

О. Г. Берченко, А. М. Тіткова, А. В. Шляхова, О. В. Веселовська, О. О. Приходько
ОСОБЛИВОСТІ НЕЙРОРЕГУЛЯТОРНИХ МЕХАНІЗМІВ АДАПТАЦІЇ ПРИ АЛКОГОЛЬНІЙ ЗАЛЕЖНОСТІ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

О. Г. Берченко, А. М. Титкова, А. В. Шляхова, Е. В. Веселовская, Е. А. Приходько
Особенности нейрорегуляторных механизмов адаптации при алкогольной зависимости
(экспериментальное исследование)

O. G. Berchenko, A. M. Titkova, A. V. Shliakhova, O. V. Veselovska, O. O. Prikhodko
Peculiarities of neuroregulatory mechanisms of adaptation under alcohol dependence (experimental study)

В дослідженні, проведеному на лабораторних щурах, на системному та молекулярному рівнях виявлені нейрофізіологічні та біохімічні маркери алкогольної залежності. Показано, що тривале вживання алкоголю супроводжується підвищенням рівня дофаміну в вентральній тегментальній зоні, зниженням рівнів ГАМК та BDNF в гіпокампі та сироватці крові, призводить до послаблення впливів неокортексу на структури лімбічної емоційно-мотиваційної системи мозку. Встановлено порушення механізмів структурно-функціональної організації процесів неспання — сон та регуляції емоційних реакцій, що віддзеркалюється в пригніченні стадії повільнохвильового сну, редукції парадоксального сну, гальмуванні активності позитивних емоціогенних центрів, розвитку тривожності та депресії.

Ключові слова: *алкогольна залежність, сон — неспання, тривожність, депресія, катехоламіни, ГАМК, BDNF*

В исследовании, проведенном на лабораторных крысах, на системном и молекулярном уровнях выявлены нейрофизиологические и биохимические маркеры алкогольной зависимости. Показано, что длительный прием алкоголя сопровождается повышением уровня дофамина в вентральной тегментальной области, снижением уровня ГАМК и BDNF в гиппокампе и сыворотке крови, приводит к ослаблению влияния неокортекса на структуры лимбической эмоционально-мотивационной системы мозга. Выявлены нарушения механизмов структурно-функциональной организации процессов бодрствования — сон и регуляции эмоциональных реакций, что отражается в подавлении стадии медленноволнового сна, редукции парадоксального сна, торможении активности позитивных эмоциогенных центров, развитии тревожности и депрессии.

Ключевые слова: *алкогольная зависимость, сон — бодрствование, тревожность, депрессия, катехоламины, ГАМК, BDNF*

Neurophysiological and biochemical markers of alcohol dependence were identified in a study conducted in laboratory rats at the systemic and molecular levels. It has been shown that long-term alcohol consumption is accompanied by an increase in dopamine levels in the ventral tegmental area and a decrease in GABA and BDNF levels in the hippocampus and serum and leads to attenuation of neocortex control of the limbic emotional-motivational system of the brain. Disturbance of the mechanisms of structural and functional organization of wake-sleep processes and regulation of emotional reactions, which is reflected in the suppression of slow-wave sleep, reduction of paradoxical sleep, inhibition of positive emotional centers, the development of anxiety and depression have been determined.

Key words: *alcohol dependence, sleep-wake, anxiety, depression, catecholamines, GABA, BDNF*

Вживання алкоголю впливає на активність нейронів у мозковій системі емоційного підкріплення, змінює синаптичну передачу і синаптичну архітектуру [1—3]. Зміни експресії генів, які спричиняють синаптичне ремодулювання, пов'язані з підсиленням добровільного вживання алкоголю [4]. На різних етапах формування алкогольної залежності виявлені структурно-функціональні зміни в ключових структурах мозкової системи емоційного підкріплення: мигдалевидному комплексі, гіпокампі, гіпоталамусі, прилеглому ядрі [5—7]. Префронтальна кора головного мозку, яка в функціональній системі цілеспрямованої поведінки відповідає за прийняття рішення, також чутлива до дії алкоголю [8, 9]. Відмова від вживання алкоголю призводить до деякої компенсації нейрорегуляторних та метаболічних порушень, але не впливає на потяг до приймання алкоголю та може призвести до рецидиву.

