышенной экспрессии мРНК MOP рецептора и сниженной экспрессии мРНК KOP рецептора в группе животных A^+ по сравнению с группой A^- (Рисунок 3.5).

Показано, что одним из механизмов активации этанолом дофаминергической нейротрансмиссии может быть освобождение β-эндорфина, активирующего MOP рецепторы, локализованные на ГАМКергических нейронах вентральной покрышки среднего мозга и, как следствие, растормаживание дофаминергических нейронов VTA с освобождением дофамина в областях-мишенях [Font et al., 2013; Berrettini et al., 2016].

Функциональным антиподом β-эндорфина в VTA является динорфин (Dyn), проявляющий преимущественную тропность к каппа-опиоидным рецепторам [Ford et al., 2006]. Его психотропные поведенческие эффекты во многом противоположны таковым агонистов MOP и DOP рецепторов: ведение динорфина или агонистов KOP рецепторов оказывает аверсивное, продисфорическое и депрессогенное действие у человека и у животных [Shippenberg et al., 2007]. Активация KOP рецепторов, локализованных на телах и пресинаптических окончаниях дофаминергических нейронов VTA, наблюдается при действии алкоголя и, как полагают, лежит в основе эффекта его «последействия».

Несмотря на то, что MOP и KOP рецепторы, локализованные соответственно на пресинаптических окончаниях ГАМКергических и телах дофаминергических нейронов среднего мозга являются доказанной мишенью действия этанола, мы не обнаружили достоверных различий между группами в экспрессии кодирующих их генов в этой области мезолимбической системы.

Ранее Rosin с соавторами (1999) показали, что при введении крысам в течение двух недель раствора этанола (2 г/кг, 2 раза в сутки, i.p.) наблюдается 85% снижение уровня мРНК KOP рецептора в вентральной покрышке среднего мозга [Rosin et al., 1999]. Противоречие между этими и полученными нами данными может быть связано с использованием различных моделей алкоголизации и более высокой «уязвимостью» KOP-зависимого механизма регуляции в этой области мозга при использовании принудительного, а не добровольного пути алкоголизации.



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

Рисунок 3.5 — Относительный уровень экспрессии мРНК MOP (А), KOP (Б), DOP (В) и NOP (Г) рецепторов в вентральной области среднего мозга животных с различной динамикой алкогольного предпочтения

Как было показано выше, у интактных животных наиболее низкий уровень экспрессии мРНК продинорфина (pDyn) наблюдался в среднем мозге (Рисунок 3.2 А). У животных с растущим предпочтением алкоголя A^+ наблюдалась тенденция к повышению уровня мРНК pDyn в среднем мозге по сравнению с группой A^-, однако достоверных различий между группами обнаружено не было (рисунок 3.6 А).

Как показано выше, у интактных животных наиболее высокий уровень экспрессии мРНК проноцицептина (pNoc) наблюдался в среднем мозге (Рисунок 3.2 Б), что согласуется с литературными данными [Collins et al., 2016]. Роль ноцицептина в этой области мозга активно изучалась в экспериментальных

моделях нейродегенеративных заболеваний, и, прежде всего, болезни Паркинсона [Collins et al., 2016]. Было показано снижение уровня мРНК pNoc в среднем мозге пациентов с болезнью Паркинсона *post mortem* [Collins et al., 2016], однако роль ноцицептина в патогенезе этого заболевания до сих пор остается неясной. Возможно, на определенных стадиях болезни ноцицептин играет защитную роль и противодействует прогрессирующей дегенерации дофаминергических нейронов среднего мозга. С другой стороны, данные литературы показывают, что антагонисты NOP могут снижать нейротоксический эффект 6-гидроксидофамина и MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine) и замедлять процесс гибели нейронов черной субстанции (SN) среднего мозга [Toll et al., 2016], что предполагает, в свою очередь, роль ноцицептина как одного из патогенетических факторов болезни Паркинсона [Toll et al., 2016].

В настоящее время в литературе отсутствуют данные о связи уровня мРНК проноцицептина или NOP рецептора в среднем мозге с предрасположенностью к формированию алкогольной зависимости. Вместе с тем результаты исследований на культуре нейронов среднего мозга ясно демонстрируют регуляторное влияние ноцицептина на дофаминергическую нейротрансмиссию [Murphy et al., 2004b] и позволяют предполагать, что нарушение транскрипционной активности гена, кодирующего проноцицептин, в этой области мозга может быть одним из факторов высокого риска злоупотребления алкоголем.

Однако в настоящем исследовании мы не обнаружили различий между группами в уровне экспрессии мРНК проноцицептина в среднем мозге (рисунок 3.6 Б). По-видимому, уровень транскрипционной активности проноцицептина в среднем мозге не является критическим фактором, определяющим рост потребления алкоголя.

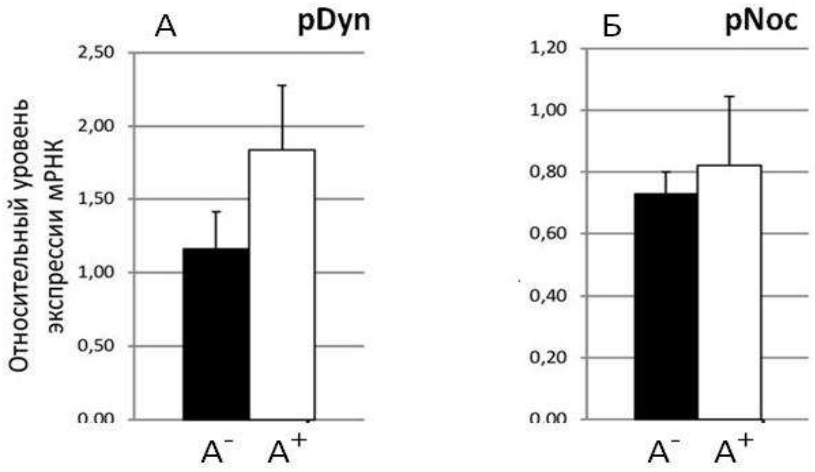


Рисунок 3.6 — Относительный уровень экспрессии мРНК pDyn (А) и pNoc (Б) в среднем мозге животных с различной динамикой алкогольного предпочтения (обозначения как на рисунке 3.5)

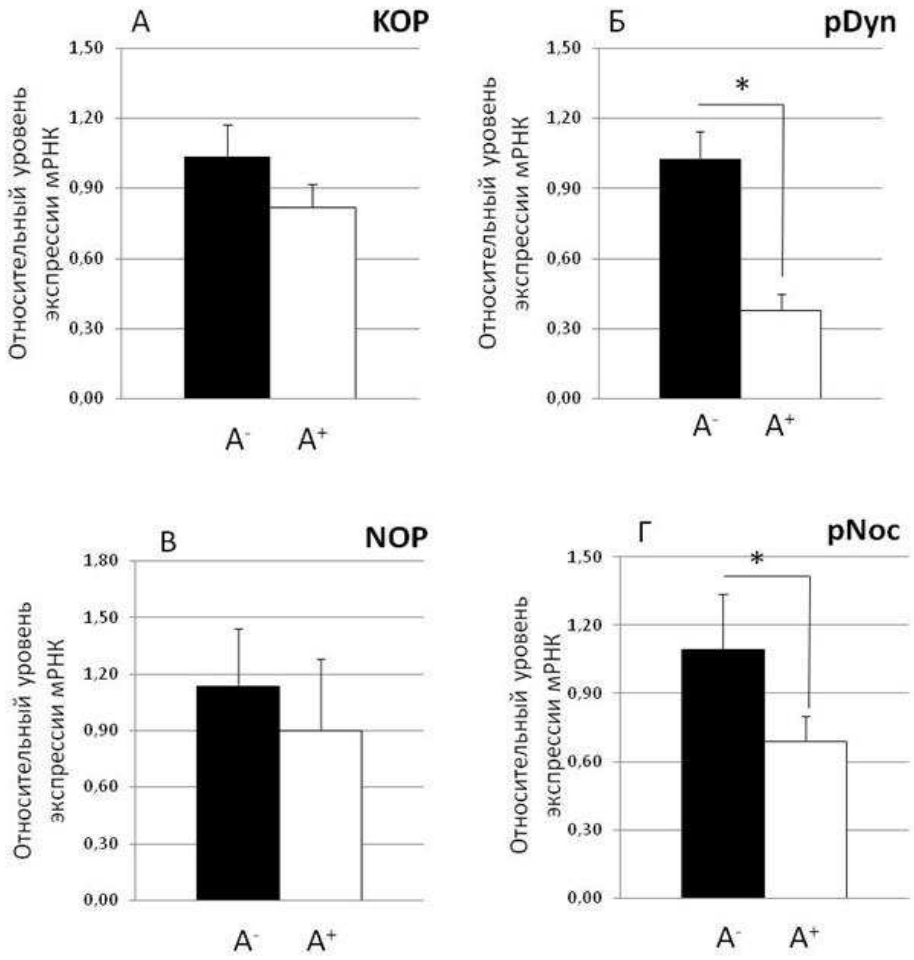
Таким образом, в среднем мозге — области, где берут начало дофаминергические нейроны мезолимбического и мезокортикального путей, достоверных различий между группами в уровне экспрессии мРНК опиоидных рецепторов, продинорфина и проноцицептина не наблюдалось.

3.3.2 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в вентральном стриатуме

В вентральном стриатуме не наблюдалось различий между группами в экспрессии мРНК ни одного из опиоидных рецепторов. Вместе с тем, мы обнаружили достоверно более низкий уровень мРНК продинорфина (в 2,9 раз) и проноцицептина (в 1,4 раза) в стриатуме крыс с ростом алкогольного предпочтения (группа A^+) по сравнению с группой A^- (рисунок 3.7).

Была выявлена значимая отрицательная корреляция (коэф. корр. Пирсона $r = -0{,}693$; $p < 0{,}05$) между показателем потребления раствора этанола и уровнем мРНК продинорфина (pDyn) в вентральном стриатуме.

Полученные результаты согласуются с данными других исследований, использовавших фармакологический подход [Lindholm et al., 2001]. Можно предположить, что недостаток эндогенных лигандов KOP и NOP рецепторов у препдочитающих алкоголь животных может быть скомпенсирован введением синтетических агонистов этих рецепторов с целью снижения потребления. Это предположение согласуется с результатами Lindholm с соавторами (2001) [Lindholm et al., 2001], показавшими снижение добровольного потребления алкоголя интактными животными под действием селективного агониста KOP рецепторов U50488. Исследование Logrip с соавторами (2009) также показало, что небольшие (неаверсивные) дозы U50488 снижают положительное подкрепление, вызванное алкоголем, и предотвращают формирование условно-рефлекторного предпочтения места у мышей [Logrip et al., 2009]. Снижение потребления алкоголя наблюдалось также и под действием селективного агониста NOP рецепторов SR-8993 [Aziz et al., 2016].



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

Рисунок 3.7 — Относительный уровень экспрессии мРНК KOP (А), pDyn (Б), NOP (В), pNoc (Г) в стриатуме животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя (обозначения как на рисунке 3.5)

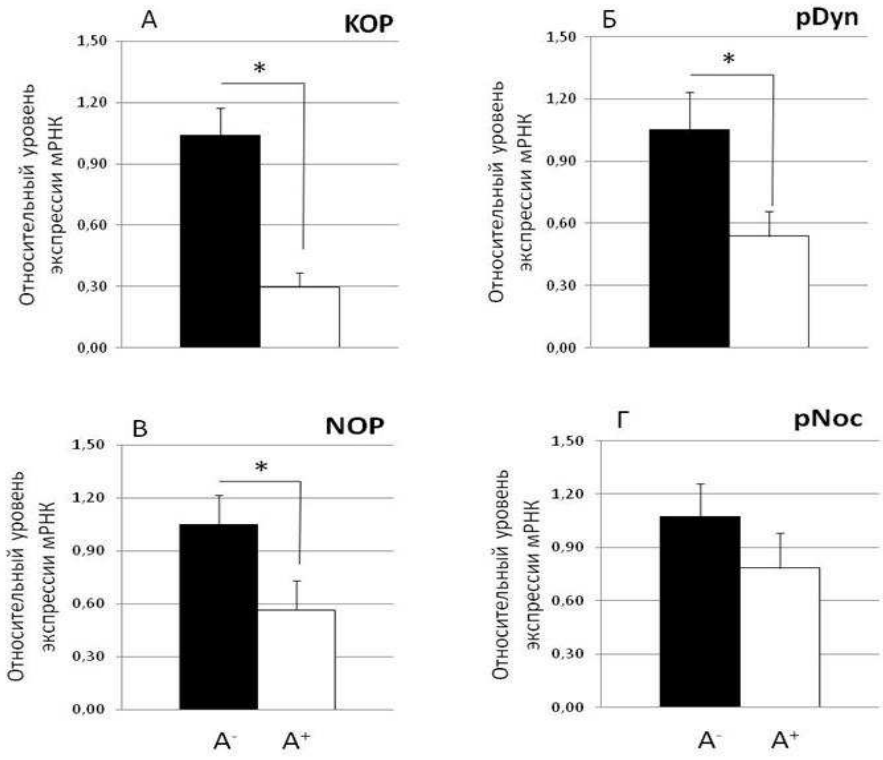
Полученные нами данные также согласуются с результатами исследования Mitchell с соавторами (2005), показавшими увеличение потребления алкоголя интактными крысами на фоне введения селективного антагониста KOP рецепторов norBNI [Mitchell et al., 2005].

В настоящей работе нами не выявлено различий в экспрессии мРНК MOP и DOP рецепторов в стриатуме на ранних стадиях формирования алкогольного предпочтения (данные не приведены). В то же время, использование блокатора MOP рецепторов налтрексона в терапии алкогольной зависимости оправдывается результатами целого ряда исследований с использованием ПЭТ, показавшими

увеличение плотности MOP рецепторов в вентральном стриатуме больных алкоголизмом [Mitchell et al., 2012]. Это, однако, противоречит недавно опубликованным данным Hermann с соавторами (2017), установившими *post mortem* снижение плотности MOP рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом [Hermann, et al., 2017].

3.3.3 Относительный уровень экспрессии мРНК MOP, DOP, KOP, NOP рецепторов и опиоидных пептидов — продинорфина и проноцицептина в миндалине мозга

В миндалине мозга животных группы A^+ экспрессия мРНК KOP, NOP рецепторов и продинорфина, была достоверно ниже, чем в группе A^- в 3.1, 1.7 и 2.0 раза соответственно (Рисунок 3.8). Различий между группами в уровне экспрессии генов MOP рецепторов, DOP рецепторов и проноцицептина не наблюдалось.



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

Рисунок 3.8 — Относительный уровень экспрессии мРНК КОР (А), pDyn (Б), NOP (В), pNoc (Г) в миндалине животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя (обозначения как на Рисунок 3.5)

Была выявлена значимая отрицательная корреляция (коэф. корр. Пирсона r = –0,795; p <0,05) между показателем потребления раствора этанола и уровнем мРНК NOP рецептора в миндалине мозга.

Также была выявлена значимая отрицательная корреляция (коэф. корр. Пирсона r = –0,816; p <0,05) между показателем потребления раствора этанола и уровнем мРНК КОР рецептора в миндалине мозга.

Локальные микроконтуры центральной миндалины (central amygdala; CeA) играют ключевую роль в обработке эмоционально-значимой информации. CeA является частью расширенной миндалины (extended amygdala; ExA) – комплекса лимбических структур переднего мозга, включающего также опорное ядро терминального тяжа (bed nucleus of stria terminalis; BNST) и скорлупу прилежащего ядра (nucleus accumbens; NAc). Структуры ExA обнаруживают сходную цитоархитектуру, а также обильные взаимосвязи друг с другом. ExA ответственна за развитие отрицательных аффектов, связанных со стрессом и злоупотреблением алкоголем, а также характеризуется высоким уровнем экспрессии про- и антистрессорных нейропептидов.

Согласно литературным данным, увеличение ГАМКергической нейротрансмиссии в CeA играет важную роль в реализации подкрепляющих эффектов этанола [Gilpin et al., 2014; Roberto et Siggins, 2006]. Острое введение этанола и острая экспозиция стрессу вызывают освобождение динорфина в CeA [Lam et al., 2008; Karkhanis et al., 2017]. Локальное введение динорфина непосредственно в миндалину мозга сопровождается аверсивным поведением и усиливает тревогу [Lalanne et al., 2014; Carlezon et Krystal, 2016]. Учитывая ключевую роль миндалины мозга в генезе отрицательных аффектов тревоги, страха и поведения, направленного на избегание опасности, степень повышения

уровня динорфина в ответ на воздействие алкоголя в данной структуре, может определять выраженность его отрицательных подкрепляющих эффектов.