Для отримання більш повного уявлення про нейропластичні зміни при алкогольній залежності ми зробили спробу щодо вивчення нейрофізіологічних та біохімічних показників, які віддзеркалюють

процеси адаптації на системному та молекулярному рівнях. Заслужують на увагу досліджування процесів неспання — сон, активності адаптивної емоціогенної лімбіко-неокортикальної системи мозку та її поведінкових проявів: потяг до отримання позитивних емоцій, негативні реакції (тривожність, депресія). Біохімічні дослідження потрібно було зосередити на більш докладному вивченні катехоламінів і глюкокортикоїдів — універсальних чинників системи адаптації, тому що їх специфічні профілі відображають взаємодію нервових та метаболічних процесів в умовах змін довкілля та внутрішнього середовища організму. Важливе значення в розумінні механізмів алкогольної залежності має досліджування нейротрофічного фактору BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) — основного чинника нейропластичності, якому притаманні захисні та репаративні функції і модуляторні впливи на ГАМК-, глутамат- та серотонінергічну нейромедіацію [10].

Виходячи з цього, метою роботи було дослідження нейрофізіологічних та нейрорегуляторних особливостей нейропластичності при експериментальному моделюванні алкогольної залежності у щурів.

Усі процедури з експериментальними тваринами виконані відповідно до «Порядку проведення

науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (№ 249 від 01.03.2012), Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006).

Експериментальні дослідження проведені на 85 щурах-самцях статевозрілого віку, які протягом 60 діб вживали алкоголь у дозі 1,2 г на кг маси тіла. Залежність від алкоголю визначали за ознакою вподобання щурами алкогольної їжі безалкогольній [7].

Індивідуальний рівень тривожності у щурів встановлювали за допомогою багатопараметрового методу оцінки тривожно-фобічних станів [11]. Розвиток депресивного стану визначали за латентним періодом (ЛП) іммобільності в тесті «підвішування за хвіст», який є кількісним показником поведінкової безпорадності [12].

Стереотаксичним способом щурам вводили довгострокові електроди в лобово-тім'яні відділи нової кори (*Cort*), гіпокамп (*Hip*), гіпоталамус (*Hpt*), мигдалеподібний комплекс (*Am*) та прилегле ядро (*nAcc*) [13]. Електроенцефалограми реєстрували на комп'ютерно-діагностичному комплексі «Нейрон-Спектр+». Поліграфічний запис сну здійснювали на 8-канальному енцефалографі EEG-8S фірми «Медікор» протягом двох годин.

Частоту реакції самостимуляції (ЧРСС) *Hpt* здійснювали за методом Olds [14]. Частоту натискань на педаль при реакції самостимуляції реєстрували кожні 5 хв протягом 60 хв.

Вміст дофаміну визначали у структурах головного мозку: вентральна тегментальна зона (*VTA*) та *nAcc* із застосуванням наборів реагентів для імуноферментного аналізу («Tri Cat», Німеччина). Концентрацію ГАМК досліджували у *Cort*, *Am* та *Hip* за допомогою наборів Rat GABA (Gamma-aminobutyric acid) фірми «Puda Scientific CO, LTD» (Китай). Рівень BDNF — у *Cort*, *Hip* та сироватці крові за допомогою наборів фірми «EMD Millipore» (Німеччина). Визначення кортизолу у *Cort*, *Hip* та сироватці крові здійснювали за допомогою наборів «Кортизол» фірми «Гранум» (Україна). Оптичну щільність зразків вимірювали на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 2100 (США).

Результати обробляли статистично за допомогою програм Excel та Statistica 10.0 з використанням критерію Стьюдента, *T*-критерію Вілкоксона та критерію Манна — Уїтні.

В результаті проведених досліджень встановлено, що тривале приймання алкоголю приводить до змін в емоційній лімбічній системі мозку, це на поведінковому рівні проявлялось в змінах базового рівня тривожності та розвитку депресивного стану. На 60 добу приймання алкоголю тривожність щурів (за даними комплексної нейроетологічної оцінки) підвищилася до високого рівня ($7,6 \pm 0,4$ бали) проти $4,8 \pm 0,2$ бали фонової величини (рис. 1,А). В цей період у щурів спостерігався розвиток депресії. Під час виконання тесту «підвішування за хвіст» збільшувався латентний період нерухомості як показник безпорадності та ангедонії (рис. 1,Б).