Полученные нами данные согласуются с данными о сниженном уровне мРНК NOP рецептора в центральной миндалине больных алкоголизмом [Kuzmin et al., 2009]. Среди структур головного мозга наибольшая плотность NOP рецепторов наблюдается именно в миндалине [Andero et al., 2013]. Изменение ГАМКергической и глутаматергической нейротрансмиссии в CeA играет важную роль в реализации подкрепляющих эффектов алкоголя. Этанол оказывает ингибиторное воздействие на глутаматергическую нейротрансмиссию в CeA. При этом активация NOP рецепторов в CeA снижает этот эффект алкоголя (Kallupi et al., 2014). В то же время, этанол усиливает ГАМК(А)-опосредованные ингибиторные постсинаптические токи (inhibitory postsynaptic currents; IPSC) в CeA. Микроинъекция ГАМК(А)-антагониста в CeA снижает самовведение алкоголя у крыс. При этом введение ноцицептина предотвращает усиление ГАМКергической нейротрансмиссии, вызванное локальным введением алкоголя в CeA. Таким образом, вероятно, снижение потребления этанола под действием ноцицептина происходит вследствие способности последнего ингибировать освобождение ГАМК [Economidou et al., 2008].

Обнаруженный нами относительно низкий уровень экспрессии мРНК NOP рецептора в миндалине мозга крыс группы A^+ может свидетельствовать о большей выраженности отрицательных подкрепляющих эффектов алкоголя у животных, демонстрирующих рост его предпочтения.

Интересно, что аналогичные результаты были получены и в отношении динорфина. Так, Gilpin et al. [2014] обнаружили, что введение динорфина или агониста KOP рецепторов U69593 приводит к уменшению IPSC, вызванных локальным воздействием этанола на нейроны CeA [Gilpin et al., 2014].

Учитывая тесную взаимосвязь KOP-/NOP-рецепторных систем с CRFергической и дофаминергической нейротрансмиссии, мы дополнительно исследовали экспрессию генов, кодирующих CRF и CRF1 рецептор в миндалине мозга и D1 рецептора в вентральном стриатуме.

3.4 Сопряженные механизмы регуляции динорфин/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в стриатуме и миндалине мозга

Скорлупа прилежщего ядра является подразделением вентрального стриатума и имеет определяющее значение в реализации острых эффектов алкоголя и развитии аддиктивного поведения, поскольку является центральным звеном эндогенной системы «награды». Основная популяция нейронов в прилежащем ядре представлена ГАМКергическими средними шипиковыми нейронами (MSN), экспрессирующими динорфин и ноцицептин. Аксоны этих нейронов образуют прямой и непрямой проводящие пути. На телах и дендритах нейронов прямого пути находятся D1 рецепторы дофамина. Динорфин и ноцицептин являются ко-трансмиттерами ГАМК в шипиковых нейронах прямого пути и выделяются в ответ на их стимуляцию дофамином, опосредуемую возбуждающими D1 рецепторами. Аксоны нейронов прямого пути иннервируют вентральную область покрышки среднего мозга, где берут своё начало дофаминергические нейроны мезокортиколимбического пути. В отличие от шипиковых нейронов прямого пути, на телах и дендритах нейронов непрямого пути локализуются тормозные D2 дофаминовые рецепторы. Котрансмиттером ГАМК в нейронах непрямого пути является энкефалин. Дофамин связывается с D1 дофаминовыми рецепторами шипиковых нейронов и вызывает их деполяризацию.

Поскольку все опиоидные рецепторы являются тормозными для экспрессирующих их нейронов, указанные динорфин- и ноцицептин-положительные интернейроны (имеют фенотип «D1-MSN») рассматриваются в качестве контуров отрицательной обратной связи в мезолимбической системе, призванных снижать уровень избыточной дофаминергической нейротрансмиссии и, очевидно, гедонический тонус.

Низкий уровень экспрессии гена продинорфина в стриатуме животных с высоким уровнем предпочтения алкоголя может быть обусловлен нарушением

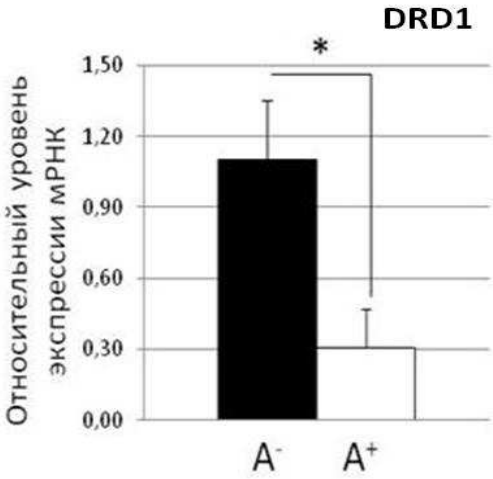
функций D1 дофаминового рецептора (DRD1). Показано, что динорфин-положительные средние шипиковые нейроны (medium spiny neurons, MSN) стриатума имеют преимущественно D1-фенотип [Al-Hasani et al., 2015; Tejeda et al., 2017, Tejeda et Bonci, 2019]. CREB (cAMP response element-binding protein) — транскрипционный фактор, специфически связывающийся с последовательностями ДНК, именуемыми CRE (cAMP response elements), в промоторах определенных генов. Активация D1 рецепторов приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB и, в свою очередь, активации транскрипции мРНК продинорфина [Steiner et Gerfen, 1995; McClung et Nestler, 2008; McCarthy et al., 2012; Muschamp et Carlezon, 2013; Trifilieff et Martinez, 2013; Bilbao et al., 2014; Nestler, 2015; Resendez et al., 2016]. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные о взаимосвязи экспрессии гена проноцицептина с активацией D1 рецепторов в какой-либо клеточной популяции. Следует, однако, учесть, что ген, кодирующий проноцицептин (*PNOC*), имеет в проксимальной части своего промотора CRE-последовательность [D'Addario et al., 2013ab], и, таким образом, тоже является мишенью транскрипционного фактора CREB [Beaumont et al., 2012]. В связи с этим, мы дополнительно исследовали экспрессию гена, кодирующего D1 рецептор (DRD1), в стриатуме.

Показано, что центральная миндалина (CeA) играет важную роль в реализации эффектов острого и хронического введения этанола [Gilpin et al., 2014; Roberto et Siggins, 2006]. Нейроны CeA характеризуются высоким уровнем экспрессии кортикотропин-рилизинг фактора (CRF) и его рецепторов. Взаимодействие ноцицептинергической и CRFергической систем в CeA играет, по-видимому, особую роль в экстрагипоталамической CRF-зависимой регуляции функций мозга при формировании аддиктивного поведения [Gilpin et al., 2014].

3.4.1 Уровень экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора в стриатуме крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения

Наше исследование показало, что уровень экспрессии мРНК D1 рецептора (DRD1) в стриатуме животных группы A^+ был в 3,7 раз ниже, чем у животных с постоянно низким предпочтением алкоголя (рисунок 3.9).

D1 подтип рецепторов дофамина представлен в стриатуме исключительно в качестве постсинаптических рецепторов [Beaulieu et al., 2015], а нарушение их функций с помощью фармакологических либо генетических методов приводит к изменению поведения, связанного с естественными формами подкрепления либо действием ПАВ [De Mei et al., 2009; Koob et Volkow, 2016; Baik, 2013].



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

Рисунок 3.9 — Относительный уровень экспрессии мРНК DRD1 (D1 рецептор) в стриатуме животных с различной динамикой алкогольного предпочтения (обозначения как на рисунке. 3.5)

Глутаматергические нейроны амигдаларной локализации, проецирующиеся в стриатум, экспрессируют мРНК KOP рецептора. Важно сказать, что KOP рецепторы локализуются лишь на глутаматергических окончаниях, образующих синапсы с D1-MSN, но не с D2-MSN стриатума. Глутаматергичские пресинапсы,

содержащие KOP рецепторы, таким образом, чувствительны к ингибиторному эффекту динорфина, высвобождающегося из коллатералей D1-MSN. Количество ГАМК, выделяемое коллатералями самих MSN, также находится под ингибиторным контролем KOP рецепторов, локализованных на их окончаниях. D1-MSN устанавливают тормозные синапсы на телах D2-MSN, а D2-MSN — тормозные синапсы на телах D1-MSN, образуя реципрокную систему. Динорфин ингибирует освобождение ГАМК из коллатералей D1-MSN сильнее, чем из коллатералей D2-MSN. Таким образом, при повышении уровня динорфина в NAc, результирующий сетевой эффект заключается в подавлении активности D1-MSN и дезингибировании D2-MSN, определяя развитие аверсивного состояния [Tejeda et al., 2017].

Bazov et al. (2018) установили *post mortem* снижение экспрессии гена D1 рецептора в стриатуме больных алкоголизмом. Кроме того, они обнаружили выраженную корреляцию между экспрессией кластеров генов [продинорфин + KOP рецептор] и [D1 рецептор + D2 рецептор], что предполагает существование связи, координирующей их транскрипцию в процессе регуляции баланса активности между нейронными популяциями D1-MSN и D2-MSN. Снижение экспрессии D1 рецепторов подтверждает предположение о низкой активности, либо малом числе D1-MSN в NAc больных алкоголизмом, что может приводить к персистирующему дезингибированию вызванной спайковой активности D2-MSN и стойкой дисфории.

Bazov et al. (2018) было обнаружено два транскрипционных паттерна определяющих дезингибирование D2-MSN: (1) у больных алкоголизмом с высоким уровнем экспрессии KOP рецепторов, уровень экспрессии продинорфина был выше, чем в контроле; (2) в то же время, у больных алкоголизмом с низкой экспрессией гена KOP рецептора, уровень экспрессии гена продинорфина был ниже, чем в контроле. В первом случае дезингибирование D2-MSN возникает вследствие торможения избыточным уровнем динорфина освобождения ГАМК из коллатералей D1-MSN, призванных снижать активность D2-MSN. Во втором случае, напротив — избыточное высвобождения ГАМК из

коллатералей D2-MSN, образующих ингибиторные синапсы на телах D1-MSN (вследствие снижения ингибиторного влияния каппа-опиоидной системы на ГАМКергический пресинапс), приводит к подавлению активности D1-MSN и, как следствие дизингибированию D2-MSN. Во всех случаях уровень экспрессии мРНК напрямую коррелировал с уровнем белка, кодируемого этим геном [Bazov et al., 2018; Hirth et al., 2016].

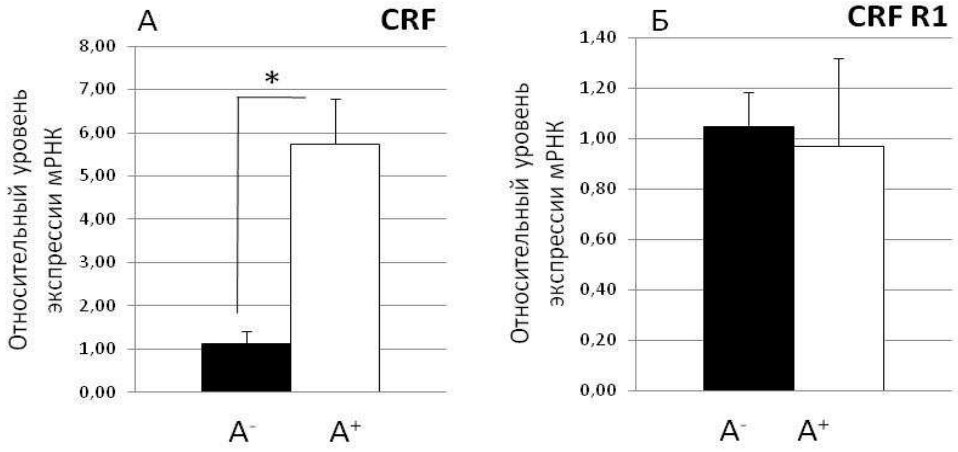
Достоверные данные об экстраклеточной концентрации динорфина на сегодняшний день отсутствуют, поскольку такие данные у лиц, страдающих алкоголизмом, при жизни получить невозможно. Тем не менее, данные, полученные *post mortem*, показывают, что уровень мРНК продинорфина положительно коррелирует с уровнем продинорфина в стриатуме человека с высокой статистической значимостью (p <0.001), подтверждая возможность экстраполяции уровня мРНК на уровень соответствующего конечного белкового продукта экспрессии гена [Sarkisyan et al., 2015]. При этом известно, что степень активации KOP рецепторов зависит от концентрации динорфина [Kononenko et al., 2017].

Полученные нами данные согласуются также с данными Hirth с соавторами (2016), обнаружившими *post mortem* снижение количества D1 рецепторов в вентральном стриатуме и хвостатом ядре субъектов, страдавших при жизни алкоголизмом и употреблявших алкоголь в количестве не менее 80 г/сут [Hirth et al., 2016].

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с данными литературы о снижении количества D1 рецепторов в стриатуме больных алкоголизмом [Hirth et al., 2016; Bazov et al., 2018] и позволяют предполагать, что низкий уровень мРНК D1 рецептора, а также продинорфина и проноцицептина в стриатуме могут обусловливать неэффективность механизма отрицательной обратной связи и представлять один из важнейших факторов патогенеза алкогольной зависимости на ранних стадиях ее формирования.

3.4.2 Уровень экспрессии мРНК CRF и CRF1 рецептора в миндалине крыс с различной динамикой алкогольного предпочтения

Наше исследование 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 CRF1 рецептора (CRFR1) (Рисунок 3.10).



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

Рисунок 3.10 — Относительный уровень экспрессии мРНК CRF (А) и CRFR1 (Б) в миндалине животных с различной динамикой добровольного потребления алкоголя (обозначения как на рисунке 3.5)

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Как известно, центральная миндалина (CeA) играет важную роль в определении выраженности эффектов острого и хронического введения этанола [Gilpin et al., 2014; Roberto et Siggins, 2006]. Нейроны CeA характеризуются высоким уровнем экспрессии кортикотропин-рилизинг фактора (CRF) и его рецепторов (CRF1 и CRF2).

CRF — нейропептид, играющий ключевую роль в развитии поведенческих и эндокринных ответов на стресс. Центральное введение CRF оказывает выраженное анксиогенное действие и воспроизводит многие поведенческие эффекты стресса [Dunn et Berridge, 1990] за счет активации CRF1 рецепторов

[Koob, 2013]. Показано, что в паравентрикулярном ядре эти рецепторы опосредуют эндокринный гипофизарно-надпочечниковый ответ на стресс [Turnbull et Rivier, 1997], тогда как в опорном ядре терминального тяжа (bed nucleus of stria terminalis; BNST) и центральном ядре миндалины (central amygdala; CeA) они ответственны за развитие эмоциональных нарушений, в том числе, вызванных отменой алкоголя [Проскурякова и др., 2017; Koob et Kreek, 2007].

Известно, что антагонисты CRF-рецепторов подавляют реакцию самовведения алкоголя у зависимых от него крыс [Funk et al., 2014]. Оптогенетическими методами установлено, что 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 [de Guglielmo et al., 2019]. Подавление активности этих клеток или нарушение их связи с группой нейронов, известной как опорное ядро терминального тяжа (bed nucleus of stria terminalis; BNST), проецирующейся в вентральную покрышку среднего мозга и регулирующей активность дофаминовых нейронов VTA, приводило к снижению потребления алкоголя и соматических симптомов синдрома отмены [de 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. В ряде работ сообщалось о колокализации CRF и динорфина в CeA и усилении эффекта CRF в результате фармакологической блокады KOP рецепторов [Kang-Park et al., 2015]. Введение CRF в миндалину увеличивает частоту миниатюрных ингибиторных постсинаптических потенциалов ГАМКергических нейронов CeA, при этом фармакологическая блокада KOP рецепторов антагонистом norBNI усиливает эффект CRF [Kang-Park et al., 2015]. Эти представления были подтверждены в экспериментах *ex vivo* на срезах мозга, показавших, более выраженный активирующий эффект аппликации CRF на ГАМКергические нейроны CeA у KOP-нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа (на 84% и на 24,6% соответственно) [Kang-Park et al., 2015]. При этом, активация KOP рецепторов подавляет CRF-вызванную активность

ГАМКергических нейронов CeA [Kang-Park et al., 2013]. По-видимому, эффект CRF в миндалине опосредуется его взаимодействием с CRF1, но не с CRF2 подтипом рецепторов [Kang-Park et al., 2015]. Было высказано предположение, что в CeA CRF вызывает освобождение динорфина, приводящее, в свою очередь, к активации КОР рецепторов и последующей модуляции эффектов CRF [Kang-Park et al., 2015]. В ряде работ было показано, что этанол активирует динорфин/каппа-опиоидную систему миндалины схожим с CRF образом, причем эффект увеличения частоты миниатюрных ингибиторных постсинаптических потенциалов ГАМКергических нейронов CeA был также более выражен у КОР-нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа [Kang-Park et al., 2013]. Эти факты и результаты исследований, показавшие, что этанол вызывает освобождение как CRF [Nie et al., 2004], так и динорфина в CeA [Karkhanis et al., 2017], позволяют предположить, что эффекты этанола на CRF и динорфин/каппа-опиоидную систему миндалины являются взаимозависимыми звеньями одной цепи (Рисунок 3.12). Однако механизмы реципрокных отношений CRF/каппа-опиоидной систем в пределах миндалины должны стать предметом будущих исследований.

До сих пор дискуссионным является вопрос о роли двух типов рецепторов CRF1 и CRF2 миндалины в реализации эффектов активации КОР в моделях алкогольной зависимости. С одной стороны, было показано, что введение антагониста CRF1 рецепторов предотвращает КОР-агонист-индуцируемое возобновление угашенного самовведения алкоголя [Funk et al., 2014]. С другой стороны, нокаутированные по гену CRF1 рецептора мыши демонстрируют КОР-зависимое аверсивное поведение («place aversion») [Contarino et Papaleo, 2005]. Предполагают, что освобождение динорфина в CeA опосредуется активацией CRF2 рецепторов, тогда как освобождение ГАМК – CRF1 рецепторов [Nie et al., 2004].