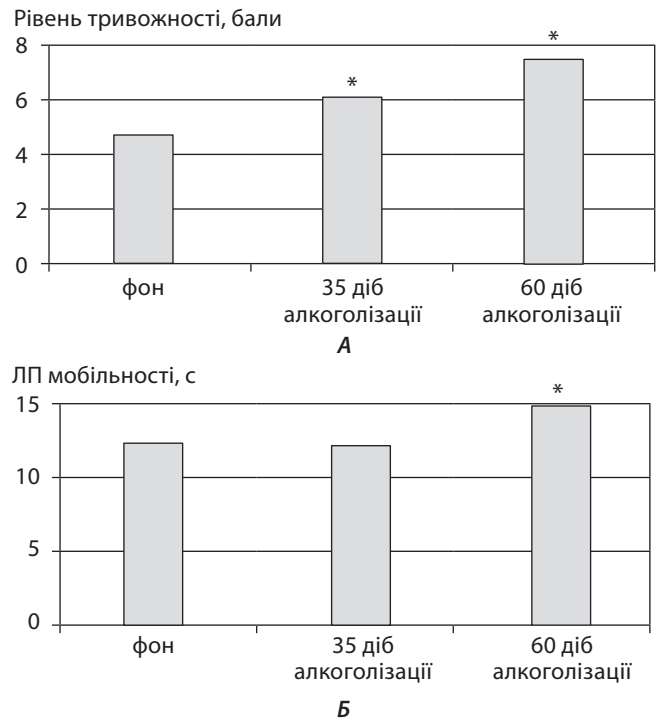


Рис. 1. Вплив тривалого приймання алкоголю на рівень тривожності (А) та депресії (Б) у щурів

ЛП — латентний період; * — $p < 0,05$ порівняно з фоновими величинами

Негативні емоційні реакції у щурів після тривалого приймання алкоголю поєднувалися з порушенням структури сну. Аналіз поліграм неспання — сон виявив превалювання загального часу неспання, порушення засинання, зниження загальної тривалості сну, скорочення циклів сну, зниження представленості фаз повільнохвильового (ПХС) та парадоксального сну (ПС) (рис. 2).

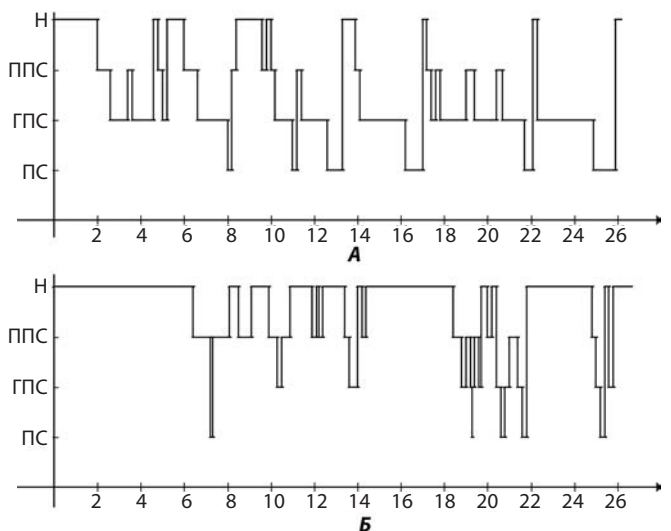


Рис. 2. Структурна організація циклу неспання — сон щура № 10 до (А) та після (Б) тривалого приймання алкоголю:

За віссю абсцис — тривалість реєстрації поліграми неспання — сон, часові фрагменти (2 відповідає 9 хв); за віссю ординат — фази і стадії сну (Н — неспання, ППС — поверхневий повільний сон, ГПС — глибокий повільний сон, ПС — парадоксальний сон)