Противоречивые данные были получены при изучении экспрессии мРНК CRF в миндалине в экспериментальных моделях алкогольной зависимости. При длительной хронической алкоголизации были показаны разнонаправленные

изменения уровня мРНК CRF и динорфина в CeA крыс инбредных линий с высоким (Sardinian alcohol-preferring, sP) и низким (Sardinian non-alcohol-preferring, sNP) уровнем предпочтения алкоголя [Zhou et al., 2013]. Было установлено, что предпочитающие алкоголь крысы sP имели изначально (до алкоголизации) более высокий уровень экспрессии мРНК CRF в миндалине по сравнению с крысами sNP. Уровень мРНК препродинорфина достоверно не различался в этих группах животных. Добровольное потребление алкоголя в режиме свободного выбора между 10% раствором этанола и водой приводило к снижению уровня мРНК CRF и к повышению уровня мРНК продинорфина в миндалине крыс sP [Zhou et al., 2013]. На первый взгляд, полученные нами данные противоречат результатам этих исследований. Однако необходимо учитывать, что использованная в настоящем исследовании модель нацелена на выявление в гетерогенной популяции животных особей, характеризующихся ростом потребления алкоголя во времени (группа A+). Повышенный уровень мРНК CRF в миндалине мозга этих животных соответствовал таковому у инбредных крыс с врожденной предрасположенностью к потреблению алкоголя до начала алкоголизации [Zhou et al., 2013].

Большинство опубликованных исследований влияния NOP-агонистов на потребление алкоголя у грызунов было проведено на предпочитающих алкоголь крысах линий msP. Тем не менее, схожие результаты были получены и в исследованиях, проведенных на крысах Wistar (Kuzmin et al., 2007; Aziz et al., 2016). В то же время, в исследованиях, проводившихся параллельно на крысах линии msP и Wistar, способность NOP-агонистов снижать потребление алкоголя была выше у крыс линии msP [Economidou et al., 2008; de Guglielmo et al., 2015; Martin-Fardon et al., 2010]. Было показано, что в сравнении с крысами Wistar, крысы линии msP обнаруживают гиперэкспрессию генов системы CRF, и, как следствие, более чувствительны к стрессу и имеют тревожно-депрессивный поведенческий фенотип [Ciccocioppo et al., 2019]. Учитывая тот факт, что активация NOP рецепторов оказывает выраженное анксиолитическое и антистрессорное действие вследствие функционального антагонизма с

CRFергической системой, можно предположить, что влияние NOP-агонистов на потребление алкоголя связано с их способностью ослаблять выраженность отрицательных аффектов, возникающих вследствие избыточной активости нейротрансмиссии, опосредованной CRF в миндалине мозга [Economidou et al., 2008]. Кроме того, введение NOP-агонистов снижало выраженность симптомов отмены алкоголя у зависимых животных [Martin-Fardon et al., 2010; Economidou et al., 2011; Ciccocioppo et al., 2014]. На препаратах срезов CeA было показано, что наиболее выраженно ноцицептин снижал способность алкоголя усиливать ГАМКергическую нейротрансмиссию, опосредуемую ГАМК(А) рецепторами, у крыс линии msP [Roberto et Siggins, 2006].

Как видно из приведенных выше данных, эффекты динорфина и ноцицептина на ГАМКергическую и CRFергическую нейротрансмиссию в CeA очень схожи. Наши результаты также продемонстрировали однонаправленные различия в экспрессии генов, кодирующих KOP и NOP рецепторы в этой структуре, и, в то же время, согласуются с современными представлениями об эволюционно-генетическом родстве этих опиоидных подсистем.

Полученные результаты кратко представлены в сводных таблицах 3.1 и 3.2 ниже.

Таблица 3.1 — Относительный уровень экспрессии мРНК в мозге животных с ростом предпочтения алкоголя по сравнению с животными со стабильно низким уровнем его потребления

Область / Ген	**KOP**	**pDyn**	**NOP**	**pNoc**	**D_1**	**CRF_1**	**CRF**
Стриатум	>.05	↓	>.05	↓	↓	–	–
Миндалина	↓	↓	↓	>.05	–	>.05	↑
Средний мозг	>.05	>.05	>.05	>.05	–	–	–

Таблица 3.2 — коэффициенты корреляции Пирсона (r) между уровнем экспрессии мРНК и потреблением алкоголя (в г/кг, среднее за последнюю неделю) (n = 26; 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

Учитывая ключевую роль динорфина и ноцицептина в подавлении мезолимбической дофаминергической нейротрансмиссии и гедонического тонуса [Jones et al., 2016; Mendez et al., 2016; Lalanne et al., 2014], наблюдаемые относительно низкие уровни экспрессии мРНК KOP, NOP рецепторов и предшественников их эндогенных лигандов продинорфина и проноцицептина в мезолимбических структурах мозга животных с растущим уровнем потребления алкоголя могут свидетельствовать о сниженной эффективности отрицательной обратной связи в макроконтуре стриатум-средний мозг и в локальных микроконтурах стриатума и миндалины, что, в свою очередь, может являться важным фактором, обусловливающим более высокую мотивационную значимость алкоголя и повышенный риск формирования зависимости.

Нарушение опиоидной регуляции функций областей мишеней — стриатума и миндалины у животных с растущим уровнем потребления алкоголя сопровождается низким уровнем экспрессии мРНК дофаминового D1 рецептора в стриатуме и высоким уровнем экспрессии мРНК CRF в миндалине, что может служить дополнительным фактором риска формирования зависимости от алкоголя. На основе полученных в работе данных можно дополнить схему регуляции дофаминергической и ГАМКергической нейротрансмиссии опиоидной системой на ранних стадиях формирования алкогольной зависимости (см. рисунки 3.11 и 3.12).

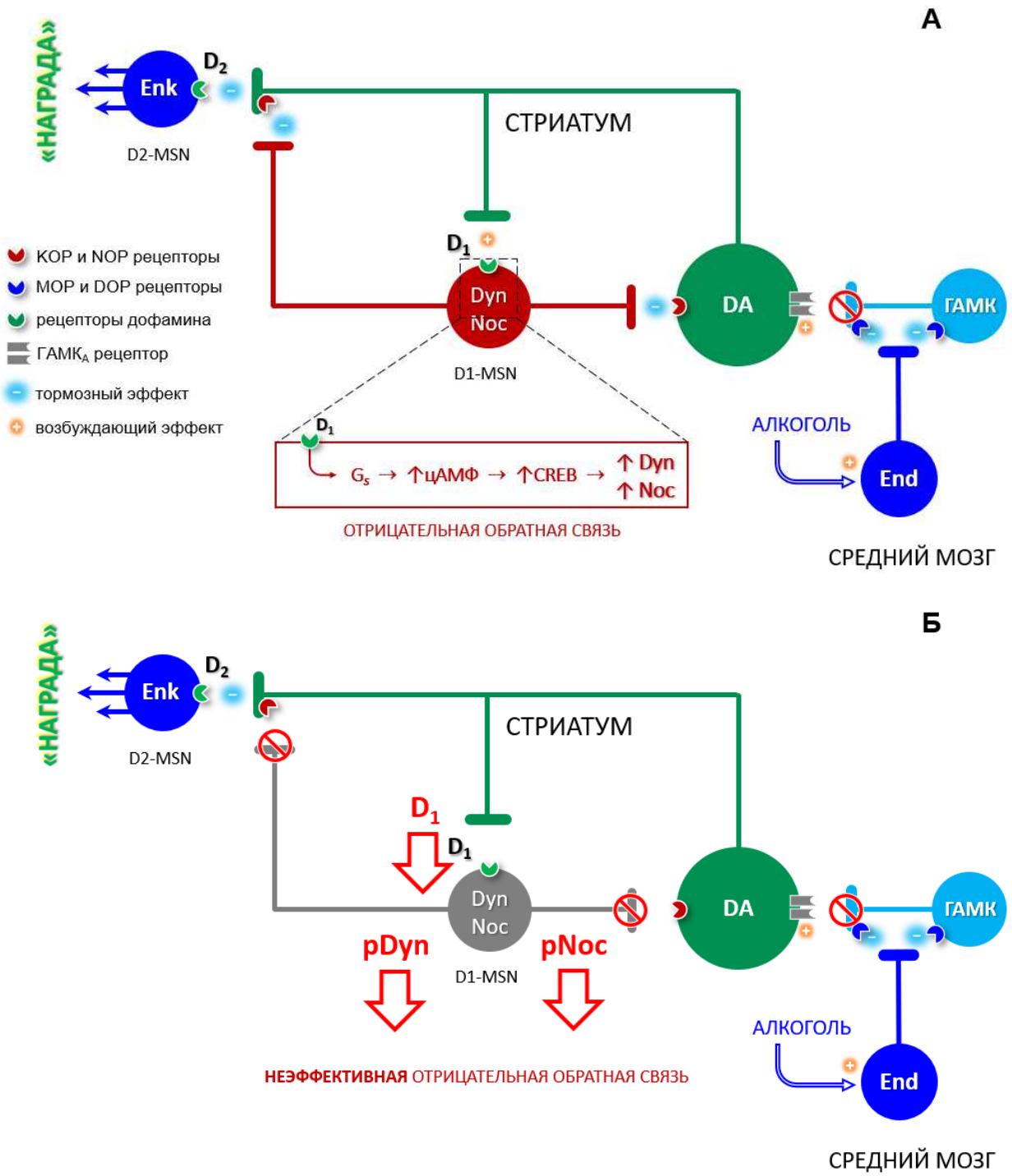


Рисунок 3.11 — Схема отрицательной обратной связи в регуляции дофаминергической нейротрансмиссии в эндогенной системе «награды» в норме (А) и у особей с ростом алкогольного предпочтения (Б)

На рисунке 3.11 представлена предположительная схема опиоидной регуляции дофаминергической нейротрансмиссии в системе «средний мозг – вентральный стриатум» у особей со стабильно низким (А) и растущим (Б)

предпочтением алкоголя. Вентральный стриатум является центром эндогенной системы «награды». Освобождение дофамина в данной структуре сопровождается возникновением эйфории и ощущения удовольствия. Алкоголь вызывает непрямую активацию MOP/DOP рецепторов за счет освобождения эндорфинов/энкефалинов. Это, в свою очередь, ведет к ингибированию освобождения тормозного нейромедиатора ГАМК в области тел дофаминергических нейронов вентральной покрышки (VTA) среднего мозга. Лишенные тонического ингибиторного влияния ГАМК, дофаминергические нейроны увеличивают частоту спонтанных разрядов, что ведет к повышению освобождения дофамина в прилежащем ядре вентрального стриатума и развитию связанной с этим эйфории. Контуры отрицательной обратной связи, призванные снижать уровень дофаминергической нейротрансмиссии в вентральном стриатуме, представлены динорфин- и ноцицептин-положительными средними шипиковыми нейронами (MSN). Возбуждение MSN запускается активацией D1 дофаминовых рецепторов, локализованных на телах и дендритах MSN стриатума (фенотип «D1-MSN»). D1 рецепторы сопряжены с возбуждающими Gs-белками. Их активация повышает внутриклеточный уровень цАМФ и, как следствие, фосфорилирование транскрипционного фактора CREB. CREB, в свою очередь, запускает экспрессию генов продинорфина и проноцицептина — котрансмиттеров синергистов ГАМК. Аксоны данных D1-MSN образуют как аксоаксональные синапсы на окончаниях дофаминергических нейронов внутри стриатума, так и аксосоматические на телах и дендритах дофаминергических нейронов VTA и компактную часть черной субстанции (SNc). KOP и NOP рецепторы расположены также на телах и дендритах дофаминергических нейронов VTA. Поскольку все опиоидные рецепторы являются тормозными, активация KOP и NOP рецепторов приводит к гиперполяризации мембраны и снижению как спайковой активности дофаминергических нейронов, так и высвобождения дофамина из их пресинаптических окончаний.

Обнаруженный нами сниженный уровень экспрессии мРНК продинорфина (pDyn), проноцицептина (pNoc) и D1 рецептора дофамина в вентральном

стриатуме предполагает наличие более выраженного дофаминергического ответа на алкоголь у животных с ростом его предпочтения (группа А+). Больший дофаминергический ответ, вероятно, определяет более высокую гедоническую привлекательность алкоголя и мотивацию его потребления на ранних этапах становления зависимости.

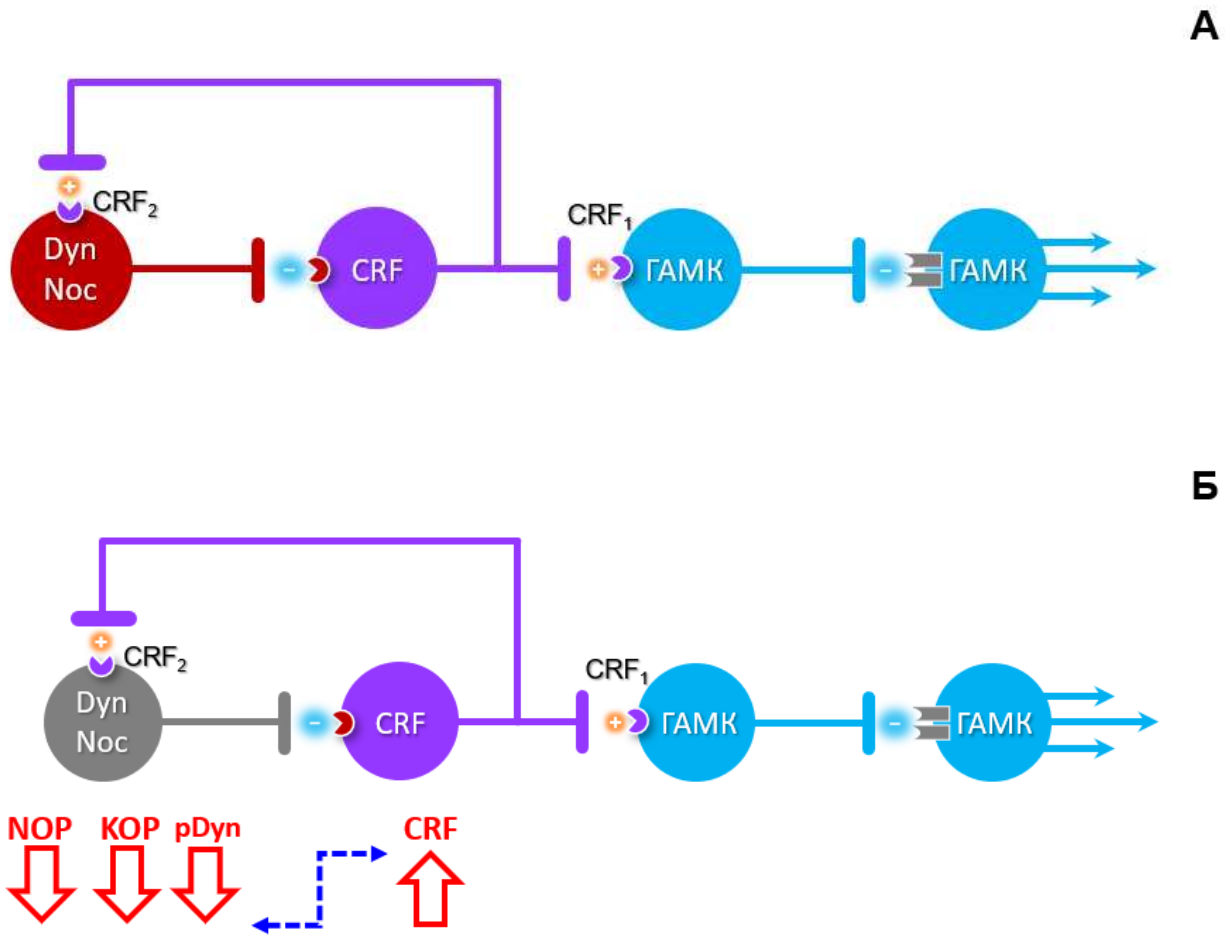


Рисунок 3.12 — Схема реципрокных отношений опиоидергической и CRFергической систем в регуляции ГАМКергической нейротрансмиссии в миндалине мозга в норме (А) и у особей с ростом алкогольного предпочтения (Б)

На рисунке 3.12 представлена предположительная схема опиоидной регуляции ГАМКергической нейротрансмиссии в миндалине мозга у особей со стабильно низким (А) и растущим (Б) предпочтением алкоголя. Миндалина функционирует как интегративный центр, который преобразует эмоционально

значимую сенсорную информацию о внешней и внутренней среде в поведенческие и физиологические реакции. Миндалина опосредует негативные аффективные состояния, связанные со стрессом и потреблением алкоголя. Алкоголь дозозависимо увеличивает освобождение ГАМК в центральное ядро миндалины (CeA) в популяции нейронов, которые образуют синапсы на выходных нейронах медиальной части CeA, что приводит к прекращению передачи импульсов из CeA в ядро ложа терминальной полоски (BNST). Активность BNST коррелирует с тревогой. BNST является центром переключения между нейронами гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и повышает ее активность в ответ на стресс. Кортикотропин-релизинг фактор (CRF) в CeA, аналогично этанолу, стимулирует освобождение ГАМК, и этот эффект, блокируется ноцицептином и динорфином. Животные, демонстрирующие рост алкогольного предпочтения (группа А+), имеют значительно более высокий уровень мРНК CRF в данной структуре. Ноцицептин снижает потребление этанола, вероятно за счет функционального антагонизма с CRF. Увеличение уровня CRF способствует росту добровольного потребления этанола, при этом низкий уровень экспрессии KOP, NOP рецепторов и продинорфина свидетельствует о недостаточном ингибиторном влиянии этих опиодных подсистем на экспрессию CRF в миндалине мозга у крыс групы А+.

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.

В настоящей работе мы использовали наиболее приближенную к реальной клинической ситуации экспериментальную модель добровольного потребления алкоголя, когда животным предоставлялся свободный выбор между 10% раствором этанола и водой. Свободный доступ к алкоголю и воде на протяжении 25 дней тестирования позволил выделить две характерные группы животных: со стабильно низким (A^-) и с неуклонно растущим (A^+) уровнем его предпочтения. В группе A^+ среднесуточное потребление алкоголя к концу периода тестирования возросло более чем в 2 раза по сравнению с начальным уровнем, тогда как в группе A^- достоверно не изменилось.

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 (pDyn) и проноцицептин (pNoc) между этими двумя группами животных.

В качестве ключевых структур мезолимбической системы были выбраны: вентральная часть среднего мозга (VTA) — область локализации тел дофаминергических нейронов, а также вентральный стриатум и миндалина мозга (амигдала) — главные структуры-мишени, иннервируемые этими дофаминергическими нейронами.

В настоящее время в литературе целостная картина транскрипционной активности генов опиоидной системы не представлена. По этой причине первым этапом исследования стало количественное сопоставление уровня мРНК в исследуемых мезолимбических структурах интактных животных. Сопряженной

задачей исследования была проверка соответствия полученного нами распределения мРНК и плотности рецепторов / локализации пептидов по имеющимся литературным данным, что позволило бы с большей уверенностью экстраполировать данные об уровне мРНК на уровень соответствующих белков у животных с различной динамикой алкогольного предпочтения.

Сравнение уровня экспрессии мРНК 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 исследованных областях мозга.

Мы обнаружили, что у животных группы A^+ наблюдается достоверно более низкий, по сравнению с животными группы A^-, уровень экспрессии мРНК продинорфина (pDyn) и проноцицептина (pNoc) в вентральном стриатуме, причем уровень мРНК продинорфина отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя. Кроме того, животные группы A^+ характеризовались достоверно более низким уровнем мРНК KOP, NOP рецепторов и продинорфина в миндалине мозга. При этом уровнем мРНК KOP и NOP рецепторов отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя. Достоверных различий между группами в уровне экспрессии мРНК MOP и DOP рецепторов ни в одной из исследованных структур обнаружено не было.

Поскольку экспрессия продинорфина сопряжена с активацией D1 рецепторов в стриатуме, мы дополнительно исследовали уровень его мРНК в этой структуре. Мы обнаружили, что у крыс группы A^+ экспрессия мРНК D1 рецептора здесь была достоверно ниже, чем у животных группы A^-, что согласуется с наблюдаемым низким локальным уровнем мРНК продинорфина. Уровень мРНК D1 рецептора также отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя.

Учитывая супрессивное влияние динорфина и ноцицептина на уровень дофаминергической нейротрансмиссии в стриатуме (центр системы «награды», ответственный за возникновение алкогольной и наркотической эйфории), наблюдаемый здесь более низкий уровень экспрессии мРНК этих опиоидных пептидов в группе животных А+, по нашему мнению, может свидетельствовать о сниженной эффективности отрицательной обратной связи в микро- и макроконтурах мезостриарной системы. Динорфин и ноцицептин экспрессируются популяцией средних по размеру шипиковых нейронов (MSN) стриатума. Эти MSN образуют локальные ингибиторные синапсы на окончаниях мезостриарных дофаминергических нейронов и, за счет активации расположенных на них KOP и NOP рецепторов, снижают экзоцитоз дофамина. В дополнение к этому, MSN направляются в средний мозг и образуют ингибиторные синапсы также на телах дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (VTA). MSN стриатума, экспрессирующие динорфин и ноцицептин, возбуждаются под действием дофамина, поскольку экспрессируют возбуждающие D1 рецепторы. Таким образом, активация дофамином популяции шипиковых нейронов с фенотипом «D1-MSN» приводит, в конечном итоге, к ингибированию электрической активности дофаминергических нейронов VTA и снижению уровня экстраклеточного дофамина в стриатуме. Такая функция позволяет рассматривать MSN, ко-экспрессирующие продинорфин, проноцицептин и D1 рецепторы, в качестве системы отрицательной обратной связи, призванной снижать интенсивность эйфории, вызываемой приемом этанола.

В настоящем исследовании мы обнаружили, что у животных с ростом алкогольного предпочтения в вентральном стриатуме наблюдается значительно более низкая экспрессия всех трех указанных генов. Эти данные позволяют нам предполагать, что животные группы А+ характеризуются неэффективными механизмами отрицательной обратной связи в мезостриарной системе следствием чего является более выраженнй дофаминергический ответ на алкоголь эндогенной системе «награды». Известно, что степень увеличения экстраклеточной

концентрации дофамина в вентральных отделах стриатума положительно соотносится с выраженностью алкогольной эйфории. Таким образом, можно предполагать, что у животных группы А+ алкоголь обладает более выраженным положительным подкрепляющим действием по сравнению с животными группы А–.

Эти данные могут свидетельствовать о формировании гедонической мотивации потребления алкоголя у животных, обнаруживающих прогрессивный рост его потребления со временем.

Эти данные также позволяют предполагать наличие «защитной» роли динорфин/KOP-рецепторной и ноцицептин/NOP-рецепторной систем в отношении становления алкогольного предпочтения в раннем периоде употребления алкоголя.

Мы также обнаружили, что у животные группы A^+ наблюдается достоверно более низкий, по сравнению с животными группы A^-, уровень экспрессии мРНК KOP, NOP рецепторов и продинорфина в миндалине мозга – ключевой стуктуре эндогенной системы «анти-награды», отвечающей за развитие отрицательных аффектов тревоги и аверсии в ответ на стресс или отмену алкоголя. Учитывая тесную взаимосвязь между каппа-опиоидной, ноцицептиновой системами и кортикотропин-релизинг фактором (CRF) в миндалине мозга, мы дополнительно исследовали уровень мРНК CRF и CRF1 рецептора в данной структуре. Мы обнаружили, что уровень мРНК CRF в миндалине мозга в группе A^+ был в 5,5 раз выше по сравнению с животными группой A^-, что согласуется с современными представлениями о реципрокных отношениях этих систем в этой стуктуре мозга. Кроме того, уровень мРНК CRF положительно коррелировал с уровнем потребления алкоголя в группе А+, что свидетельствует о том, что высокий уровень CRF может являтся еще одним важным фактором, определяющим рост мотивации потребления алкоголя.

Таким образом, в работе показано, что в условиях свободного доступа к алкоголю, крысы, демонстрирующие прогрессивный рост его предпочтения характеризуются: (1) низким уровнем экспрессии мРНК опиоидных пептидов

продинорфина и проноцицептина в вентральной области стриатума, что, возможно, объясняется низким локальным уровнем экспрессии мРНК D1 рецептора, и (2) высоким уровнем экспрессии мРНК CRF в миндалине мозга, что, возможно, объясняется низким локальным уровнем экспрессии мРНК KOP, NOP рецепторов и продинорфина.

Подводя итог, следует отметить, что идентичный характер различий в экспрессии генов каппа-опиоидной и ноцицептиновой систем между исследованными группами животных обосновывает целесообразность одновременного воздействия на KOP и NOP рецепторы в качестве нового направления в поиске высокоэффективных лекарственных средств лечения алкоголизма, особенно на ранних этапах его формирования.

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 формировании аддиктивного поведения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BAC — концентрация алкоголя в крови

CeA — центральное ядро миндалины

CPP — условный рефлекс предпочтения места

CRF — кортикотропин релизинг фактор

D1 – D5 — рецепторы дофамина

DA — дофамин

DAT — дофамин-транспортный белок

DOP (receptor) — дельта опиоидный (рецептор)

Dyn — динорфины

End — эндорфины

Enk — энкефалины

KOP (receptor) — каппа опиоидный рецептор

LC — голубое пятно

MOP (receptor) — мю опиоидный рецептор

MSN — средний шипиковый нейрон

NAc — прилежащек ядро

NET – норэпинефрин-транспортный белок

Noc — ноцицептин

NOP (receptor) — ноцицептиновый опиоидный (рецептор)

PDYN — ген продинорфина

pDyn — продинорфин

PENK — ген проэнкефалина

PFC — префронтальная кора

PND — постнатальные дни

PNOC — ген проноцицептина

pNoc — проноцицептин

POMC — ген проопиомеланокортина

SERT — серотонин-транспортный белок

SN — черная субстанция

TH — тирозингидроксилаза

VMAT2 — везикулярный моноамин-транспортный белок 2

VTA — вентральная область покрышки среднего мозга

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ПЦР — полимеразная цепная реакция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина, И.П. Генетические и эпигенетические механизмы алкоголизма / И.П. Анохина, А.О. Кибитов, А.Г. Веретинская [и др.] // Вопросы наркологии. — 2010. — № 6. — С. 69-75.

2. Анохина, И.П. Основные биологические механизмы болезней зависимости от психоактивных веществ / И.П. Анохина // Вопросы наркологии. — 2017. — № 2-3. — С. 15-41.

3. Анохина, И.П. Удовольствие и патогенез болезней зависимости / И.П. Анохина // Вопросы наркологии. — 2018. — № 2(162). — С. 22-34.

4. Арзуманов, Ю.Л. Нейрофизиологические аспекты зависимости от психоактивных веществ / Ю.Л. Арзуманов, С.К. Судаков // Наркология: Национальное руководство / Под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 944 с. — С. 185-198.

5. Башкатова, В.Г. Введение агониста каппа-опиоидных рецепторов предупреждает изменения двигательной активности и метаболизм крыс, вызванные острым введением этанола / В.Г. Башкатова, С.К. Судаков, М.М. Тригуб [и др.] // Академический журнал Западной Сибири. — 2014. — Т. 10, № 1 (50). — С. 57.

6. Блохина, Е.А. Опыт применения вивитрола (налтрексона пролонгированного действия в инъекциях) в клинической практике для лечения алкогольной зависимости / Е.А. Блохина, Е.М. Крупицкий, Е.А. Брюн // Обозрение психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева. — 2010. — № 3. — С. 58-61.

7. Веретило, Л.В. Злокачественный алкоголизм: особенности формирования и клинические варианты / Л.В. Веретило, А.В. Трусова, А.Ю. Егоров [и др.] // Наркология. — 2014. — Т. 13, № 2 (146). — С. 42-51.

8. Ветрилэ, Л.А. Антитела к нейромедиаторам — нейроиммунные маркеры в персонализированной профилактике болезней зависимости / Л.А.

Ветрилэ, Т.И. Невидимова, Е.И. Мастерова [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2017. — Т. 61, № 3. — С. 31-37.

9. Давыдова, Т.В. Нейробиологическая предрасположенность к аддиктивным расстройствам. Антитела к нейромедиаторам / Т.В. Давыдова, Т.И. Невидимова, Л.А. Ветрилэ [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2018. — Т. 62, № 4. — С. 254-256.

10. Дробленков, А.В. Структурные особенности дофаминергических ядер вентральной покрышки среднего мозга / А.В. Дробленков, А.В. Федоров, П.Д. Шабанов // Наркология. — 2018. — Т. 17, № 3. — С. 41-45.

11. Дубынин, В.А. Ноцицептин/орфанин fq и наркотическая зависимость / В.А. Дубынин, Н.Ю. Сарычева, П.К. Анохин [и др.] // Вопросы наркологии. — 2017. — № 6(154). — С. 25-28.

12. Козлов, В.А. К вопросу о формализации питьевого потребления этанола у крыс / В. А. Козлов [и др.] // Acta Medica Eurasica. — 2015. — № 1. — С. 20-25.

13. Котов, А.В. К природе двух форм аддиктивного поведения / А.В. Котов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 13-24.

14. Котов, А.В. К природе феномена аддикции в механизмах целенаправленной активности / А.В. Котов // Психическое здоровье. — 2008. — Т. 6, № 4(23). — С. 57-67.

15. Котов, А.В. Морфин, кокаин и алкоголь: особенности реализации целенаправленных актов у крыс / А.В. Котов, С.М. Толпыго, Е.И. Певцова // Наркология. — 2003. — № 11. — С. 6.

16. Котов, А.В. Психофизиологический базис становления аддиктивных форм поведения / А.В. Котов // Нейрокомпьютеры: разработка, применение. — 2012. — № 1. — С. 9-22.

17. Крупицкий, Е.М. Применение различных лекарственных форм налтрексона для лечения зависимости от опиатов / Е.М. Крупицкий, Э.Э. Звартау, Е.А. Блохина [и др.] // Вопросы наркологии. — 2017. — № 4-5. — С. 113-128.

18. Лебедев, А.А. Участие прилежащего ядра в механизмах формирования условного предпочтения места у крыс / А.А. Лебедев, Е.Г. Шумилов, А.А. Смирнов [и др.] // Научные труды IV Съезда физиологов СНГ. — М.: Медицина-Здоровье, 2014. — С. 44.

19. Морозов, В.И. Система расширенной миндалины как мишень действия аддиктивных средств / В.И. Морозов, А.А. Лебедев, Р.О. Роик [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2015. — Т. 13, № S1. — С. 110-112.

20. Панченко, Л.Ф. Роль опиоидных рецепторов в патогенезе наркомании и алкоголизма / Л.Ф. Панченко, С.К. Судаков, К.Г. Гуревич // Руководство по наркологии под редакцией член корр. РАМН, проф.Н.Н. Иванца. — Москва, 2002. — С. 42-61.

21. Проскурякова, Т.В. Активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в условиях однократного и хронического действия психоактивных веществ и в период их отмены / Т.В. Проскурякова, И.М. Шамакина, В.А. Шохонова [и др.] // Наркология. — 2017. — Т. 16, № 10(190). — С. 84-98.

22. Роик, Р.О. Нейромедиаторные и гормональные механизмы реализации подкрепляющих эффектов аддиктивных средств / Р.О. Роик, А.А. Лебедев, В.И. Морозов [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2015. — Т. 13, № S1. — С. 144-147.

23. Роик, Р.О. Условное предпочтение места определяется положительными подкрепляющими гамк-, дофамин- и опиоидергическими механизмами прилежащего ядра / Р.О. Роик, А.А. Лебедев, Е.Г. Шумилов [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. — 2014. — Т. 13, № 2. — С. 5-14.

24. Судаков, С.К. Влияние периферических m-, d- и k-опиоидных лигандов на формирование толерантности к анальгетическому действию этанола / С.К. Судаков, Е.В. Алексеева, Г.А. Назарова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2017. — Т. 163, № 2. — С. 136-139.

25. Судаков, С.К. Физиология и фармакология положительного подкрепления / С.К. Судаков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2018. — Т. 166, № 12. — С. 664-669.

26. Судаков, С.К. Центральная и периферическая мю-опиоидная система в механизмах эмоционального стресса / С.К. Судаков, В.Г. Башкатова, А.А. Колпаков [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2011. — № 3. — С. 3-6.

27. Тригуб, М.М. Влияние агонистов опиоидных рецепторов периферического действия на депрессивный эффект этанола / М.М. Тригуб, Н.Г. Богданова, А.А. Колпаков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 156, № 12. — С. 741-744.

28. Трусова, А.В. Индукция аддиктивного влечения: экспериментальная парадигма и дизайн исследования / А.В. Трусова, А.А. Березина, С.Г. Климанова [и др.] // Вопросы наркологии. — 2018. — № 9(169). — С. 43-59.

29. Цой-Подосенин, М.В. Функционирование "системы награды" у больных с зависимостью от психоактивных веществ / М.В. Цой-Подосенин, Е.М. Крупицкий, Е.В. Вербицкая [и др.] // Обозрение психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева. — 2009. — № 1. — С. 83-88.

30. Шабанов, П.Д. Участие прилежащего ядра в механизмах условного подкрепления у крыс / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев, М.В. Шевелева // Наркология. — 2014. — Т. 13, № 7(151). — С. 52-59.

31. Шамакина, И.Ю. Регуляция функций дофаминовой системы агонистами дофаминовых рецепторов: опыт неврологии при разработке препаратов для лечения алкогольной зависимости / И.Ю. Шамакина, Т.В. Проскурякова, П.К. Анохин [и др.] // Вопросы наркологии. — 2017. — № 8(156). — С. 172-173.

32. Шевелева, М.В. Нейробиологические механизмы систем награды и наказания в головном мозге при активации прилежащего ядра / М.В. Шевелева, А.А. Лебедев, Р.О. Роик [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2013. — Т. 11, № 3. — С. 3-19.

33. Aalto, S. Intravenous ethanol increases dopamine release in the ventral striatum in humans: PET study using bolus-plus-infusion administration of [(11)C]raclopride / S. Aalto, K. Ingman, K. Alakurtti [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. — 2015. — Vol. 35(3). — P. 424-431.