Встановлено вірогідне ($p \leq 0,05$) пригнічення стадії глибокого ПХС, тривалість якого становила 28,1 % проти показника інтактних щурів, який дорівнював 41,1 %, скорочення фази ПС до 6,9 % проти 10,8 % у інтактних щурів та істотне зниження тривалості першого епізоду ПС до $(2,0 \pm 0,1)$ с порівняно з інтактними тваринами $(2,7 \pm 0,2)$ с. Привертає до себе увагу поява численних коротких електрографічних паттернів ПС протягом реєстрації стадії глибокого ПХС. Це свідчить про те, що тривале вживання алкоголю призводить до дисрегуляції висхідних механізмів заднього *Hpt*, що активують, а саме — механізмів запуску та підтримки фази ПС. Якісний аналіз поліграм сну виявив прояви судомної активності в *Am* та *Hip* на EEG неспання та у перехідних станах від глибокого ПХС до ПС. Пейскекерну роль в ініціації розвитку судомної активності виконував *Hip*. Спектральний та амплітудний аналіз електричної активності в стані неспання показав, що найбільшу спектральну потужність та амплітуду мали біопотенціали *Hip* та *nAcc*, а серед ритмів — дельта-ритм.

Отже, внаслідок хронічної алкогольної інтоксикації дезадаптивні зміни в структурі циклу неспання — сон проявляються не тільки в пригніченні фаз ПХС та ПС, але і в порушенні ритмічності чергування стадій та фаз сну, і в проявах судомної активності на EEG структур лімбічної системи мозку. Пригнічення представленості глибокого ПХС, певно, зумовлено виснаженням механізмів генерації дельта-сну, як однієї з ланок пасивно-захисної функції сну від тривалого емоційного напруження, що пояснює збільшення рівня тривожності та розвиток стану депресії при алкогольній залежності. Редукція фази ПС, яка проявляється не тільки в зниженні представленості сну, але і в тривалості епізодів сну, пов'язана з порушенням енергетичного забезпечення фази ПС [15], що є одним із чинників послаблення інформаційної функції ПС, а саме — механізмів переробки інформаційно значущої інформації, та є проявом порушення механізмів регуляції позитивних та негативних емоцій в період неспання.

Дослідження системи позитивного емоційного підкріплення у щурів зі сформованою алкогольною залежністю за даними ЧРСС *Hpt* продемонструвало амбівалентні прояви емоційної поведінки тварин. Середня ЧРСС *Hpt* у щурів, які майже два місяці вживали алкоголь, була $(264,00 \pm 44,50)$ нат/5 хв. Характер самостимуляції у тварин був стабільним, кількість натискань на педаль за другу половину сеансу не відрізнялася від показника за перші 30 хв — $(270,83 \pm 40,56)$ нат/5 хв та $(272,50 \pm 51,67)$ нат/5 хв), відповідно. Але під час виконання інструментального рефлексу самостимуляції мозку виявлені зміни і в системі негативного емоційного підкріплення. Тварини були дуже збуджені: відзначалась підвищена рухова активність з проявами агресивності, лякливості, вокалізації та еквівалентів судомних реакцій.

Отже, тривале приймання алкоголю призводить до формування порочного патологічного циклу

в системі неспання — сон, в якому домінування негативного емоційного збудження на тлі пригнічення гіпоталамічних механізмів позитивного емоційного підкріплення призводить до порушення процесу сну, а з другого боку, порушення сну активує механізми негативного емоційного збудження. Такі двобічні зв'язки між процесами сну та тривожно-фобічними станами відзначаються у хворих на алкоголізм [16].

Кореляційний аналіз взаємозв'язків біопотенціалів мозку на EEG неспання щурів з алкогольною залежністю виявив недостатню нейрональну взаємодію між *Cort* (структурою, яка в нормі контролює емоційно-мотиваційну поведінку) та структурами лімбічного мозку, що узгоджується з даними Conte R. et al. [8] (рис. 3). Водночас виявлена синхронізація міцних взаємовідносин ($r = 0,82$) між структурами лімбічної системи мозку: *Hpt*, *Hip* та *nAcc*, що відображає міцні нейрональні взаємозв'язки в системі емоційно-мотиваційного збудження, а на думку G. Fein — тяжкість алкогольної залежності [17].