34. Acri, J. B. Modulation of pre- and postsynaptic dopamine D2 receptor function by the selective kappa-opioid receptor agonist U69593 / J. B. Acri, A. C. Thompson, T. Shippenberg // Synapse. — 2001. — Vol. 39, № 4. — P. 343-350.

35. Ahlenius, S. Antagonism by alpha methyltyrosine of the ethanol-induced stimulation and euphoria in man / S. Ahlenius [et al.] // Clinical Pharmacology & Therapeutics. — 1973. — Vol. 14, № 4 (part 1). — P. 586-591.

36. Alcohol [Electronic resource] // Who.int. — 2019. — Mode of access: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/alcohol.

37. Al-Hasani, R. Distinct subpopulations of nucleus accumbens dynorphin neurons drive aversion and reward / R. Al-Hasani [et al.] // Neuron. — 2015. — Vol. 87, № 5. — P. 1063-1077.

38. Alongkronrusmee, D. Delta Opioid Pharmacology in Relation to Alcohol Behaviors / D. Alongkronrusmee, T. Chiang, R.M. van Rijn // Handb Exp Pharmacol. — 2018. — Vol. 247. — P. 199-225.

39. Andero, R. Amygdala-dependent fear is regulated by Oprl1 in mice and humans with PTSD / R. Andero [et al.] // Sci Transl Med. — 2013. — Vol. 5(188). — P. 188ra73.

40. Andero, R. Nociceptin and the nociceptin receptor in learning and memory / R. Andero // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. — 2015. — Vol. 62. — P. 45-50.

41. Anderson, R. I. Role of the dynorphin/kappa opioid receptor system in the motivational effects of ethanol / R. I. Anderson, H. C. Becker // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2017. — Vol. 41, № 8. — P. 1402-1418.

42. Arias, C. Differential role of mu, delta and kappa opioid receptors in ethanol-mediated locomotor activation and ethanol intake in preweanling rats / C. Arias, J.C. Molina, N.E. Spear // Physiol Behav. — 2010. — Vol. 3, № 99(3). — P. 348-354.

43. Attilia, F. Interdisciplinary Study Group CRARL — SITAC — SIPaD — SITD — SIPDip. Pharmacological treatment of alcohol use disorder. Scientific evidence / F. Attilia [et al.] // Riv Psichiatr. — 2018. — Vol. 53(3). — P. 123-127.

44. Aziz, A. M. A. The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist SR-8993 as a candidate therapeutic for alcohol use disorders: validation in rat models / A. M. A. Aziz [et al.] // Psychopharmacology. — 2016. — Vol. 233, № 19-20. — P. 3553-3563.

45. Baek, M. N. Artificial microRNA-based neurokinin-1 receptor gene silencing reduces alcohol consumption in mice / M.N. Baek [et al.] // Neurosci Lett. — 2010. — Vol. 475. — P. 124-128.

46. Baik, J. H. Dopamine signaling in reward-related behaviors / J. H. Baik // Frontiers in neural circuits. — 2013. — Vol. 7. — P. 152.

47. Bailey, A. Preprodynorphin mediates locomotion and D2 dopamine and μ-opioid receptor changes induced by chronic ‘binge’ cocaine administration / A. Bailey [et al.] // Journal of neurochemistry. — 2007. — Vol. 102, № 6. — P. 1817-1830.

48. Bailey, C. P. Alterations in mesolimbic dopamine function during the abstinence period following chronic ethanol consumption / C. P. Bailey [et al.] // Neuropharmacology. — 2001. — Vol. 41, № 8. — P. 989-999.

49. Bardo, M.T. Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? / M.T. Bardo, R.A. Bevins // Psychopharmacology (Berl.). — 2000. — Vol. 153. — P. 31-43.

50. Bazov, I. Dynorphin and κ-opioid receptor dysregulation in the dopaminergic reward system of human alcoholics / I. Bazov [et al.] // Molecular neurobiology. — 2018. — Vol. 55, № 8. — P. 7049-7061.

51. Beardsley, P.M. Effectiveness of analogs of the kappa opioid receptor antagonist (3R)-7-hydroxy-N-((1S)-1-{[(3R, 4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3, 4-dimethyl-1-piperidinyl] methyl}-2-methylpropyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-3-isoquinolinecarboxamide (JDTic) to reduce U50, 488-induced diuresis and stress-induced cocaine reinstatement in rats / P. M. Beardsley [et al.] // Psychopharmacology. — 2010. — Vol. 210, № 2. — P. 189-198.

52. Beaulieu, J.M. Dopamine receptors–IUPHAR review 13 / J. M. Beaulieu, S. Espinoza, R. R. Gainetdinov // British journal of pharmacology. — 2015. — Vol. 172, № 1. — P. 1-23.

53. Beaumont, T.L. Layer-specific CREB target gene induction in human neocortical epilepsy / T.L. Beaumont [et al.] // J Neurosci. — 2012. — Vol. 32(41). — P. 14389-14401

54. Bell, R.L. Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders / R. L. Bell [et al.] //Neuropharmacology. — 2017. — Vol. 122. — P. 201-243.

55. Ben Hamida, S. Mu opioid receptors in GABAergic neurons of the forebrain promote alcohol reward and drinking / S. Ben Hamida [et al.] // Addict Biol. — 2019. — Vol. 24(1). — P. 28-39.

56. Bencherif, B. Mu-opioid receptor binding measured by [11C]carfentanil positron emission tomography is related to craving and mood in alcohol dependence / B. Bencherif [et al.] // Biol Psychiatry. — 2004. — Vol. 55(3). — P. 255-262.

57. Berger, A.L. Affective cue-induced escalation of alcohol self-administration and increased 22-kHz ultrasonic vocalizations during alcohol withdrawal: role of kappa-opioid receptors / A.L. Berger et al. // Neuropsychopharmacology. — 2013. — Vol. 38, № 4. — P. 647-654.

58. Berrendero, F. Influence of δ-opioid receptors in the behavioral effects of nicotine / F. Berrendero [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2012. — Vol. 37(10). — P. 2332-2344.

59. Berrettini, W. Alcohol addiction and the mu-opioid receptor / W. Berrettini // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. — 2016. — Vol. 65. — P. 228-233.

60. Bertran-Gonzalez, J. Learning-related translocation of δ-opioid receptors on ventral striatal cholinergic interneurons mediates choice between goal-directed actions / J. Bertran-Gonzalez [et al.] // J Neurosci. — 2013. — Vol. 33(41). — P. 16060-16071.

61. Best, L.M. Novel In Vivo Investigation of the Brain Nociceptin/Orphanin FQ System in Alcohol Use Disorder: Are There Lessons From a Negative

Neuroimaging Study? / L. M. Best, I. Boileau] // Biological Psychiatry. — 2018. — Vol. 84(10). — P. 704-705.

62. Bilbao, A. CREB activity in dopamine D1 receptor expressing neurons regulates cocaine-induced behavioral effects / A. Bilbao [et al.] // Front Behav Neurosci. — 2014. — Vol. 8. — P. 212.

63. Boileau, I. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens / I. Boileau [et al.] // Synapse. — 2003. — Vol. 49(4). — P.226-231.

64. Bruchas, M.R. The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors / M. R. Bruchas, B. B. Land, C. Chavkin // Brain research. — 2010. — Vol. 1314. — P. 44-55.

65. Carlezon, Jr.W.A. Depressive-like effects of the kappa-opioid receptor agonist salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats / Jr. W. A. Carlezon [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. — 2006. — Vol. 316. — P. 440-447.

66. Carlezon, Jr.W.A. Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation / Jr W. A. Carlezon, E. H. Chartoff // Nature protocols. — 2007. — Vol. 2, № 11. — P. 2987-2995.

67. Carlezon, Jr.W.A. Kappa-Opioid Antagonists for Psychiatric Disorders: From Bench to Clinical Trials / Jr. W. A. Carlezon, A. D. Krystal // Depression and anxiety. — 2016. — Vol. 33, № 10. — P. 895-906.

68. Carnicella, S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse / S. Carnicella, D. Ron, S. Barak // Alcohol. — 2014. — Vol. 48, № 3. — P. 243-252.

69. Castrén, S. Selecting an appropriate alcohol pharmacotherapy: review of recent findings / S. Castrén, N. Mäkelä, H. Alho // Curr Opin Psychiatry. — 2019. — Vol. 32(4). — P. 266-274.

70. Chang, G.Q. Effect of chronic ethanol on enkephalin in the hypothalamus and extra-hypothalamic areas / G. Q. Chang [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2010. — Vol. 34, № 5. — P. 761-770.

71. Chappell, P.B. Neuroendocrine and behavioral effects of the selective kappa agonist spiradoline in Tourette's syndrome: a pilot study / P. B. Chappell [et al.] // Psychiatry research. — 1993. — Vol. 47, № 3. — P. 267-280.

72. Chefer, V.I. Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice / V.I. Chefer, T.S. Shippenberg // Neuropsychopharmacology. — 2009. — Vol. 34(4). — P. 887-898.

73. Chen, Y. Dynorphin peptides differentially regulate the human κ opioid receptor / Y. Chen, C. Chen, L. Y. Liu-Chen // Life sciences. — 2007. — Vol. 80, № 15. — P. 1439-1448.

74. Chou, T.C. Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin / T.C. Chou [et al.] // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. — 2001. — № 21. — P. RC168.

75. Ciccocioppo, R. Buprenorphine reduces alcohol drinking through activation of the nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor system / R. Ciccocioppo [et al.] // Biological psychiatry. — 2007. — Vol. 61, № 1. — P. 4-12.

76. Ciccocioppo, R. Chronic treatment with novel brain-penetrating selective NOP receptor agonist MT-7716 reduces alcohol drinking and seeking in the rat / R. Ciccocioppo [et al.] // Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. — 2014. — Vol. 39. — P. 2601-2610

77. Ciccocioppo, R. Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats / R. Ciccocioppo [et al.] // Psychopharmacology. — 1999. — Vol. 141, № 2. — P. 220-224.

78. Ciccocioppo, R. Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of alcoholism / R. Ciccocioppo [et al.] // Addiction biology. — 2006. — Vol. 11, № 3-4. — P. 339-355.

79. Ciccocioppo, R. Nociceptin/orphanin FQ acts as a functional antagonist of corticotropin-releasing factor to inhibit its anorectic effect / R. Ciccocioppo [et al.] // Physiology & behavior. — 2004. — Vol. 82, № 1. — P. 63-68.

80. Ciccocioppo, R. NOP-Related Mechanisms in Substance Use Disorders / R. Ciccocioppo [et al.] // Handb Exp Pharmacol. — 2019. — Vol. 254. — P. 187-212.

81. Ciccocioppo. R. Genetically selected alcohol preferring rats to model human alcoholism / R. Ciccocioppo [et al.] // Curr Top BehavNeurosci. — 2013. — Vol. 13. — P. 251-269.

82. Collins, L.M. Nociceptin/Orphanin FQ Inhibits the Survival and Axon Growth of Midbrain Dopaminergic Neurons Through a p38-MAPK Dependent Mechanism / L.M. Collins [et al.] // Mol Neurobiol. — 2016. — Vol. 53(10). — P. 7284-7297.

83. Contarino, A. The corticotropin-releasing factor receptor-1 pathway mediates the negative affective states of opiate withdrawal / A. Contarino, F. Papaleo // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2005. — Vol. 102(51). — P. 18649-18654.

84. Cox, B.M. Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9 / B. M. Cox [et al.] // British journal of pharmacology. — 2015. — Vol. 172, № 2. — P. 317-323.

85. Crabbe, J.C. Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice / J.C. Crabbe [et al.] // Addict Biol. — 2006. — Vol. 11. — P. 195-269.

86. Crabbe, J.C. Human and laboratory rodent low response to alcohol: is better consilience possible? / J.C. Crabbe, R.L. Bell, C.L. Ehlers // Addict Biol. — 2010. — Vol. 15(2). — P. 125-144.

87. Cui, Y. Targeted expression of μ-opioid receptors in a subset of striatal direct-pathway neurons restores opiate reward / Y Cui. [et al.] // Nat Neurosci. — 2014/ — Vol. 17(2). — P. 254-261.

88. D'Addario, C. Different alcohol exposures induce selective alterations on the expression of dynorphin and nociceptin systems related genes in rat brain / C. D'Addario [et al.] // Addiction biology. — 2013b. — Vol. 18, № 3. — P. 425-433.

89. D'Addario, C. Ethanol induces epigenetic modulation of prodynorphin and pronociceptin gene expression in the rat amygdala complex / C. D'Addario [et al.] // Mol Neurosci. — 2013a. — Vol. 49(2). — P. 312-319.

90. Daunais, J.B. The effects of D1 or D2 dopamine receptor blockade on zif/268 and preprodynorphin gene expression in rat forebrain following a short-term cocaine binge / J.B. Daunais, J. F. McGinty // Molecular brain research. — 1996. — Vol. 35, № 1-2. — P. 237-248.

91. David, V. Brain regional Fos expression elicited by the activation of mu- but not delta-opioid receptors of the ventral tegmental area: evidence for an implication of the ventral thalamus in opiate reward / V. David [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2008. — Vol. 33(7). — P. 1746-1759.

92. Dawson, D.A. Rates and correlates of relapse among individuals in remission from DSM-IV alcohol dependence: a 3-year follow-up / D. A. Dawson, R. B. Goldstein, B. F. Grant // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2007. — Vol. 31, № 12. — P. 2036-2045.

93. de Guglielmo, G. Cebranopadol blocks the escalation of cocaine intake and conditioned reinstatement of cocaine seeking in rats / G. De Guglielmo [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2017. — Vol. 362, № 3. — P. 378-384.

94. De Guglielmo, G. Inactivation of a CRF-dependent amygdalofugal pathway reverses addiction-like behaviors in alcohol-dependent rats / G. De Guglielmo [et al.] // Nat Commun. — 2019. — Vol. 10(1). — P. 1238.

95. De Kloet, E.R. Stress and the brain: from adaptation to disease / E. R. De Kloet, M. Joëls, F. Holsboer // Nature reviews neuroscience. — 2005. — Vol. 6, № 6. — P. 463-475.

96. De Mei, C. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors / C. De Mei [et al.] // Current opinion in pharmacology. — 2009. — Vol. 9,– № 1. — P. 53-58.

97. De Waele, J.P. Characterization of the mu and delta opioid receptors in the brain of the C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption / J.P. De Waele, C. Gianoulakis // Alcohol Clin Exp Res. — 1997. — Vol. 21(4). — P. 754-762.

98. Del Arbol, J.L. Plasma concentrations of beta-endorphins in the children of alcoholic patients / J.L. Del Arbol [et al.] // An Med Interna. — 2007. — Vol. 24(6). — P. 273-277.

99. Devine, D.P. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies / D. P. Devine [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 1993. — Vol. 266, № 3. — P. 1236-1246.

100. Devine, D.P. The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion / D. P. Devine [et al.] // Brain research. — 1996. — Vol. 727, № 1-2. — P. 225-229.

101. Di Benedetto, M. Alterations of N/OFQ and NOP receptor gene expression in the substantia nigra and caudate putamen of MPP+ and 6-OHDA lesioned rats / M. di Benedetto [et al.] // Neuropharmacology. — 2009. — Vol. 56, № 4. — P. 761-767.

102. Di Chiara, G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction / G. Di Chiara // Behav Brain Res. — 2002. — Vol. 137(1-2). — P. 75-114.

103. Diana, M. Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence / M. Diana [et al.] // Neuroscience. — 1996. — Vol. 71, № 2. — P. 411-415.

104. Diana, M. Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence / M. Diana [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1993. — Vol. 90, № 17. — P. 7966-7969.

105. Drago, J. D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum / J. Drago [et al.] // Neuroscience. — 1996. — Vol. 74, № 3. — P. 813-823.

106. Dreborg, S. Evolution of vertebrate opioid receptors / S. Dreborg [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2008. — Vol. 105, № 40. — P. 15487-15492.

107. Dunn, A.J. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? / A. J. Dunn, C. W. Berridge // Brain research reviews. — 1990. — Vol. 15, № 2. — P. 71-100.

108. Economidou, D. Activation of brain NOP receptors attenuates acute and protracted alcohol withdrawal symptoms in the rat / D Economidou. [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2011. — Vol. 35, № 4. — P. 747-755.

109. Economidou, D. Dysregulation of nociceptin/orphanin FQ activity in the amygdala is linked to excessive alcohol drinking in the rat / D. Economidou [et al.] // Biological psychiatry. — 2008. — Vol. 64, № 3. — P. 211-218.

110. Economidou, D. Effect of novel nociceptin/orphanin FQ–NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats / D. Economidou [et al.] // Peptides. — 2006. — Vol. 27, № 12. — P. 3299-3306.

111. Erbs, E. A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks / Erbs E. [et al.] // Brain Struct Funct. — 2015. — Vol. 220(2). — P. 677-702.

112. Eriksson, K. Genetic selection for voluntary alcohol consumption in the albino rat / K. Eriksson // Science. — 1968. — Vol. 159. — P. 739-741.

113. Fagergren, P. Temporal upregulation of prodynorphin mRNA in the primate striatum after cocaine self-administration / P. Fagergren [et al.] // European Journal of Neuroscience. — 2003. — Vol. 17, № 10. — P. 2212-2218.