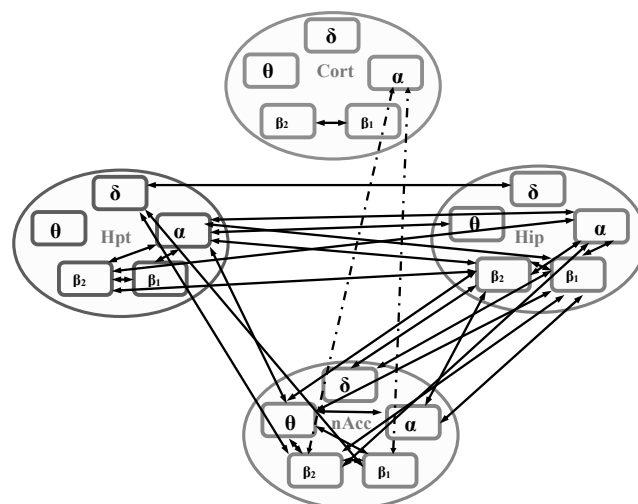


Рис. 3. Кореляційні взаємозв'язки між показниками спектральної потужності ритмів EEG структур мозку щурів після тривалого приймання алкоголю (за Conte R. et al. [8]): $\alpha, \beta_1, \beta_2, \delta, \theta$ — біопотенціали мозку; \longleftrightarrow — прямопропорційні зв'язки, \dashrightarrow — зворотнопропорційні зв'язки

При тривалому вживанні алкоголю відзначалось зниження рівня кортизолу в *Hpt*, що може свідчити про трансформацію центральних механізмів регуляції вивільнення гормону з надниркових залоз в сироватку крові.

Хронічне вживання алкоголю щурами протягом двох місяців призводить до активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи, що в нашому дослідженні проявлялось підвищенням рівня кортизолу в сироватці крові щурів до 150 % (рис. 4). Підвищення глюкокортикоїдів в сироватці крові завдяки механізму проникнення стероїдних гормонів крізь гематоенцефалічний бар'єр в *Hpt* призводить до залучення механізму негативного зворотного зв'язку, одним з елементів якого є компенсаторна активація гіпоталамічної опіоїдергічної системи [18].

Дослідження розподілу і змін вмісту катехоламінів показало, що різні ланки катехоламінергічних систем головного мозку по-різному залучені до підтримання функціонування організму. Стан мотиваційного збудження при хронічному прийманні алкоголю супроводжувався активацією мезолімбічної ланки дофамінергічної системи [19], цьому відповідає підвищення рівня дофаміну в *nAcc* до 167 %. Цей стан підтримується також і підвищенням в *nAcc* концентрації норадреналіну до 168 %, також спостерігались відмітні зміни активності центральної адренергічної системи з медіатором адреналіном: підвищення рівня адреналіну до 157 % в *VTA* — зоні похо-

дження дофамінергічних нейронів, які іннервують *nAcc* (див. рис. 4). Функціональна активність структур мозку, які досліджували, відіграє важливу роль в підтримці та регуляції емоційно-мотиваційних станів, зокрема — стану алкогольної залежності.

Виявлено, що ГАМК-ергічна активність по-різному змінюється в окремих структурах головного мозку щурів під впливом формування алкогольної залежності. В *Hip* та *Cort* спостерігалось зниження концентрації ГАМК на 30 % та 19 % відповідно, а в *Am* — навпаки — підвищення на 24 %. Водночас в гіпокампі було відзначено зниження концентрації BDNF на 26 % та кортизолу — на 18 % (див. рис. 4).