114. Fioravanti, B. The ORL-1 receptor system: are there opportunities for antagonists in pain therapy? / B. Fioravanti, T. W. Vanderah // Current topics in medicinal chemistry. — 2008. — Vol. 8, № 16. — P. 1442-1451.

115. Font, L. Involvement of the endogenous opioid system in the psychopharmacological actions of ethanol: the role of acetaldehyde / L. Font, M.Á. Luján, R. Pastor // Front Behav Neurosci. — 2013. — Vol. 7. — P. 93.

116. Foord, S. M. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list / S. M. Foord [et al.] // Pharmacological reviews. — 2005. — Vol. 57, № 2. — P. 279-288.

117. Ford, C.P. Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location / C.P. Ford, G.P. Mark, J.T. Williams // J Neurosci. — 2006. — Vol. 26(10). — P. 2788-2797.

118. Francis, T.C. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression / T.C. Francis, M.K Lobo. // Biol Psychiatry. — 2017. — Vol. 81(8). — P. 645-653.

119. Funk, D. The role of kappa opioid receptors in stress-induced reinstatement of alcohol seeking in rats / D. Funk, K. Coen, A. D. Lê // Brain and behavior. — 2014. — Vol. 4, № 3. — P. 356-367.

120. Gavioli, E.C. Nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists as innovative antidepressant drugs / E. C. Gavioli [et al.] // Pharmacology & therapeutics. — 2013. — Vol. 140, № 1. — P. 10-25.

121. Gavioli, E.C. NOP Ligands for the Treatment of Anxiety and Mood Disorders / E.C. Gavioli, V.A.D. Holanda, C. Ruzza // Handb Exp Pharmacol. — 2019. — Vol. 254. — P. 233-257.

122. George, D.T. Neurokinin 1 receptor antagonism as a possible therapy for alcoholism / D.T. George [et al.] // Science. — 2008. — Vol. 319. — P. 1536-1539.

123. Gibula-Bruzda, E. The influence of the new enkephalin derivative, cyclo[N(ε),N(β)-carbonyl-d-Lys(2),Dap(5)] enkephalinamide (cUENK6), on reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in rats / E. Gibula-Bruzda [et al.] // Physiol Behav. — 2015. — Vol. 145. — P. 50-56.

124. Gilman, S. Decreased striatal monoaminergic terminals in severe chronic alcoholism demonstrated with (+)[11C]dihydrotetrabenazine and positron emission tomography / S. Gilman [et al.] // Ann Neurol. — 1998. — Vol. 44(3). — P. 326-333.

125. Gilpin, N.W. Kappa opioid receptor activation decreases inhibitory transmission and antagonizes alcohol effects in rat central amygdala / N. W. Gilpin [et al.] // Neuropharmacology. — 2014. — Vol. 77. — P. 294-302.

126. Gilpin, N.W. Neurobiology of Alcohol Dependence. Focus on Motivational Mechanisms / N.W. Gilpin, G.F. Koob // Alcohol Res Health. — 2008. — Vol. 31, № 3 — P. 185-195.

127. Glick, S.D. Kappa opioid inhibition of morphine and cocaine self-administration in rats / S. D. Glick [et al.] // Brain research. — 1995. — Vol. 681. — № 1-2. — P. 147-152.

128. Green, A.S. Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? / A.S. Green, N.J. Grahame // Alcohol. — 2008. — Vol. 42, № 1. — P.1-11.

129. Guerri, C. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence / C. Guerri, M. Pascual // Alcohol. — 2010. — Vol. 44. — P. 15-26.

130. Hansson, A.C. Dopamine and opioid systems adaptation in alcoholism revisited: Convergent evidence from positron emission tomography and post mortem studies / A.C. Hansson [et al.] // Neurosci Biobehav Rev. — 2018.

131. Heinz, A. Correlation between dopamine D2 receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving / A. Heinz [et al.] // Am J Psychiatry. — 2004. — Vol. 161(10). — P. 1783-1789.

132. Heinz, A. Correlation of alcohol craving with striatal dopamine synthesis capacity and D2/3 receptor availability: a combined [18F]DOPA and [18F]DMFP PET study in detoxified alcoholic patients / A. Heinz [et al.] // Am J Psychiatry. — 2005b. — Vol. 162(8). — P. 1515-1520.

133. Heinz, A. Correlation of stable elevations in striatal mu-opioid receptor availability in detoxified alcoholic patients with alcohol craving: a positron emission tomography study using carbon 11-labeled carfentanil / A. Heinz [et al.] // Arch Gen Psychiatry. — 2005a. — Vol. 62(1). — P. 57-64.

134. Heinz, A. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum / A. Heinz [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2000. — Vol. 22(2). — P. 133-139.

135. Hermann, D. Low mu-Opioid Receptor Status in Alcohol Dependence Identified by Combined Positron Emission Tomography and Post-Mortem Brain Analysis / D. Hermann [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2017. — Vol. 42(3). — P. 606.

136. Hirth, N. Convergent evidence from alcohol-dependent humans and rats for a hyperdopaminergic state in protracted abstinence / N. Hirth [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2016. — Vol. 113, № 11. — P. 3024-3029.

137. Hjelmstad, G.O. Kappa opioid receptor inhibition of glutamatergic transmission in the nucleus accumbens shell / G. O. Hjelmstad, H. L. Fields // Journal of Neurophysiology. — 2001. — Vol. 85, № 3. — P. 1153-1158.

138. Hoffman, P.L. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1 / P.L. Hoffman [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 1995. — Vol. 19. — P. 721-726.

139. Holgate, J.Y. A rat drinking in the dark model for studying ethanol and sucrose consumption / J. Y. Holgate [et al.] // Frontiers in behavioral neuroscience. — 2017. — Vol. 11. — P. 29.

140. Hölter, S. M. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats / S. M. Hölter [et al.] // Psychopharmacology. — 2000. — Vol. 153, № 1. — P. 93-102.

141. Hurd, Y.L. Prodynorphin mRNA expression is increased in the patch vs matrix compartment of the caudate nucleus in suicide subjects / Y. L. Hurd [et al.] // Molecular psychiatry. — 1997. — Vol. 2, № 6. — P. 495-500.

142. Ingman, K. Selective delta-opioid receptor antagonist N,N(CH3)2-Dmt-Tic-OH does not reduce ethanol intake in alcohol-preferring AA rats / K. Ingman [et al.] // Addict Biol. — 2003. — Vol. 8(2). — P. 173-179.

143. Jin, C. Effects of 8 different NR1 splice variants on the ethanol inhibition of recombinant NMDA receptors / C. Jin, J.J. Woodward // Alcohol Clin. Exp. Res. — 2006. — Vol. 30. — P. 673-679.

144. Johnson, B.A. Improvement of physical health and quality of life of alcohol-dependent individuals with topiramate treatment: US multisided randomized controlled trial / B.A. Johnson [et al.] // Arch Intern Med. — 2008. — Vol. 168. — P. 1188-1199.

145. Jones, M.R. The emerging therapeutic roles of κ-opioid agonists / M. R. Jones [et al.] // Journal of opioid management. — 2016. — Vol. 12, № 2. — P. 101-107.

146. Kallupi, M. Genetic deletion of the nociceptin/orphanin FQ receptor in the rat confers resilience to the development of drug addiction / M. Kallupi [et al.] // Neuropsychopharmacol. — 2017. — № 42. — P. 695-706.

147. Kallupi, M. Nociceptin/orphanin FQ decreases glutamate transmission and blocks ethanol-induced effects in the central amygdala of naive and ethanol-dependent rats / M. Kallupi [et al.] // Neuropsychopharmacol. — 2014. — № 39. — P. 1081-1092.

148. Kang-Park, M. Interaction of CRF and kappa opioid systems on GABAergic neurotransmission in the mouse central amygdale / M. Kang-Park [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. — 2015. — Vol. 355(2). — P. 206-211.

149. Kang-Park, M. κ-Opioid receptors in the central amygdala regulate ethanol actions at presynaptic GABAergic sites / M. Kang-Park [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. — 2013. — № 346(1). — P. 130-137.

150. Karkhanis, A. Dynorphin/kappa opioid receptor signaling in preclinical models of alcohol, drug, and food addiction / A. Karkhanis, K. M. Holleran, S. R Jones // International review of neurobiology. — Academic Press, 2017. — Vol. 136. — P. 53-88.

151. Katner, S.N. Neurochemical characteristics associated with ethanol preference in selected alcohol-preferring and-nonpreferring rats: a quantitative microdialysis study / S. N. Katner, F. Weiss // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2001. — Vol. 25, № 2. — P. 198-205.

152. Khan, M.S. A systematic review of the role of the nociceptin receptor system in stress, cognition, and reward: relevance to schizophrenia / M. S. Khan [et al.] // Translational psychiatry. — 2018. — Vol. 8, № 1. — P. 38.

153. Kivell, B. Salvinorin A regulates dopamine transporter function via a kappa opioid receptor and ERK1/2-dependent mechanism / B. Kivell [et al.] // Neuropharmacology. — 2014. — Vol. 86. — P. 228-240.

154. Knoll, A.T. Anxiolytic-like effects of κ-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats / A. T. Knoll [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2007. — Vol. 323, № 3. — P. 838-845.

155. Knoll, A.T. Dynorphin, stress, and depression / A. T. Knoll, Jr W. A. Carlezon // Brain research. — 2010. — Vol. 1314. — P. 56-73.

156. Kononenko, O. Intra-and interregional coregulation of opioid genes: broken symmetry in spinal circuits / O. Kononenko [et al.] // The FASEB Journal. — 2017. — Vol. 31, № 5. — P. 1953-1963.

157. Koob, G. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence / G. Koob, M. J. Kreek // American Journal of Psychiatry. — 2007. — Vol. 164, № 8. — P. 1149-1159.

158. Koob, G.F. Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder / G. F. Koob // Frontiers in psychiatry. — 2013. — Vol. 4. — P. 72.

159. Koob, G.F. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis / G. F. Koob, M. Le Moal // Neuropsychopharmacology. — 2001. — Vol. 24, № 2. — P. 97-129.

160. Koob, G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways / G.F. Koob // Trends Pharmacol Sci. — 1992. — Vol. 13(5). — P. 177-184.

161. Koob, G.F. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis / G.F. Koob, N.D. Volkow // Lancet Psychiatry. — 2016. — Vol. 3(8). — P. 760-773.

162. Koob, G.F. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis / G. F. Koob // Addiction. — 2006. — Vol. 101. — P. 23-30.

163. Korotkova, T.M. Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of the rat / T.M. Korotkova [et al.] // Eur J Neurosci. — 2006. — Vol. 23. — P. 2677-2685.

164. Kranzler, H.R. Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review / H.R. Kranzler, M. Soyka // JAMA. — 2018. — Vol. 320(8). — P. 815-824.

165. Kreibich, A. Presynaptic inhibition of diverse afferents to the locus ceruleus by κ-opiate receptors: a novel mechanism for regulating the central norepinephrine system / A. Kreibich [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2008. — Vol. 28, № 25. — P.6516-6525.

166. Kuzmin, A. Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice: effects of opioid receptor-like 1 receptor agonists and naloxone / A. Kuzmin // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2003. — Vol. 304, № 1. — P. 310-318.

167. Kuzmin, A. Expression of pronociceptin and its receptor is downregulated in the brain of human alcoholics / A. Kuzmin [et al.] // Brain Res. — 2009. — Vol. 1305. — P. S80-S85.

168. Kuzmin, A. The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist Ro 64-6198 reduces alcohol self-administration and prevents relapse-like alcohol drinking / A. Kuzmin [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2007. — Vol. 32, № 4. — P. 902-910.

169. Lai, C.C. Acute tolerance to ethanol inhibition of NMDA-induced responses in rat rostral ventrolateral medulla neurons / C.C. Lai, M.C. Chang, H.H. Lin // J Biomed Sci. — 2004. — Vol. 11. — P. 482-492.

170. Laine, T.P. Dopamine transporter availability and depressive symptoms during alcohol withdrawal / T.P. Laine [et al.] // Psychiatry Res. — 1999a. — Vol. 90(3). — P. 153-157.

171. Laine, T.P. Dopamine transporters increase in human brain after alcohol withdrawal / T.P. Laine [et al.] // Mol Psychiatry. — 1999b. — Vol. 4(2). — P. 189-191.

172. Lalanne, L. The kappa opioid receptor: from addiction to depression, and back / L. Lalanne [et al.] // Frontiers in psychiatry. — 2014. — Vol. 5. — P. 170.

173. Lam, M.P. Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study / M. P. Lam [et al.] // Psychopharmacology. — 2008. — Vol. 201, № 2. — P. 261-271.

174. Lange, J.E. Salvia divinorum: effects and use among YouTube users / J. E. Lange [et al.] // Drug and alcohol dependence. — 2010. — Vol. 108, № 1-2. — P. 138-140.

175. Larhammar, D. Early duplications of opioid receptor and peptide genes in vertebrate evolution / D. Larhammar [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. — 2009. — Vol. 1163, № 1. — P. 451-453.

176. Laruelle, M. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects / M. Laruelle [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1996. — Vol. 93(17). — P. 9235-9240.

177. Laurent, V. The role of opioid processes in reward and decision-making / V. Laurent, A.K. Morse, B.W. Balleine // Br J Pharmacol. — 2015. — Vol. 172(2). — P. 449-459.

178. Le Merrer, J. Cues predicting drug or food reward restore morphine-induced place conditioning in mice lacking delta opioid receptors / J. Le Merrer [et al.] // Psychopharmacology (Berl). — 2012. — Vol. 223(1). — P. 99-106.

179. Le Merrer, J. Deletion of the δ opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement / J. Le Merrer [et al.] // Biol Psychiatry. — 2011. — Vol. 69(7). — P. 700-703.

180. Le Merrer, J. Impaired hippocampus-dependent and facilitated striatum-dependent behaviors in mice lacking the δ opioid receptor / J. Le Merrer [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2013. — Vol. 38(6). — P. 1050-1059.

181. Le, A. Neurobiology of relapse to alcohol in rats / A. Le, Y. Shaham // PharmacolTher. — 2002. — Vol. 94. — P. 137-156.

182. Lester, D. Criteria for an animal model of alcoholism / D. Lester, E.X. Freed // Pharmacol Biochem Behav. — 1973. — №1103. — P.107.

183. Levenson, J. M. Epigenetic mechanisms in memory formation / J.M. Levenson, J.D. Sweatt // Nat Rev Neurosci. — 2005. — Vol. 6. — P. 108-118.

184. Lewohl, J. M. Gene expression in human alcoholism. — P. microarray analysis of frontal cortex / J.M. Lewohl [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2000. — Vol. 24. — P. 1873-1882.

185. Lindholm, S. Repeated ethanol administration induces short-and long-term changes in enkephalin and dynorphin tissue concentrations in rat brain / S. Lindholm [et al.] // Alcohol. — 2000. — Vol. 22, № 3. — P. 165-171.

186. Lindholm, S. The selective κ-opioid receptor agonist U50, 488H attenuates voluntary ethanol intake in the rat / S. Lindholm [et al.] // Behavioural brain research. — 2001. — Vol. 120, № 2. — P. 137-146.

187. Lindman, R.E. Expectations of alcohol-induced positive affect: a cross-cultural comparison / R.E. Lindman, B.A. Sjoholm, A.R. Lang // J Stud Alcohol. — 2000. — Vol. 61(5). — P. 681-687

188. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. — 2001. — Vol. 25, № 4. — P. 402-408.

189. Lobo, I.A. GABA(A) receptors and alcohol / I.A. Lobo, R.A. Harris // Pharmacol Biochem Behav. — 2008. — Vol. 90(1). — P. 90-94.

190. Logrip, M.L. Blockade of ethanol reward by the kappa opioid receptor agonist U50, 488H / M. L. Logrip, P. H. Janak, D. Ron // Alcohol. — 2009. — Vol. 43, № 5. — P. 359-365.

191. Lohith, T.G. Brain and whole-body imaging of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor in humans using the PET ligand 11C-NOP-1A / T. G. Lohith [et al.] // Journal of Nuclear Medicine. — 2012. — Vol. 53, № 3. — P. 385-392.

192. Lutfy, K. The Nociceptin Receptor as an Emerging Molecular Target for Cocaine Addiction / K. Lutfy, N.T. Zaveri // Prog Mol Biol Transl Sci. — 2016. — Vol. 137. — P. 149-181.

193. Ma, J. Dynorphinergic GABA neurons are a target of both typical and atypical antipsychotic drugs in the nucleus accumbens shell, central amygdaloid nucleus and thalamic central medial nucleus / J. Ma // Neuroscience. — 2003. — Vol. 121, № 4. — P. 991-998.

194. Mague, S.D. Antidepressant-like effects of κ-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats / S. D. Mague // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2003. — Vol. 305, № 1. — P. 323-330.

195. Marchant, N.J. Co-expression of prodynorphin and corticotrophin-releasing hormone in the rat central amygdala: evidence of two distinct endogenous opioid systems in the lateral division / N. J. Marchant, V. S. Densmore, P. B. Osborne // Journal of Comparative Neurology. — 2007. — Vol. 504, № 6. — P. 702-715.

196. Mardones, J. Heredity of experimental alcohol preference in rats. II. Coefficient of heredity / J. Mardones, N. Segovia, A. Hederra // Q J Stud Alcohol. — 1953. — Vol. 14. — P. 1–2.

197. Margolis, E.B. Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex / E. B. Margolis [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2006. — Vol. 103, № 8. — P. 2938-2942.

198. Marinelli, P.W. A microdialysis profile of dynorphin A1–8 release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration / P. W. Marinelli [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2006. — Vol. 30, № 6. — P. 982-990.

199. Marinelli, P.W. A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration / P.W. Marinelli, L. Bai, R. Quirion // Alcohol Clin Exp Res. — 2005. — Vol. 29(10). — P. 1821-1828.

200. Marquez, P. The endogenous OFQ/N/ORL-1 receptor system regulates the rewarding effects of acute cocaine / P. Marquez [et al.] // Neuropharmacology. — 2008a. — Vol. 54, № 3. — P. 564-568.

201. Marquez, P. The role of the opioid receptor-like (ORL1) receptor in motor stimulatory and rewarding actions of buprenorphine and morphine / P. Marquez [et al.] // Neuroscience. — 2008b. — Vol. 155, № 3. — P. 597-602.

202. Martinez, D. Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum / D. Martinez [et al.] // Biol Psychiatry. — 2005. — Vol. 58(10). — P. 779-786.

203. Martinez, D. Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine. Neuropsychopharmacology / D. Martinez [et al.] // 2009. — Vol. 34(7). — P. 1774-1782.

204. Martin-Fardon, R. Nociceptin prevents stress-induced ethanol-but not cocaine-seeking behavior in rats / R. Martin-Fardon [et al.] // Neuroreport. — 2000. — Vol. 11, № 9. — P. 1939-1943.

205. McCarthy, M.J. CREB involvement in the regulation of striatal prodynorphin by nicotine / M.J. McCarthy [et al.] // Psychopharmacology (Berl). — 2012. — Vol. 221(1). — P. 143-153.

206. McClung, C.A. Neuroplasticity mediated by altered gene expression / C.A. McClung, E.J. Nestler // Neuropsychopharmacology. — 2008. — Vol. 33(1). — P. 3-17.

207. McLaughlin, J.P. Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system / J. P. McLaughlin [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2006. — Vol. 31, № 6. — P. 1241-1248.

208. McLaughlin, J.P. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses / J. P. McLaughlin, M. Marton-Popovici, C. Chavkin // Journal of Neuroscience. — 2003. — Vol. 23, № 13. — P.5674-5683.

209. Melis, M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state / M. Melis, S. Spiga, M. Diana // Int. Rev. Neurobiol. — 2005. — Vol. 63. — P. 101-154.

210. Mendez, I.A. Parsing the hedonic and motivational influences of nociceptin on feeding using licking microstructure analysis in mice / I. A. Mendez, N. T. Maidment, N. P. Murphy // Behavioural pharmacology. — 2016. — Vol. 27, № 6. — P. 516-527.

211. Mendez, M. Effects of acute ethanol administration on methionine-enkephalin expression and release in regions of the rat brain / M. Mendez [et al.] // Neuropeptides. — 2010. — Vol. 44(5). — P. 413-420.

212. Mendez, M. Role of mu and delta opioid receptors in alcohol drinking behavior / M. Mendez, M. Morales-Mulia // Curr Drug Abuse Rev. — 2008. — Vol. 1(2). — P. 239-252.

213. Meshul, C.K. Kappa opioid receptor immunoreactivity in the nucleus accumbens and caudate–putamen is primarily associated with synaptic vesicles in axons / C. K. Meshul, J. F. McGinty // Neuroscience. — 2000. — Vol. 96, № 1. — P. 91-99.

214. Meunier, J.-C. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor / J.-C. Meunier [et al.] // Nature. — 1995. — Vol. 377. — P. 532-535.

215. Micioni Di Bonaventura, M. V. N/OFQ-NOP System in Food Intake / M. V. Micioni Di Bonaventura [et al.] // Handb Exp Pharmacol. — 2019. — Vol. 254. — P. 279-295.

216. Mitchell, J. M. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens / J. M. Mitchell [et al.] // Sci Transl Med. — 2012. — Vol. 4(116). — P. 116ra6.

217. Mitchell, J.M. A single injection of the kappa opioid antagonist norbinaltorphimine increases ethanol consumption in rats / J. M. Mitchell [et al.] // Psychopharmacology. — 2005. — Vol. 182, № 3. — P. 384-392.

218. Mogil, J.S. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family / J.S. Mogil, G.W. Pasternak // Pharmacol. Rev. — 2001. — Vol. — 53. — P. 381-415.

219. Mollereau, C. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization / C. Mollereau [et al.] // FEBS Lett. — 1994. — Vol. 341. — P. 33-38.

220. Mollereau, C. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene / C. Mollereau [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93. — P. 8666-70.

221. Most, D. Molecular basis of alcoholism / D. Most, L. Ferguson, R.A. Harris // Handb Clin Neurol. — 2014. — Vol. 125. — P. 89-111.

222. Murphy, N.P. Nociceptin/orphanin FQ modulation of rat midbrain dopamine neurons in primary culture / N. P. Murphy [et al.] // Neuroscience. — 2004b. — Vol. 127, № 4. — P. 929-940.

223. Murphy, N.P. Nociceptin/orphanin FQ, hedonic state and the response to abused drugs / N. P. Murphy // Japanese journal of psychopharmacology. — 2004a. — Vol. 24, № 5. — P. 295-298.

224. Muschamp, J.W. Roles of nucleus accumbens CREB and dynorphin in dysregulation of motivation / J. W. Muschamp, W. A. Carlezon // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. — 2013. — Vol. 3, № 2. — P. a012005.

225. Narendran, R. Nociceptin receptors in alcohol use disorders: A positron emission tomography study using [11C]NOP-1A / R. Narendran [et al.] // Biol Psychiatry. — 2018. — Vol. 84. — P, 708-714.

226. Nava, F. Opioid maintenance therapy suppresses alcohol intake in heroin addicts with alcohol dependence: preliminary results of an open randomized study / F. Nava [et al.] // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2008. — Vol. 32, № 8. — P. 1867-1872.

227. Nestler, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? / E. J. Nestler // Nature neuroscience. — 2005. — Vol. 8, № 11. — P. 1445-1490.

228. Nestler, E.J. Role of the Brain's Reward Circuitry in Depression: Transcriptional Mechanisms / E. J. Nestler // Int Rev Neurobiol. — 2015. — Vol. 124. — P. 151-170.

229. Nie, Z. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors / Z. Nie [et al.] // Science. — 2004. — Vol. 303. — P. 1512-1514.

230. Norton, C.S. Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems / C. S. Norton [et al.] // Journal of Comparative Neurology. — 2002. — Vol. 444, № 4. — P. 358-368.

231. O'Donnell, P. Dopamine gating of forebrain neural ensembles / P. O'Donnell // European Journal of Neuroscience. — 2003. — Vol. 17, № 3. — P. 429-435.

232. Olds, J. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain / J. Olds, P. Milner // J Comp Physiol Psychol. — 1954. — Vol. 47. — P. 419-2710.

233. Olianas, M.C. Activation of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor system inhibits tyrosine hydroxylase phosphorylation, dopamine synthesis, and dopamine D1 receptor signaling in rat nucleus accumbens and dorsal striatum / M. C. Olianas [et al.] // Journal of neurochemistry. — 2008. — Vol. 107, № 2. — P. 544-556.

234. Palpacuer, C. Pharmacologically controlled drinking in the treatment of alcohol dependence or alcohol use disorders: a systematic review with direct and network meta-analyses on nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen and topiramate / C. Palpacuer [et al.] // Addiction. — 2018. — Vol. 113(2). — P. 220-237.

235. Pandey, S.C. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism / S. C. Pandey [et al.] // J Neurosci. — 2008. — Vol. 28. — P. 3729-3737.

236. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson. — Academic Press, New York, 1986. — 264 p.

237. Pellissier, L.P. Delta Opioid Receptors: Learning and Motivation / L. P. Pellissier [et al.] // Handb Exp Pharmacol. — 2018. — Vol. 247. — P. 227-260.

238. Peoples, R.W. Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system / R.W. Peoples, C. Li, F.F. Weight // Annu Rev Pharmacol Toxicol. — 1996. — Vol. 36. — P. 185-201.

239. Petrie, J. Altered GABAA receptor subunit and splice variant expression in rats treated with chronic intermittent ethanol / J. Petrie [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2001. — Vol. 25, № 6. — P. 819-828.

240. Pfaff, D.W. Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical / D. W. Pfaff. — Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2013. — 3112 p.

241. Pfeiffer, A. Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors / A. Pfeiffer [et al.] // Science. — 1986. — Vol. 233, № 4765. — P. 774-776.

242. Pierce, R.C. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? / R. C. Pierce, V. Kumaresan // Neurosci Biobehav Rev. — 2006. — Vol. 30(2). — P. 215-238.

243. Pignataro, L. Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1 / L. Pignataro [et al.] // J Neurosci. — 2007. — Vol. 27. — P. 12957-12966.

244. Pignataro, L. The regulation of neuronal gene expression by alcohol / L. Pignataro [et al.] // Pharmacol Ther. — 2009. — Vol. 124. — P. 324-335.

245. Piras, A.P. Acute withdrawal from chronic escalating-dose binge cocaine administration alters kappa opioid receptor stimulation of [35S] guanosine 5′-O-[gamma-thio] triphosphate acid binding in the rat ventral tegmental area / A. P. Piras [et al.] // Neuroscience. — 2010. — Vol. 169, № 2. — P. 751-757.

246. Polter, A.M. Constitutive activation of kappa opioid receptors at ventral tegmental area inhibitory synapses following acute stress / A. M. Polter [et al.] // Elife. — 2017. — Vol. 6. — P. e23785.

247. Ponomarev, I. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence / I. Ponomarev [et al.] // J Neurosci. — 2012. — Vol. 32. — P. 1884-1897.

248. Post, A. Proof-of-concept study to assess the nociceptin receptor antagonist LY2940094 as a new treatment for alcohol dependence / A. Post [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2016. — Vol. 40. — P. 1935-1944.

249. Pradhan, A.A. Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord / A. A. Pradhan, P. B. Clarke // J Comp Neurol. — 2005. — Vol. 481(4). — P. 416-426.

250. Przewłocka, B. Ethanol withdrawal enhances the prodynorphin system activity in the rat nucleus accumbens / B. Przewłocka [et al.] // Neuroscience letters. — 1997. — Vol. 238, № 1-2. — P. 13-16.

251. Raeder, H. Expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits and splice variants in an animal model of long-term voluntary alcohol self-administration / H. Raeder [et al.] // Drug Alcohol Depend. — 2008. — Vol. 96. — P. 16-21.

252. Rahman, S. Epigenetic mechanisms: targets for treatment of alcohol dependence and drug addiction / S. Rahman [et al.] // CNS Neurol Disord Drug Targets. — 2012. — Vol. 11. — P. 101.

253. Rani, C.S. Potential role of cAMP response element-binding protein in ethanol-induced N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene transcription in fetal

mouse cortical cells / C. S. Rani, M. Qiang, M. K. Ticku // Mol Pharmacol. — 2005. — Vol. 67. — P. 2126-2136.

254. Ravan, S. Molecular imaging in alcohol dependence / S. Ravan [et al.] // Handb Clin Neurol. — 2014. — Vol. 125. — P. 293-311.

255. Ray, L.A. Naltrexone effects on subjective responses to alcohol in the human laboratory: A systematic review and meta-analysis. Addict Biol. 2019 Nov;24(6):1138-1152.

256. Reinscheid, R.K. Orphanin-FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor / R. K. Reinscheid [et al.] // Science. — 1995. — Vol. 270. — P. 792-794

257. Renthal, W. Epigenetic mechanisms in drug addiction / W. Renthal, E.J. Nestler // Trends Mol Med. — 2008. — Vol. 14. — P. 341–350.

258. Repo, E. Dopamine transporter and D2- receptor density in late-onset alcoholism / E. Repo [et al.] // Psychopharmacology (Berl). — 1999. — Vol. 147(3). — P. 314-318.

259. Resendez, S.L. Dopamine and opioid systems interact within the nucleus accumbens to maintain monogamous pair bonds / S. L. Resendez [et al.] // Elife. — 2016. — Vol. 5. — P. e15325.

260. Reyes, B.A. Dynorphin and stress-related peptides in rat locus coeruleus: Contribution of amygdalar efferents / B. A. Reyes, E. J. Van Bockstaele // Journal of Comparative Neurology. — 2008. — Vol. 508, № 4. — P. 663-675.

261. Reyes, B.A. Dynorphin-containing axons directly innervate noradrenergic neurons in the rat nucleus locus coeruleus / B. A. Reyes // Neuroscience. — 2007. — Vol. 145. — P. 1077-1086.

262. Reyes, B.A. Subcellular targeting of kappa-opioid receptors in the rat nucleus locus coeruleus / B. A. Reyes, C. Chavkin, E. J. Van Bockstaele // Journal of Comparative Neurology. — 2009. — Vol. 512, № 3. — P. 419-431.

263. Rimoy, G.H. The cardiovascular and central nervous system effects in the human of U-62066E / G. H. Rimoy et al // European journal of clinical pharmacology. — 1994. — Vol. 46, № 3. — P. 203-207.

264. Ripley, T.L. Critical thoughts on current rodent models for evaluating potential treatments of alcohol addiction and withdrawal / T.L. Ripley, D.N. Stephens // Br J Pharmacol. — 2011. — Vol. 164(4). — P. 1335-1356.

265. Robbins, T.W. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation / T. W. Robbins, A. F. T. Arnsten // Annual review of neuroscience. — 2009. — Vol. 32. — P. 267-287.

266. Roberto, M. Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdale / M. Roberto, G. R. Siggins // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2006. — Vol. 103, № 25. — P. 9715-9720.

267. Robinson, T.E. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive–sensitization view / T. E. Robinson, K. C. Berridge [et al.] // Addiction. — 2000. — Vol. 95, № 8s2. — P. 91-117.

268. Rominger, A. [18F]Fallypride PET measurement of striatal and extrastriatal dopamine D 2/3 receptor availability in recently abstinent alcoholics // A. Rominger / Addict Biol. — 2012. — Vol. 17(2). — P. 490-503.

269. Rosin, A. Downregulation of kappa opioid receptor mRNA levels by chronic ethanol and repetitive cocaine in rat ventral tegmentum and nucleus accumbens / A. Rosin, S. Lindholm, J. Franck // Neurosci Lett. — 1999. — Vol. 275(1). — P. 1-4.

270. Rossetti, Z.L. Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine / Z. L. Rossetti [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 1992. — Vol. 16, № 3. — P. 529-532.

271. Rothblat, D.S. Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat / D. S. Rothblat, E. Rubin, J.S. Schneider // Neurosci Lett. — 2001. — Vol. 300. — P. 63-66.

272. Rutten, K. Effects of the NOP receptor agonist Ro65-6570 on the acquisition of opiate-and psychostimulant-induced conditioned place preference in rats / K. Rutten [et al.] // European journal of pharmacology. — 2010. — Vol. 645, № 1-3. — P. 119-126.

273. Sakoori, K. Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice / K. Sakoori, N. P. Murphy // Psychopharmacology. — 2004. — Vol. 172, № 2. — P. 129-136.

274. Sakoori, K. Endogenous nociceptin (orphanin FQ) suppresses basal hedonic state and acute reward responses to methamphetamine and ethanol, but facilitates chronic responses / K. Sakoori, N. P. Murphy // Neuropsychopharmacology. — 2008. — Vol. 33, № 4. — P. 877–891.

275. Salamone, J.D. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits / J. D. Salamone [et al.] // Psychopharmacology. — 2007. — Vol. 191, № 3. — P. 461-482.

276. Salonen, I. A PET study on the acute effect of ethanol on striatal D2 dopamine receptors with [11C]raclopride in healthy males / I. Salonen [et al.] // Hum Psychopharmacol. — 1997. — Vol. 12. — P. 145-152.

277. Sarkisyan, D. Downregulation of the endogenous opioid peptides in the dorsal striatum of human alcoholics / D. Sarkisyan [et al.] // Frontiers in cellular neuroscience. — 2015. — Vol. 9. — P. 187.

278. Sasabe, T. Alcoholism and alternative splicing of candidate genes / T. Sasabe, S. Ishiura // Int J Environ Res Public Health. — 2010. — Vol. 7(4). — P. 1448-1466.

279. Schank, J.R. Stress-induced reinstatement of alcohol-seeking in rats is selectively suppressed by the neurokinin 1 (NK1) antagonist L822429 / J. R. Schank [et al.] // Psychopharmacology (Berl). — 2011. — Vol. 218. — P. 111-119.

280. Schank, J.R. Stress-related neuropeptides and addictive behaviors: beyond the usual suspects / J. R. Schank [et al.] // Neuron. — 2012. — Vol. 76(1). — P. 192-208.

281. Schenk, S. U69593, a kappa-opioid agonist, decreases cocaine self-administration and decreases cocaine-produced drug-seeking / S. Schenk, B. Partridge, T. S. Shippenberg // Psychopharmacology. — 1999. — Vol. 144, № 4. — P. 339-346.

282. Scherrer, G. Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo / G. Scherrer [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2006. — Vol. 103(25). — P. 9691-9696.

283. Schindler, A.G. Stress produces aversion and potentiates cocaine reward by releasing endogenous dynorphins in the ventral striatum to locally stimulate serotonin reuptake / A. G. Schindler [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2012. — Vol. 32, № 49. — P. 17582-17596.

284. Schlussman, S.D. Steady-dose and escalating-dose “binge” administration of cocaine alter expression of behavioral stereotypy and striatal preprodynorphin mRNA levels in rats / S. D. Schlussman [et al.] // Brain research bulletin. — 2005. — Vol. 67, № 3. — P. 169-175.

285. Sesack, S.R. Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry / S. R. Sesack, A. A. Grace // Neuropsychopharmacology. — 2010. — Vol. 35, № 1. — P. 27-47.

286. Shaham, Y. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats: a review / Y. Shaham, S. Erb, J. Stewart // Brain Research Reviews. — 2000. — Vol. 33, № 1. — P. 13-33.

287. Shippenberg, T. S. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction / T. S. Shippenberg, A. Zapata, V. I. Chefer // Pharmacology & therapeutics. — 2007. — Vol. 116, № 2. — P. 306-321.

288. Shirayama, Y. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects / Y Shirayama [et al.] // Journal of neurochemistry. — 2004. — Vol. 90, № 5. — P. 1258-1268.

289. Smith, R.J. Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways) / R. J. Smith [et al.] // Curr Opin Neurobiol. — 2013. — Vol. 23(4). — P. 546-552.

290. Solomon, R.L. Recent experiments testing an opponent-process theory of acquired motivation / R. L. Solomon // Acta Neurobiol Exp (Wars). — 1980. — Vol. 40, № 1. — P. 271-289.

291. Spanagel, R. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway / R. Spanagel, A. Herz, T. S. Shippenberg // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1992. — Vol. 89, № 6. — P. 2046-2050.

292. Spanagel, R. Recent animal models of alcoholism / R. Spanagel // Alcohol Res Health. — 2000. — Vol. 24(2). — P. 124-131.

293. Steiner, H. Dynorphin opioid inhibition of cocaine-induced, D1 dopamine receptor-mediated immediate-early gene expression in the striatum / H. Steiner, C.R. Gerfen // J Comp Neurol. — 1995. — Vol. 353(2). — P. 200-212.

294. Stevens, C.W. Bioinformatics and evolution of vertebrate nociceptin and opioid receptors / C. W. Stevens // Vitam Horm. — 2015. — Vol. 97. — P. 57-94.

295. Stevens, C.W. Cloning and bioinformatics of amphibian mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors expressed in brain tissue: evidence for opioid receptor divergence in mammals / C. W. Stevens, C. M. Brasel, S. Mohan // Neuroscience letters. — 2007. — Vol. 419, № 3. — P. 189-194.

296. Strother, W.N. Regional central nervous system densities of delta-opioid receptors in alcohol-preferring P, alcohol-nonpreferring NP, and unselected Wistar rats / W. N. Strother [et al.] // Alcohol. — 2001. — Vol. 25(1). — P. 31-38.

297. Surmeier, D.J. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons / D. J. Surmeier [et al.] // Trends in neurosciences. — 2007. — Vol. 30, № 5. — P. 228-235.

298. Svingos, A.L. Cellular sites for dynorphin activation of κ-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell / A. L. Svingos [et al.] // Journal of Neuroscience. — 1999. — Vol. 19, № 5. — P. 1804-1813.

299. Svingos, A.L. Major coexpression of κ-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles / A. L. Svingos [et al.] // Synapse. — 2001. — Vol. 42, № 3. — P. 185-192.

300. Tabakoff, B. Animal models in alcohol research / B. Tabakoff, P. L. Hoffman // Alcohol. Res. Health. — 2000. — №24. — P. 77-84.

301. Tanda, G.A dopamine-mu1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (Fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse / G. Tanda, G. Di Chiara // Eur J Neurosci. — 1998. — Vol.10. — P. 1179-1187.

302. Tejeda, H.A. Dynorphin/kappa-opioid receptor control of dopamine dynamics: Implications for negative affective states and psychiatric disorders / H. A. Tejeda, A. Bonci // Brain Res. — 2019. — Vol. 1713. — P. 91-101.

303. Tejeda, H.A. Pathway- and cell-specific kappa-opioid receptor modulation of excitation-inhibition balance differentially gates D1 and D2 accumbens neuron activity / H. A. Tejeda [et al.] // Neuron. — 2017. — Vol. 93, № 1. — P. 147-163.

304. Thanos, P.K. Dopamine D2R DNA transfer in dopamine D2 receptor-deficient mice: effects on ethanol drinking / P. K. Thanos [et al.] // Life Sciences. — 2005. — Vol. 77, № 2. — P. 130-139.

305. Thanos, P.K. DRD2 gene transfer into the nucleus accumbens core of the alcohol preferring and nonpreferring rats attenuates alcohol / P. K. Thanos [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2004. — Vol. 28, № 5. — P. 720-728.

306. Thanos, P.K. Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration / P. K. Thanos [et al.] // Journal of neurochemistry. — 2001. — Vol. 78, № 5. — P. 1094-1103.

307. Thompson, A. C. κ-Opioid receptor activation modifies dopamine uptake in the nucleus accumbens and opposes the effects of cocaine / A. C. Thompson [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2000. — Vol. 20, № 24. — P. 9333-9340.

308. Todtenkopf, M. S. Effects of κ-opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats / M. S. Todtenkopf [et al.] // Psychopharmacology. — 2004. — Vol. 172, № 4. — P. 463-470.

309. Toll, L. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems / L. Toll [et al.] // Pharmacol Rev. — 2016. — Vol. 68(2). — P. 419-457.

310. Tollefson, S. Imaging corticotropin releasing-factor and nociceptin in addiction and PTSD models / S. Tollefson, M. Himes, R. Narendran // Int Rev Psychiatry. — 2017. — Vol. 29. — P. 567-579.

311. Trifilieff, P. Kappa-opioid receptor signaling in the striatum as a potential modulator of dopamine transmission in cocaine dependence / P. Trifilieff, D. Martinez // Front Psychiatry. — 2013. — Vol. 4. — P. 44.

312. Trovero, F. Striatal opiate mu-receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat / F. Trovero [et al.] // Neuroscience. — 1990. — Vol. 39(2). — P. 313-321.

313. Tsankova, N. Epigenetic regulation in psychiatric disorders / N. Tsankova [et al.] // Nat Rev Neurosci. — 2007. — Vol. 8. — P. 355-367.

314. Tuomainen, P. Extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens in AA and ANA rats after reverse microdialysis of ethanol into the nucleus accumbens or ventral tegmental area / P. Tuomainen [et al.] // Alcohol. — 2003. — Vol. 29, № 2. — P. 117-124.

315. Turchan, J. Effects of repeated psychostimulant administration on the prodynorphin system activity and kappa opioid receptor density in the rat brain / J. Turchan [et al.] // Neuroscience. — 1998. — Vol. 85, № 4. — P. 1051-1059.

316. Turchan, J. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat / J. Turchan [et al.] // Neuroscience. — 1999. — Vol. 91(3). — P. 971-977.

317. Turnbull, A.V. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides / A. V. Turnbull, C. Rivier // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. — 1997. — Vol. 215, № 1. — P. 1-10.

318. Ur, E. The effects of spiradoline (U-62066E), a κ-opioid receptor agonist, on neuroendocrine function in man / E. Ur [et al.] // British journal of pharmacology. — 1997. — Vol. 120, № 5. — P. 781-784.

319. Urban, N.B. Sex differences in striatal dopamine release in young adults after oral alcohol challenge: a positron emission tomography imaging study with

[(11)C]raclopride / N. B. Urban [et al.] // Biol Psychiatry. — 2010. — Vol. 68(8). — P. 689-696.

320. Valdez, G.R. κ Agonist-induced reinstatement of cocaine seeking in squirrel monkeys: a role for opioid and stress-related mechanisms / G. R Valdez [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. — 2007. — Vol. 323, № 2. — P. 525-533.

321. Valenta, J.P. μ-Opioid receptors in the stimulation of mesolimbic dopamine activity by ethanol and morphine in Long-Evans rats: a delayed effect of ethanol / J. P. Valenta [et al.] // Psychopharmacology. — 2013. — Vol. 228, № 3. — P. 389-400.

322. Van Rijn, R.M. Distinctive modulation of ethanol place preference by delta opioid receptor-selective agonists / R. M. van Rijn, D. I. Brissett, J.L. Whistler // Drug Alcohol Depend. — 2012. — Vol. 122(1-2). — P. 156-159.

323. Vazquez-DeRose, J. Retrodialysis of N/OFQ into the nucleus accumbens shell blocks cocaine-induced increases in extracellular dopamine and locomotor activity / J. Vazquez-DeRose [et al.] // European journal of pharmacology. — 2013. — Vol. 699, № 1-3. — P. 200-206.

324. Vijay, A. Effects of alcoholism and sex on kappa opioid receptor availability / A. Vijay [et al.] // Journal of Nuclear Medicine. — 2015. — Vol. 56 (suppl. 3). — P. 526.

325. Vijay, A. PET imaging reveals lower kappa opioid receptor availability in alcoholics but no effect of age / A. Vijay [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2018. — Vol. 43(13). — P. 2539-2547.

326. Volkow, N.D. Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects / N. D. Volkow [et al.] // Nature. — 1997. — Vol. 386, № 6627. — P. 830-833.

327. Volkow, N.D. Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics / N. D. Volkow [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 1996. — Vol. 20(9). — P. 1594-1598.

328. Volkow, N.D. Effects of alcohol detoxification on dopamine D2 receptors in alcoholics: a preliminary study / N. D. Volkow [et al.] // Psychiatry Res. — 2002. — Vol. 116(3). — P. 163-172.

329. Volkow, N.D. Imaging endogenous dopamine competition with [11C]raclopride in the human brain / N. D. Volkow [et al.] // Synapse. — 1994. — Vol. 16(4). — P. 255-262.

330. Volkow, N.D. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction / N. D. Volkow, G. F. Koob, A. T. McLellan // N Engl J Med. — 2016. — Vol. 374(4). — P. 363-371.

331. Volkow, N.D. Neurochemical and metabolic effects of acute and chronic alcohol in the human brain: Studies with positron emission tomography / N. D. Volkow [et al.] // Neuropharmacology. — 2017. — Vol. 122. — P. 175-188.

332. Volkow, N.D. Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels / N. D. Volkow [et al.] // Am J Psychiatry. — 1999. — Vol. 156(9). — P. 1440-1443.

333. Volkow, N.D. Predominance of D2 receptors in mediating dopamine's effects in brain metabolism: effects of alcoholism / N. D. Volkow [et al.] [et al.] // J Neurosci. — 2013. — Vol. 33(10). — P. 4527-4535.

334. Volkow, N.D. Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: possible orbitofrontal involvement / N. D. Volkow [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2007. — Vol. 27, № 46. — P. 12700-12706.

335. Volkow, N.D. Stimulant-induced dopamine increases are markedly blunted in active cocaine abusers / N. D. Volkow [et al.] // Mol Psychiatry. — 2014. — Vol. 19(9). — P. 1037-1043.

336. Volkow, N.D. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction / N. D. Volkow, M. Morales // Cell. — 2015. — Vol. 162(4). — P. 712-725.

337. Waddington, C.H. The epigenotype. 1942 / C.H. Waddington // Int J Epidemiol. — 2012. — Vol. 41. — P. 10-13.

338. Walker, B.M. Systemic κ-opioid receptor antagonism by nor-binaltorphimine reduces dependence-induced excessive alcohol self-administration

in rats / B. M. Walker, E. P. Zorrilla, G. F. Koob // Addiction biology. — 2011. — Vol. 16, № 1. — P. 116-119.

339. Walsh, S.L. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans / S. L. Walsh [et al.] // Psychopharmacology. — 2001. — Vol. 157, № 2. — P. 151-162.

340. Wang, G.J. Decreased dopamine activity predicts relapse in methamphetamine abusers / G. J. Wang [et al.] // Mol Psychiatry. — 2012. — Vol. 17(9). — P. 918-925.

341. Wang, J.Q. Glutamate-dopamine interactions mediate the effects of psychostimulant drugs / J. Q. Wang [et al.] // Addiction biology. — 1999. — Vol. 4, № 2. — P. 141-150.

342. Wee, S. The role of the dynorphin–κ opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse / S. Wee, G. F. Koob // Psychopharmacology. — 2010. — Vol. 210, № 2. — P. 121-135.

343. Weerts, E.M. Positron emission tomography imaging of mu- and delta-opioid receptor binding in alcohol-dependent and healthy control subjects / E. M. Weerts [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2011. — Vol. 35(12). — P. 2162-2173.

344. Weiss, F. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges / F. Weiss, L. J. Porrino / [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2002. — Vol. 22, № 9. — P. 3332-3337.

345. Weiss, F. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants / F. Weiss [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. — 1993. — Vol. 267. — P 250-258.

346. Williams, T.M. Brain opioid receptor binding in early abstinence from alcohol dependence and relationship to craving: an [11C]diprenorphine PET study / T. M. Williams [et al.] // Eur Neuropsychopharmacol. — 2009. — Vol. 19(10). — P. 740-748.

347. Winstanley, C.A. DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction / C. A. Winstanley [et al.] // J Neurosci. — 2007. — Vol. 27. — P. 10497-10507.

348. Witkin, J.M. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence / J. M. Witkin [et al.] // Pharmacology & therapeutics. — 2014. — Vol. 141, № 3. — P. 283-299.

349. Wittmann, W. Prodynorphin-derived peptides are critical modulators of anxiety and regulate neurochemistry and corticosterone / W. Wittmann [et al.] // Neuropsychopharmacology. — 2009. — Vol. 34, № 3. — P. 775-785.

350. Xia, Y. Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area / Y. Xia [et al.] // Journal of Neuroscience. — 2011. — Vol. 31, № 21. — P. 7811-7816.

351. Yim, H.J. Ethanol-induced increases in dopamine extracellular concentration in rat nucleus accumbens are accounted for by increased release and not uptake inhibition / H. J. Yim, R. A. Gonzales // Alcohol. — 2000. — Vol. 22, № 2. — P. 107-115.

352. Yoder, K.K. Differences in IV alcohol-induced dopamine release in the ventral striatum of social drinkers and nontreatment-seeking alcoholics / K. K. Yoder [et al.] // Drug Alcohol Depend. — 2016. — Vol. 160. — P. 163-169.

353. Yoshimoto, K. Alcohol enhances characteristic releases of dopamine and serotonin in the central nucleus of the amygdale / K. Yoshimoto [et al.] // Neurochemistry international. — 2000. — Vol. 37, № 4. — P. 369-376.

354. Zapata, A. Endogenous κ opioid receptor systems modulate the responsiveness of mesoaccumbal dopamine neurons to ethanol / A. Zapata, T. S. Shippenberg // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. — 2006. — Vol. 30, № 4. — P. 592-597.

355. Zaveri, N.T. A Novel and Selective Nociceptin Receptor (NOP) Agonist (1-(1-((cis)-4-isopropylcyclohexyl)piperidin-4-yl)-1H-indol-2-yl)methanol (AT-312) Decreases Acquisition of Ethanol-Induced Conditioned Place Preference in Mice / N. T. Zaveri [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. — 2018. — Vol. 42(2). — P. 461-471.

356. Zaveri, N.T. Discovery of the first small-molecule opioid pan antagonist with nanomolar affinity at mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors / N. T.

Zaveri, V. B. Journigan, W. E Polgar // ACS chemical neuroscience. — 2015. — Vol. 6, № 4. — P. 646-657.

357. Zaveri, N.T. Nociceptin Opioid Receptor (NOP) as a Therapeutic Target: Progress in Translation from Preclinical Research to Clinical Utility: Miniperspective / N. T. Zaveri // Journal of medicinal chemistry. — 2016. — Vol. 59, № 15. — P. 7011-7028.

358. Zhou, Y. Effects of acute “binge” cocaine on preprodynorphin, preproenkephalin, proopiomelanocortin, and corticotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the striatum and hypothalamic–pituitary–adrenal axis of mu-opioid receptor knockout mice / Y. Zhou // Synapse. — 2002. — Vol. 45, № 4. — P. 220-229.

359. Zhou, Y. Effects of cocaine place conditioning, chronic escalating-dose “binge” pattern cocaine administration and acute withdrawal on orexin/hypocretin and preprodynorphin gene expressions in lateral hypothalamus of Fischer and Sprague–Dawley rats / Y. Zhou [et al.] // Neuroscience. — 2008. — Vol. 153, № 4. — P. 1225-1234.

360. Zhou, Y. Effects of voluntary alcohol drinking on corticotropin-releasing factor and preprodynorphin mRNA levels in the central amygdala of Sardinian alcohol-preferring rats / Y. Zhou [et al.] // Neurosci Lett. — 2013. — Vol. 554. — P. 110-114.

361. Zubieta, J.K. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain / J. K. Zubieta [et al.] // Science. — 2001. — Vol. 293(5528). — P. 311-315.