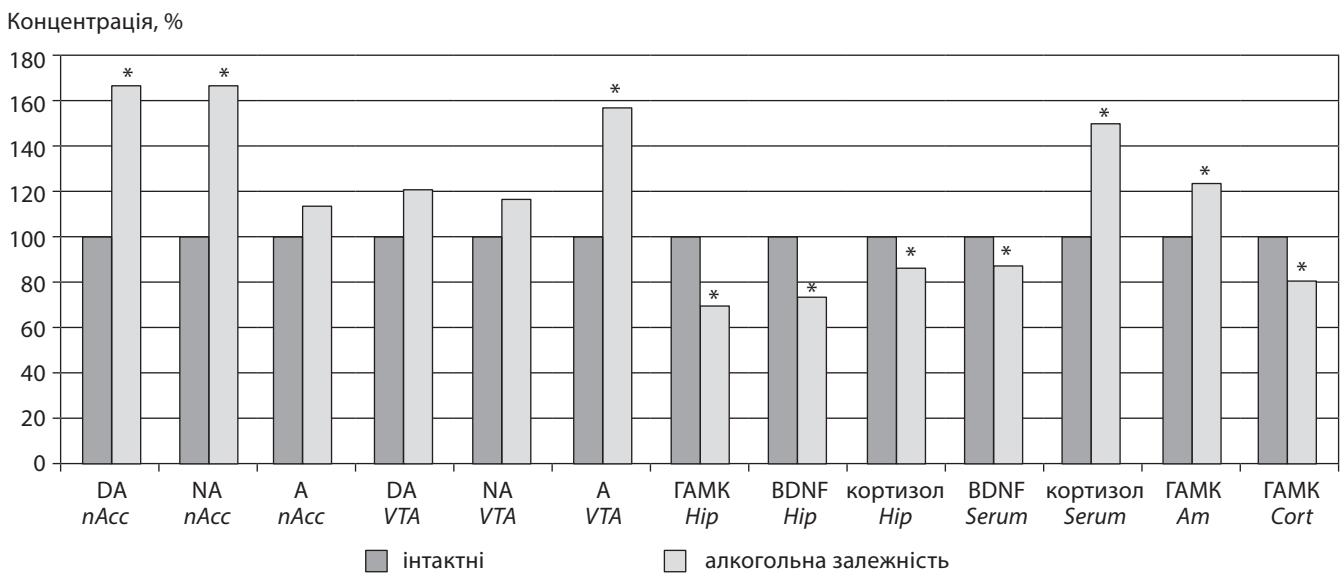


Рис. 4. Зміни концентрації дофаміну (DA), норадреналіну (NA), адреналіну (A), ГАМК, BDNF та кортизолу в прилеглому ядрі (*nAcc*), вентральній тегментальній зоні (*VTA*), гіпокампі (*Hip*), неокортексі (*Cort*), мигдалеподібному комплексі (*Am*) та сироватці крові (*Serum*) інтактних щурів та щурів з алкогольною залежністю:

* — $p < 0,05$ порівняно з показниками інтактних щурів

У сироватці крові спостерігалось зниження вмісту BDNF на тлі двократного підвищення концентрації кортизолу, що свідчило про напружений стан функціонування системи адаптації. Тобто, для алкогольної залежності щурів характерно напруження глюкокортикоїдної ланки системи адаптації, пригнічення гальмівних та нейротрофічних процесів у *Hip*, розгальмування неокортексту та активація інгібіторних механізмів у *Am* (див. рис. 4).

Отже, при алкогольній залежності на системному та молекулярному рівнях виявлено зміни нейропластичності в лімбіко-неокортикальній системі мозку з послабленням впливів неокортексту. Мотиваційне збудження при алкогольній залежності підтримується активацією дофамінергічної мезокортикальної системи мозку та пригніченням гальмівної ГАМК-ергічної нейромедіації і нейротрофічних процесів у *Hip* та *Cort*. Дисфункція в нейромедіаторній системі «збудження — гальмування» разом з напруженим функціонуванням периферійної ланки системної адаптації є ключовими чинниками порушення механізмів регуляції циклу неспання — сон та розладів

емоційної поведінки. Виявлений взаємний підсилювальний вплив цих процесів треба брати до уваги під час терапії алкоголізму та прогнозування рецидивів. Істотне послаблення нейротрофічних процесів в *Hip* та його віддзеркалення у зниженні BDNF в сироватці крові, є важливим молекулярним біомаркером емоційно-когнітивної дисфункції при алкогольній залежності.

Список літератури

- Spanagel R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior // *Physiological reviews*. 2009. Vol. 89 (2). P. 649—705. DOI: 10.1152/physrev.00013.2008.
- Koob G. F., Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis // *Neuropsychopharmacology*. 2001. Vol. 24 (2). P. 97—129. DOI: 10.1016/s0893-133x(00)00195-0.
- Russo S. J., Mazei-Robison M. S., Ables J. L., Nestler E. J. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction // *Neuropharmacology*. 2009. 56 Suppl 1. P. 73—82. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.06.059.
- Brain regional gene expression network analysis identifies unique interactions between chronic ethanol exposure and consumption / Smith M. L., Lopez M. F., Wolen A. R. [et al.] //

PLoS One. 2020. Vol. 15 (5). P. 1—26. DOI: 10.1371/journal.pone.0233319.

5. Воробьева Т. М. Нейробиология вторично приобретенных мотиваций // Международный медицинский журнал. 2002. № 1—2. С. 211—217.

6. Koob G. F., Volkow N. D. Neurocircuitry of addiction: a neurocircuitry analysis // Lancet Psychiatry. 2016 Aug; 3(8): 760—773. DOI: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8.

7. Веселовська О. В., Шляхова А. В., Берченко О. Г., Тіткова А. М. Нейроадаптація в системі емоційного підкріплення при алкогольній залежності // Український вісник психоневрології. 2020. Т. 28, вип. 2 (103). С. 22—5. DOI: 10.36927/2079-0325-V28-is2-2020-4.

8. Behavioral and stereological analysis of the prefrontal cortex of rats submitted to chronic alcohol intake / Conte R., Ladd F. V. L., Ladd A. A. B. L. [et al.] // Behav Brain Res. 2019. Vol. 362. P. 21—7. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.01.003.

9. Wolen A. R., Miles M. F. Identifying gene networks underlying the neurobiology of ethanol and alcoholism // Alcohol research. 2012. Vol. 34 (3). P. 306—17. PMID: 23134046.

10. Homberg J. R., Molteni R., Calabrese F., Riva M. A. The serotonin-BDNF duo: developmental implications of the vulnerability to psychopathology // Neurosci. Biobehav. Rev. 2014. Vol. 43. P. 35—47. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.012.

11. Родина В. И., Крупина Н. А., Крыжановский Г. Н., Окнина Н. Б. Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // Журнал высшей нервной деятельности. 1993. Вып. 5. С. 1006—1016. PMID: 8249450.

12. Loskutova L. V., Shtark M. B., Epstein O. I. Efficiency of ultra-low doses of antibodies to S100 protein and delta sleep-inducing peptide in rats with anxious depression // Bull Exp Biol Med. 2003 Jan; 135 Suppl 7: 20—2. DOI: 10.1023/A:1024797722719.

13. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведению. Москва : Высшая школа; 1991. 399 с.

14. Olds J., Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain // J. Comp. Physiol. Psychol. 1954. No. 47. P. 419—27. DOI: 10.1037/h0058775.

15. Drucker-Colin E. R. Chronic administration of chloramphenicol — a protein synthesis inhibitor selectively decreases REM sleep // Behav. and Neurol. Biol. 1980. Vol. 29. P. 410—413. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(80\)90449-5](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(80)90449-5).

16. Brower K. J. Alcohol's Effects on Sleep in Alcoholics // Alcohol Res Health. 2001. Vol. 25(2). P. 110—125. PMID: 11584550.

17. Fein G., Cardenas V. A. Neuroplasticity in human alcoholism: studies of extended abstinence with potential treatment

implications // Alcohol Research. 2015. Vol. 37 (1). P. 125—41. PMID: 26259093.

18. Rachdaoui N., Sarkar D. K., Phil D. Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system // Alcohol Research. 2017. Vol. 38 (2). P. 255—76. PMID: 28988577.

19. Keiflin R., Janak P. H. Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry // Neuron. 2015. Vol. 88 (2). P. 247—63. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.037.

Надійшла до редакції 11.05.2021

Відомості про авторів:

БЕРЧЕНКО Ольга Григорівна, доктор біологічних наук, професор, завідувачка лабораторії*

ТІТКОВА Анна Маратівна, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник лабораторії*

ШЛЯХОВА Анна Володимирівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, старший науковий співробітник лабораторії*

ВЕСЕЛОВСЬКА Олена Валеріївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, старший науковий співробітник лабораторії*; e-mail: nbi.inpn@ukr.net

ПРИХОДЬКО Олена Олександрівна, молодший науковий співробітник лабораторії*

* — лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії Державної установи «Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна

Information about the authors:

BERCHENKO Olga, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory**

TITKOVA Anna, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory**

SHLIAKHOVA Anna, PhD in Biological Sciences, Research Associate Professor, Senior Researcher of Laboratory**

VESELOVSKA Olena, PhD in Biological Sciences, Research Associate Professor, Senior Researcher of the Laboratory**, e-mail: nbi.inpn@ukr.net

PRIKHODKO Olena, Junior Researcher of the Laboratory**

** — Laboratory of Neurophysiology, Immunology and Biochemistry of State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine