

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки  
«Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук»**

На правах рукописи

**Стратилов Виктор Андреевич**

**МЕХАНИЗМЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К НИКОТИНОВОЙ  
ЗАВИСИМОСТИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ  
ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

**Диссертация**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

Тюлькова Екатерина Иосифовна

Санкт-Петербург

2022

## **Оглавление**

<b>1. ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
1.1. Актуальность темы исследования .....	5
1.2. Степень разработанности темы исследования .....	6
1.3. Цель работы.....	8
1.4. Методология и методы исследования .....	8
1.5. Научная новизна.....	10
1.6. Теоретическая и практическая значимость работы .....	10
1.7. Основные положения, выносимые на защиту .....	11
1.8. Апробация результатов .....	12
1.9. Личное участие автора в получении результатов.....	17
1.10. Структура и объем диссертации.....	17
1.11. Финансовая поддержка и благодарности .....	17
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>18</b>
2.1. Формирование дофаминергической системы мозга в раннем онтогенезе .....	18
2.2. Понятие аддиктивных патологий, основные структуры, участвующие в развитии аддикций .....	21
2.3. Современные представления о развитии никотиновой зависимости .....	23
2.4. Перинатальный стресс и развитие наркотической зависимости	
27	
2.5. Пренатальная гипоксия, как частный случай перинатального стресса и многофакторная патология развития плода. Влияние пренатальной гипоксии на глюкокортикоидную систему мозга.....	31

<b>2.6. Вызванные пренатальной гипоксией нарушения в глутаматергической системе мозга .....</b>	<b>35</b>
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Животные.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Оценка свободного потребления никотина.....</b>	<b>43</b>
3.3.1. Хирургические процедуры .....	43
3.3.2. Оценка мотивационного эффекта мекамиламина после хронического парентерального введения никотина в тестовой установке с рисунком .....	44
3.3.3. Оценка мотивационного эффекта мекамиламина после хронического парентерального введения никотина в черно-белой тестовой установке .....	46
<b>3.4. Оценка уровня дофамина методом ИФА.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5. Анализ белков DAR1, pThr34DARPP-32, кальцинейрина и GR методом вестерн blot.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6. Иммунофлюоресцентный анализ .....</b>	<b>47</b>
3.6.1. Пробоподготовка .....	47
3.6.2. Иммунофлюоресцентная детекция .....	48
<b>3.7. ПЦР в реальном времени.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8 Статистический анализ .....</b>	<b>50</b>
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Эффекты пренатальной гипоксии на динамику потребления никотина у взрослых крыс .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Эффект хронического парентерального введения никотина на синдром отмены, спровоцированный однократным введением мекамиламина у ПГ крыс.....</b>	<b>51</b>

<b>4.3. Содержание дофамина и DAR1 в структурах мезолибического пути</b>	<b>54</b>
<b>4.4. Степень фосфорилирования белка DARPP-32 по 34 треониновому остатку в NAc и PFC.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5. Изменения экспрессии гена <i>chrna7</i> в структурах лимбической системы.....</b>	<b>58</b>
<b>4.6. Эффект пренатальной гипоксии на VGlut2-позитивную глутаматергическую иннервацию Nurr1 позитивных нейронов VTA</b>	<b>63</b>
<b>4.7. Эффект пренатальной гипоксии на количество GR в иннервирующем VTA гипоталамусе .....</b>	<b>64</b>
<b>5. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>65</b>
<b>6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>72</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>75</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>77</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>78</b>

# **1. ВВЕДЕНИЕ**

## **1.1.Актуальность темы исследования**

Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариабельности индивидуальной предрасположенности к зависимостям [1,2]. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций [3,4], однако до сих пор не сформирована цельная картина представлений о влиянии факторов внешней среды, особенно в период перинатального онтогенеза, на эффективность функционирования системы «вознаграждения».

Клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают влияние стресса матери, сопровождающегося выбросом эндогенных глюкокортикоидных гормонов, а также патологий плаценты на дальнейшее физическое [5–8] и когнитивное развитие потомства. Кроме того, рассматривается влияние пренатального стресса на склонность к таким социально значимым аддиктивным расстройствам, как наркотическая, алкогольная и никотиновая зависимости у взрослых. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса [9,10] и возможна при различных условиях, включая беременность с анемией, плацентарной недостаточностью, сдавлением пуповины, преэкламсией, заболеваниями сердца, легких и почек, а также при гемоглобинопатиях [11–13]. Нарушения развития мозга, вызванные гипоксией и асфиксиею, встречаются примерно у 2% доношенных и почти у 60% недоношенных новорожденных детей [14,15]. Известно, что пренатальная гипоксия приводит к длительным модификациям глюкокортикоидной и глутаматергической систем мозга потомства [9,16], которые могут обуславливать изменения в развитии дофаминергической системы, лежащей в основе аддиктивных патологий. В настоящем исследовании была произведена оценка влияния такого широко распространённого неблагоприятного фактора, как пренатальная гипоксия, на

дальнейшее развитие у потомства никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

По данным ВОЗ ежегодно в мире от последствий употребления табака погибает до 8 млн. человек [17]. То есть несмотря на то, что никотин не считается тяжелым наркотиком, его потребление наносит колossalный ущерб, и изучение причин предрасположенности к потреблению табака становится особенно актуальным. Поэтому настоящее исследование было направлено на оценку влияния пренатальной гипоксии на склонность к никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

## **1.2.Степень разработанности темы исследования**

Как и в других видах аддикций, ключевую роль в развитии никотиновой зависимости играет дофаминергическая система мозга, представленная нейронами вентральной тегментарной области (VTA), отдающими свои проекции (в основном) в прилежащее ядро стриатума (NAc) и префронтальную кору (PFC). Никотин свободно проникает через гематоэнцефалический барьер и с высокой аффинностью связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), представляющими собой лиганд-управляемые катионные каналы. Наиболее распространенными типами ацетилхолиновых рецепторов в мозге являются  $\alpha 4\beta 2$ nAChR и  $\alpha 7$ nAChR [18]. На телах дофаминергических нейронов VTA преимущественно расположены  $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Изначально предполагалось (и до сих пор считается основным механизмом развития никотиновой зависимости на ее ранних этапах), что в VTA никотин опосредует свой эффект именно через активацию  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, что в итоге способствует выбросу дофамина проекциями VTA в NAc и PFC [19–22]. Альтернативная гипотеза дополняет это представление наличием  $\alpha 7$ nAChR на пресинаптической мемbrane глутаматергических проекций как в VTA, так и в NAc [18,23]. Активация этих рецепторов никотином усиливает выброс глутамата в VTA, деполяризуя мемрану

дофаминергических нейронов [20], и таким образом вызывая опосредованную стимуляцию дофамин-рецептирующих клеток в NAc и PFC.

Пренатальная гипоксия (ПГ), смоделированная в настоящем исследовании на 14-16 сутки беременности, может как вызывать прямое повреждающее действие на дофаминергические нейроны, завершающие к этому моменту основной этап аксонального наведения к NAc, но начинающие микронаведение посредством системы ROBO-Slit1 [24], так и оказывать устойчивое модифицирующее влияние на процесс реализации генетических программ на эпигенетическом уровне и, тем самым, приводить к нарушениям развития и дальнейшего функционирования «системы вознаграждения» мозга.

Ранее нами было обнаружено, что ПГ во многом является частным случаем пренатального стресса. По имеющимся данным, патогенез ПГ является следствием нарушений глюкокортикоидной регуляции плода и дальнейших нарушений глюкокортикоид-зависимой транскрипции [9]. В частности, нами было показано изменение экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов метаболизма глутамата в гиппокампе ПГ крыс [16]. Сопоставляя данные об изменениях, возникающих в глутаматергической системе после пренатального стресса в различных областях мозга, с результатами изучения влияния наркотических веществ у интактных животных, можно предположить, что пренатальный стресс является фактором риска при развитии аддиктивных состояний. Было показано, что пренатальный стресс на третьей неделе гестации крыс усиливает медиаторный ответ в прилежащем ядре в ответ на инъекцию кокаина у взрослых экспериментальных животных по сравнению с контрольными [25].

Способствуя выработке и усугубляя течение наркотической зависимости, морффункциональные изменения структур мозга под влиянием пренатального стресса потенциально могут пролонгировать абстинентный синдром и вызывать мощный глутаматный ответ даже после однократного

введения наркотических веществ [25]. В ряде работ показано вовлечение глутаматных рецепторов в формирование и закрепление никотиновой зависимости [26–28]. Таким образом, потенциальные изменения в глутаматергической трансдукции гиппокампа и других структур мозга, иннервирующих структуры мезокортиколимбической системы могут влиять на развитие аддикций, ввиду их обширной глутаматергической иннервации.

### **1.3. Цель работы**

**Целью исследования** являлась оценка влияния пренатальной гипоксии на склонность к никотиновой зависимости у взрослых крыс и выяснение возможных механизмов, приводящих к ее развитию.

### **Задачи исследования:**

1. Сравнить динамику потребления никотина и тяжесть синдрома отмены у взрослых интактных крыс и крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии.
2. Изучить особенности функционирования дофаминергической системы мозга крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии.
3. Оценить экспрессию глюкокортикоид-зависимого гена *chrna7*, кодирующего пресинаптический  $\alpha 7$ nAChR регулирующий выброс глутамата в структурах мезокортиколимбической системы и гиппокампе крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии.
4. Оценить эффективность глутаматного сигналинга, регулирующего активность дофаминергических нейронов вентральной тегментарной области мозга крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии.
5. Количественно оценить уровень глюкокортикоидных рецепторов в гипоталамусе, глутаматергически иннервирующем вентральную тегментарную область крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии.

### **1.4. Методология и методы исследования**

Моделирование ПГ производилось посредством апробированного ранее в Лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им.

И.П.Павлова РАН метода предъявления самкам крыс на 14-16 сутки беременности тяжелой гипобарической гипоксии (180 мм.рт.ст, 3 часа, 3 воздействия с интервалом 24 часа).

Решение поставленных задач, направленных на выявление у ПГ крыс склонности к никотиновой зависимости требовало применения поведенческих методов. В работе были использованы 2 теста. Первый тест, на свободное потребление никотина, предполагал наличие у каждой крысы доступ к 2 поилкам, содержащим или не содержащим никотин в установленной дозе. Второй тест выполнялся для оценки тяжести синдрома отмены, играющего важную роль в компульсивном потреблении никотина. Для этого крысам имплантировали осмотические помпы Alzet, обеспечивающие подкожное поступление никотина в одинаковой дозировке на протяжении 2 недель. Далее тестировался синдром отмены, возникающий через сутки после окончания введения никотина и усиленный однократным введением мекамиламина – антагониста nAChR. Тестирование аверсии к введенному мекамиламину производилось в teste предпочтения места [29].

Дальнейшие исследования были направлены на выявление механизмов склонности к никотиновой зависимости у ПГ крыс. Был проведен базовый скрининг дофаминергической системы, включающий количественный анализ дофамина в VTA и вентральном стриатуме (прямой иммуноферментный анализ, ИФА), а также оценку количества дофаминовых рецепторов 1 типа (DAR1), кальцийнейрина и степени фосфорилирования релейного для дофаминового и глутаматного сигналинга белка DARPP-32 по 34 треониновому остатку в NAc (вестерн блот). Для выяснения причины повышенной степени фосфорилирования DARPP-32 в NAc, у ПГ крыс была изучена колокализация VGluT2 (везикулярный глутаматный транспортер 2 типа) - позитивных терминалей на телах дофаминергических (Nurr1-позитивных) нейронов VTA методом флюоресцентной иммуногистохимии.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) было также оценено количество мРНК глюокортикоид-зависимого гена *chrna7*, кодирующего α7nAChR.

### **1.5.Научная новизна**

В ходе проведенных исследований впервые показано, что пренатальная гипоксия провоцирует повышенную склонность к потреблению никотина и усиливает синдром отмены у взрослых крыс.

Впервые установлено, что пренатальная гипоксия не вызывает изменений в биосинтезе дофамина в VTA, его транспортировке вентральный стриатум и количестве дофаминовых рецепторов первого типа в NAc, но изменяет паттерн фосфорилирования белка DARPP-32, что, по-видимому, связано с изменением глутаматной трансдукции как в NAc (предположительно ослаблении), так и в VTA (усилении).

При попытке найти объяснение повышенному фосфорилированию белка DARPP-32 по 34 треониновому остатку, впервые обнаружено усиление экспрессии гена *chrna7*, кодирующего субъединицы α7nAChR в глутаматергических проекциях, иннервирующих нейроны NAc. Кроме того, обнаружено усиление глутаматергической иннервации VTA, при нормальном уровне транскрипта *chrna7* в терминалях, приходящих к этой структуре, а также при нормальном уровне глюокортикоидных рецепторов в отдающем к VTA глутаматергические проекции гипоталамусе.

### **1.6.Теоретическая и практическая значимость работы**

Настоящая работа посвящена одной из фундаментальных проблемнейробиологии, связанной с изучением функциональных нарушений деятельности мозга, вызванных воздействием тяжелой гипоксии в пренатальном периоде развития. Полученные данные демонстрируют, что пренатальная гипоксия является фактором предрасположенности к развитию никотиновой зависимости.

Результаты инструментального анализа указывают на то, что основным патогенетическим звеном в связанной с ПГ никотиновой зависимости является усиленная глутаматергическая стимуляция VTA. Также предполагается ослабление глутаматергической стимуляции NAc проекциями вентрального гиппокампа, что, однако, требует дальнейшей проверки.

Полученные приоритетные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов нарушения функций мозга, вызываемых тяжелой гипоксией в пренатальном периоде. Высокая практическая значимость работы определяется тем, что понимание механизмов нарушений, вызываемых внешними воздействиями в пренатальном периоде и влекущими за собой повышение вероятности склонности к аддикциям, позволит разработать принципиально новые подходы к диагностике и коррекции зависимости на ранних этапах онтогенеза. Полученные результаты на молекулярно-клеточном уровне могут быть использованы при создании нового поколения эффективных фармакологических препаратов, оказывающих направленное действие на ключевые звенья повреждающих механизмов, связанных с гиперактивацией глутаматергической сигнальной трансдукции.

### **1.7.Основные положения, выносимые на защиту**

1. Пренатальная гипоксия является фактором предрасположенности к никотиновой зависимости во взрослом возрасте, что проявляется в повышенной склонности к потреблению никотина и выраженному синдроме отмены.
2. Увеличенное фосфорилирование DARPP-32 в прилежащем ядре стриатума на фоне отсутствия изменений количества дофамина и DAR1 в мезолимбическом пути указывает на изменения глутаматной стимуляции прилежащего ядра стриатума (предположительно ослабление) или вентральной тегментарной области (усиление) у крыс, переживших пренатальную гипоксию.

3. Изменение количества глюкокортикоид-зависимой мРНК *chrna7*, кодирующей  $\alpha 7$ nAChR, коррелирует с изменением количества мРНК *nr3c1*, кодирующей глюкокортикоидный рецептор. У 2-недельных крыс, переживших пренатальную гипоксию, количество *chrna7* увеличено в префронтальной коре и снижено в гиппокампе. У 3-месячных крыс увеличение экспрессии *chrna7* затрагивает структуры вентрального стриатума, что объясняет усиление чувствительности ПГ крыс к никотину.
4. Положительно регулируемая ацетилхолином / никотином глутаматергическая иннервация в вентральной тегментарной области крыс, переживших пренатальную гипоксию, увеличена при нормальном уровне экспрессируемой *chrna7*, что вероятно является фактором повышенной склонности к никотиновой зависимости.
5. В иннервирующем вентральную тегментарную область гипоталамусе сохраняется нормальный уровень глюкокортикоидных рецепторов, а в самих проекциях к вентральной тегментарной области обнаружена положительная корреляция между экспрессией *chrna7* и геном, кодирующим глюкокортикоидный рецептор *nr3c1*.

### **1.8.Апробация результатов**

Результаты получены с помощью современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и 18 тезисов конференций. Результаты работы были представлены на 6 ведущих зарубежных конференциях:

1. Stratilov V., Vetrovoy O., Tyulkova E. Increased propensity to nicotine consumption in adult rats exposed to prenatal hypoxia is accompanied by alterations in the dopamine-glutamate crosstalk. 1st ESN virtual conference

«Future perspectives for European neurochemistry – a young scientist's conference».  
2021

2. Stratilov V., Vetrovoy O., Tyulkova E. Prenatal hypoxia-induced alterations are accompanied with malfunction of glutamatergic system in rat hippocampus. // ISN-ASN Meeting, Montreal, Canada, 4-8.08.2019. Journal of Neurochemistry. 2019 International Society for Neurochemistry
3. Vetrovoy O., Stratilov V., Nimiritsky P., Tyulkova E. «Prenatal severe hypoxia induces persistent central and peripheral violations of the glucocorticoid system regulation in postnatal ontogenesis of rats» Online FENS Forum of Neuroscience Glasgow, Scotland 11-15.07.2020
4. Vetrovoy O., Stratilov V., Tyulkova E. Prenatal hypoxia-induced premature aging is accompanied with malfunction of glutamatergic system in rat hippocampus. // 23rd ESN Biennial Meeting, 7th Conference on molecular mechanisms of regulation in the nervous system. 1-4 September 2019, Milan, Italy.
5. Sarieva K., Vetrovoy O., Stratilov V., Tyulkova E. Prenatal hypoxic stress causes glutamatergic deficit on different stages of postnatal development. FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Germany, 6-11.07.2018

**А также на следующих Всероссийских международных конференциях:**

1. Стратилов В.А., Ветровой О.В., Ломерт Е.В. Нарушение глюкокортикоид-зависимой экспрессии гена *chrna7* и генов глутаматергической системы вследствие пренатальной гипоксии, как возможный механизм склонности к никотиновой зависимости. XXVIII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОМЕДИЦИНЫ – 2022». Санкт-Петербург, 2022.
2. Стратилов В.А., Ветровой О.В. Повышенная склонность к потреблению никотина у взрослых крыс, переживших пренатальную гипоксию, сопровождается изменениями взаимодействия между глутамат- и дофаминергической системами мозга. XXIV Международная медико-

биологическая конференция молодых исследователей. Санкт-Петербург, 2021.

3. **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В. Влияние пренатальной гипоксии на потребление никотина и синдром отмены у взрослых крыс. XXVII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОМЕДИЦИНЫ – 2021». Санкт-Петербург, 2021.
4. **Стратилов В.А** Патологические воздействия неблагоприятных факторов пренатального развития на функции мозга, способности к обучению и проявления аддикций. V МЕЖДУНАРОДНАЯ ШКОЛА-СЕМИНАР ПО РАННЕЙ ПОМОЩИ ДЕТЕЯМ И ИХ СЕМЬЯМ: ОТ ТЕОРИИ К ПРАКТИКЕ. Санкт-Петербург, 2021.
5. **Стратилов В.А.** Повышенная склонность к потреблению никотина у взрослых крыс, переживших пренатальную гипоксию, сопровождается изменениями взаимодействия между глутамат- и дофаминергической системами мозга. Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2021», Москва. 2021
6. **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В., Тюлькова Е.И. Влияние пренатальной гипоксии на развитие никотиновой зависимости у взрослых крыс. XXIV НАУЧНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ПО ФИЗИОЛОГИИ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ. Москва. 2020.
7. **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В., Тюлькова Е.И. Влияние пренатальной гипоксии на развитие никотиновой зависимости у взрослых крыс. XXIII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии., г. Москва, 28-30.10.2020
8. **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В. Нарушение регуляции глюкокортикоидной системы потомства крыс в результате стрессорного ответа матери на гипоксию как механизм состояния раннего старения. 24я

Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пущино, 5-7.10.2020

9. Тюлькова Е.И., **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В. «Нарушения работы глутаматергической системы мозга вследствие пренатальной гипоксии обуславливают преждевременное старение» VII Всероссийская конференция с международным участием «Геномная медицина в пренатальной диагностике, генетическом паспорте и в генной терапии» СПб, 12-13.11.2020
10. Тюлькова Е.И., **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В. «Вызываемое пренатальной гипоксией преждевременное старение и его глутаматергические механизмы» XVI всероссийское совещание с международным участием и IX школа по эволюционной физиологии СПб 19-24.10.2020
11. Ветровой О.В., Тюлькова Е.И., **Стратилов В.А.** «Центральные и периферические механизмы нарушений глюкокортикоидной системы при пренатальной гипоксии» XVI всероссийское совещание с международным участием и IX школа по эволюционной физиологии СПб 19-24.10.2020
12. Ветровой О.В., **Стратилов В.А.**, Е.И. Тюлькова. Нарушения функционирования глутаматной системы гиппокампа потомства крыс, вызванные стрессорным ответом матери на гипоксию, вовлекаются в формирования возраст-ассоциированного когнитивного дефицита. // IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, Москва, 20-23.11.2019
13. **Стратилов В.А.**, Ветровой О.В, Тюлькова Е.И. Вызванные гипоксией нарушения сопровождаются изменением функционирования глутаматергической системы в гиппокампе крысы. // 23я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - Наука XXI века", г. Пущино, 16-19.04.2019
14. Тюлькова Е.И., Ветровой О.В., **Стратилов В.А.**, Ватаева Л.А. Нарушения развития мозга в пренатальном периоде могут приводить к

раннему старению. Интегративная Физиология, Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. С. 248-249. Санкт-Петербург, 24–26.09.2019

15. Тюлькова Е.И., Ветровой О.В., Сариева К.В., **Стратилов В.А.** Механизмы преждевременного старения, индуцируемого пренатальной гипоксией. // Acta Naturaе. Спецвыпуск. 2019. Т. 1. С. 150. Научные труды II Объединенного научного Форума. Сочи – Дагомыс, 1-6 октября 2019.

**По теме работы были опубликованы следующие статьи:**

1. Л.А. Ватаева, Е.И. Тюлькова, А.Н. Алёхин, **В.А. Стратилов** (2019) Влияние гипоксии или дексаметазона в различные сроки гестации на проявление условно-рефлекторного страха у взрослых крыс. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, том 54, номер 6, с. 392-398.
2. Е.И. Тюлькова, Л.А. Ватаева, **В.А. Стратилов**, В.С. Барышева, О.В. Ветровой (2020) Особенности метилирования ДНК и гистона Н3 в гиппокампе и неокортексе крыс, переживших патологические воздействия в пренатальном периоде развития. Нейрохимия, том 37, номер 1, с. 64-74.
3. **В.А. Стратилов**, Е.И. Тюлькова, О.В. Ветровой (2020) Пренатальный стресс как фактор развития аддиктивных состояний. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, том 56, номер 6, с. 413-429.
4. O. Vetrovoy, E. Tyulkova, **V. Stratilov**, K. Baranova, P. Nimiritsky, P. Makarevich, E. Rybnikova (2020) Long-term effects of the prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats. Developmental Neuroscience, DOI:10.1159/000512223 (IF 3,041)
5. **В.А. Стратилов**, О.В. Ветровой, Л.А. Ватаева, Е.И. Тюлькова (2021) Ассоциированные с возрастом изменения в исследовательской активности в тесте «Открытое поле» у крыс, переживших пренатальную гипоксию. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова, том 71, номер 3, с. 428–436.

6. O. Vetrovoy, **V. Stratilov**, P. Nimiritsky, P. Makarevich, E. Tyulkova (2021) Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by disturbed function of glutamatergic system in rat hippocampus. Neurochemical Research, DOI: 10.1007/s11064-020-03191-z (IF 3,038)
7. **V. Stratilov**, O. Vetrovoy, E. Tyulkova (2022) Prenatal hypoxia affects nicotine consumption and withdrawal in adult rats via impairment of the glutamate system in the brain. Molecular Neurobiology, DOI: 10.1007/s12035-022-02866-8 (IF 5,59)

### **1.9.Личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад автора состоял в анализе литературы по проблеме исследования, разработке гипотезы, планировании экспериментов и их выполнении, статистической обработке полученных результатов, обсуждении результатов, подготовке публикаций по теме диссертации. Участие автора в анализе литературы – 90%, статистической обработке результатов – 95%, подготовке статей и тезисов докладов – 95%, написании диссертации и автореферата – 95-100%.

### **1.10.Структура и объем диссертации**

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы».

### **1.11.Финансовая поддержка и благодарности**

В первую очередь автор выражает благодарность своему научному руководителю (Тюлькова Е.И.) и коллеге (Ветровому О.В.), без участия и наставления которых этот проект не был бы реализован. Также хотелось бы поблагодарить сотрудников Лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН, совместно с которыми были

проведены эксперименты на животных (Аксенова Е.В., Лаврова Е.Н.). Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90003.

## **2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **2.1.Формирование дофаминергической системы мозга в раннем онтогенезе**

Первые исследования дофамина как нейромедиатора начались более полувека назад с изучения центральных механизмов действия резерпина и исследования болезни Паркинсона. В современном представлении дофаминергическая система, обеспечивая такие функции центральной нервной системы, как мотивация и концентрация внимания, опосредованные внутренним подкреплением, является основой психической пластичности и выполняет роль регулятора “тонкой настройки” работы головного мозга. Дофаминергические нейроны располагаются в черной субстанции и вентральной тегментарной области (VTA), проецируя нервные окончания на различные структуры мозга и, тем самым, образуя сложную нейромодуляторную систему, необходимую для многочисленных двигательных, когнитивных и мотивационных процессов. Нейроны черной субстанции проецируются к дорсальному стриатуму, образуя нигростриатную систему отвечают за волевой контроль движения. Нейродегенерация нейронов нигростриатной системы приводит к нарушению моторных функций и развитию широко известной болезни Паркинсона [30]. Дофаминергические нейроны VTA проецируют эfferентные пути в вентральный стриатум и префронтальную кору (PFC) и образуют, соответственно, мезостриатный и мезокортикальный дофаминовые пути [31]. Именуемые вместе как мезокортиколимбический путь, они отвечают за эмоциональные функции дофаминергической системы, в частности за чувство удовольствия [32,33]. В литературе широко рассматриваются такие функции дофаминергической системы, как механизм “ошибки предсказания” (Prediction error), оценка

внешнего события как положительное или отрицательное (Valience signaling), определение его значимости среди других внешних событий (Salience signaling) [34,35]. Так как дофаминергическая система играет важную роль в оценке результата обучения, изменения, возникающие в нейронах данной системы, потенциально могут приводить к ментальным девиациям, от аддиктивных расстройств до шизофрении [36,37].

Стандартным способом выявления зрелых дофаминергических нейронов долгое время была признана двойная имmunогистохимическая визуализация фермента пути биосинтеза дофамина тирозингидроксилазы (TH) и дофаминового транспортера (DAT), обеспечивающего процесс обратного захвата дофамина [38]. Основные исследования клеток-предшественников дофаминергических нейронов проводились относительно недавно после открытия ряда транскрипционных факторов, характерных для прогениторных клеток дофаминергической системы. Для выявления клеток-предшественников дофаминергических нейронов ключевыми маркерами являются транскрипционные факторы PITX3 (Pituitary homeobox 3), LMX1b (LIM homeobox transcription factor 1-beta), OTX2 (Orthodenticle homeobox 2) и Nurr1 (Nuclear receptor related 1) [39]. Клетки-предшественники дофаминергических нейронов локализуются на центральной срединной линии нервной трубы [40]. В период раннего пренатального развития граница среднего мозга определяется сигналами истмического организатора, участка, который развивается на стыке среднего и заднего мозга и регулирует дифференцировку соседних нейронов путем выделения сигнальных молекул [41,42]. У крыс дофаминергические нейроны зарождаются на 10 сутки пренатального развития на центральной средней линии базальной пластинки [40,43]. Именно к этому сроку клетки-предшественники начинают экспрессировать транскрипционный фактор Nurr1, который регулирует транскрипцию генов *th* и *dat* (тирозингидроксилаза и дофаминовый транспортер) [44,45]. Экспрессия Nurr1 продолжается и в постнатальном

онтогенезе, что делает данный белок универсальным маркером дофаминергических нейронов. К 12 суткам пренатального развития у крыс прогениторные клетки начинают синтезировать TH [46]. Кроме того, в это время клетки предшественники дофаминергических нейронов мигрируют в место их финального расположения (VTA и SN) [30], начинается экспрессия PITX3 [47,48]. В дальнейшем, вплоть до 15 суток пренатального онтогенеза, у уже находящихся на своем месте дофаминергических нейронов начинается рост аксонов в сторону их рецептивных зон. Имеется большое количество работ, посвященных изучению роста аксонов нейронов мезостриатного пути [30], остается малоизученным вопрос о развитии мезокортикального пути и о проекции дофаминергических нейронов в гиппокамп, латеральную хабенулу и миндалевидное тело.

При изучении развития патологий дофаминергической системы существенную роль играет процесс пренатальной иннервации дофаминергическими нейронами таргетных нервных структур. Важную роль в пространственной ориентации аксонов дофаминергических нейронов среднего мозга играют комплексы белков аксонального наведения: ROBO-Slit [49–51], NTN1/DCC [50,52]. Аксоны нейронов, экспрессирующих рецепторы ROBO, отталкиваются от структур, выделяющих лиганд Slit. Комбинированное действие ROBO-Slit комплекса участвует в росте аксонов к переднему мозгу [24,49,52–54]. У мышей, нокаутированных по генам DCC (рецептор к NTN1, активно экспрессируемый клетками-предшественниками дофаминергических нейронов), в постнатальном периоде отсутствует сенсибилизация к амфетамину [55], что говорит о большой роли данного сигнального пути в образовании синаптических контактов дофаминергических нейронов, а также о роли пластических изменений в развитии аддиктивных патологий.

При созревании дофаминергической системы большое значение имеет сбалансированная регуляция GR кортикостероидами матери [56], в связи с чем стрессорные воздействия во время беременности могут существенно повышать риск нарушения функций дофаминергической системы потомства, в частности способствуя развитию расстройств аддиктивного спектра и шизофрении [57,58].

## **2.2.Понятие аддиктивных патологий, основные структуры, участвующие в развитии аддикций**

Аддикции, или зависимости – это навязчивая патологическая потребность у субъекта в определенной деятельности, влекущей за собой срабатывание системы “вознаграждения” и “ожидания вознаграждения” [59] в мозге, преимущественно связанной с дофаминергическими структурами. Ставший историческим спор о том, положительное или отрицательное подкрепление играет ключевую роль в развитии и поддержании зависимости не утихает до сих пор. Несмотря на то, что генерализовать все типы наркотических препаратов по общему механизму действия опасно, в целом для большинства видов зависимостей стало понятно, что иницииирующими развитие аддиктивных патологий любого генеза являются структуры мезокортиколимбического пути, а именно VTA, NAc и PFC. Потому для понимания механизмов развития аддикций важным является знание основных принципов и физиологического смысла работы дофаминергической системы.

В общем виде предполагается, что к развитию аддикций приводит сначала формирование памяти о приятном опыте, а затем снижение чувствительности системы “вознаграждения” к естественным стимулам, и увеличение активности систем “эмоциональной памяти и подкрепления”, “мотивации к действию”, проявляющиеся в долгосрочной перспективе принятия аддиктивного препарата.

Первичным эффектом приема большинства наркотиков является активация дофаминовых рецепторов, спровоцированное либо прямым связыванием с агонистом, либо опосредованным выбросом дофамина. При этом количество свободного дофамина в синаптической щели варьирует от небольшого, короткого выброса с быстрым обратным захватом (алкоголь, никотин), до мощного накопления с нарушением механизмов обратного захвата (эффект эйфоретиков). Эйфоретики, такие как кокаин или амфетамины, приводящие к нарушению работы дофаминового транспортера прямо, или косвенно (через трейсаминовый путь, в случае амфетаминов), несомненно, являются одними из первых (за исключением опиатных наркотиков) в списке препаратов, приводящих к развитию зависимости. Повышение уровня синаптического дофамина [60] вследствие приема эйфоретиков даже превышает те уровни, которые являются результатом потребления пищи или занятия сексом [61], делая акт потребления наркотиков более значимым стимулом, заставляющим экспериментальных животных отказываться от приема пищи или спаривания. В экспериментах с внутривенным самоинъектированием эйфоретиков на животных показано, что даже короткие сессии самоинъектирования являются достаточными для запуска развития зависимости, а неограниченный доступ к возможности самоинъектирования приводит подопытных грызунов и обезьян к конвульсиям или смерти ввиду достижения летальных доз.

Несмотря на моментальный эффект, различающийся от препарата к препаратуре, за развитие полноценной зависимости отвечают длительные процессы, происходящие при неоднократном приеме наркотика. Наиболее важными тут являются мощные нейропластические процессы, приводящие к формированию памяти о наркотическом опыте. Кроме того, при длительном потреблении наркотика вовлекаются системы отрицательного подкрепления, обнаруживающие себя в компульсивном поведении.

С точки зрения многих исследователей, неконтролируемое потребление наркотиков скорее связано не с желанием повторения эйфории или десенсибилизацией системы вознаграждения, а скорее с негативными симптомами абстиненции, которые Куб назвал «дьяволом дисфории» (что, кстати, объясняет более быстрое развитие опиатной зависимости). Гипотеза Куба предполагает, что в дополнение к положительному подкреплению, которое имеет наиважнейшее и чуть ли не единственное значение на ранних этапах зависимости, негативное подкрепление обеспечивает невозможность отказа от наркотика на поздних этапах развития зависимости. Основой абстиненции являются нейроадаптивные изменения, возникающие при длительном потреблении наркотика в шипиковых нейронах NAc. В частности, они выражаются в снижении способности к долговременной потенциации [62,63], а также повышенной аденилатциклазной активности. Кроме того, увеличивается количество дендритных шипиков, по сути, представляющих собой глутаматный синапс с дофаминовой корегуляцией [64].

### **2.3. Современные представления о развитии никотиновой зависимости**

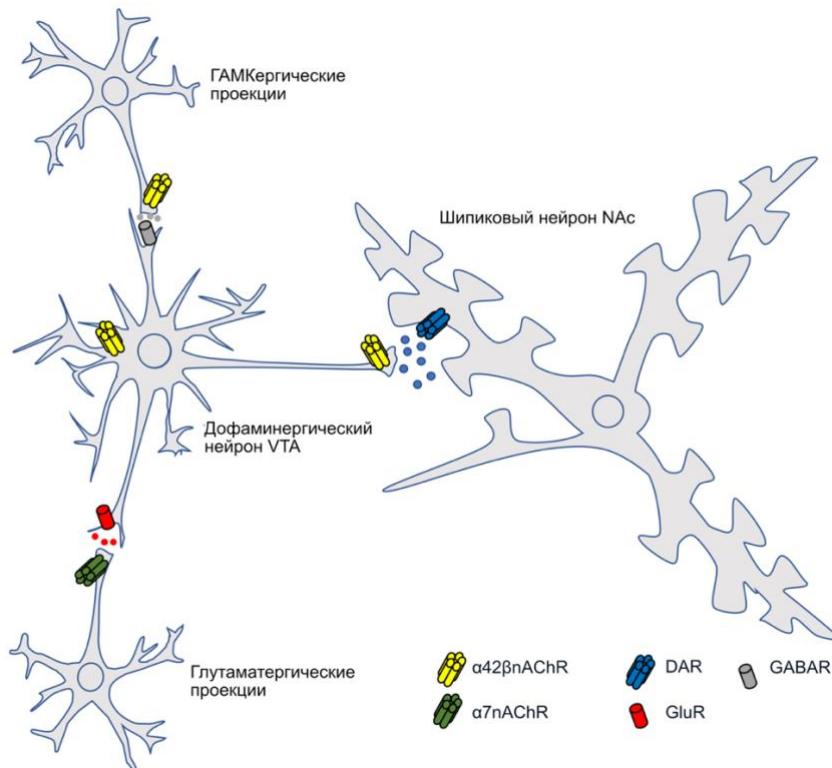
Несмотря на то, что никотин не считается тяжелым наркотиком, его потребление наносит колossalный ущерб. По данным ВОЗ ежегодно в мире от последствий употребления табака погибает до 8 млн. человек. Являясь основным компонентом табачного дыма, именно никотин отвечает за развитие табачной зависимости [17]. После вдыхания табачного дыма или растворов солей никотина, никотин быстро абсорбируется легочной тканью и проникает в легочную вену. Далее, никотин свободно проходит через гематоэнцефалический барьер и связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), представляющими собой катионные каналы [65]. В той или иной степени, активация nAChR и следующий за этим вход кальция приводят к выбросу различных нейромедиаторов во многих структурах мозга [66].

$\alpha 4\beta 2$ nAChR и  $\alpha 7$ nAChR являются наиболее распространенными типами ацетилхолиновых рецепторов в мозге [18]. Считается, что в VTA никотин опосредует свой эффект через активацию  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, колокализованных с глутаматными рецепторами на дофаминергических нейронах, что способствует выбросу дофамина (Рис. 1) [19–22]. Наиболее популярная точка зрения предполагает, что  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, расположенные преимущественно на телах дофаминергических нейронов, приводят к увеличению их спайковой активности и повышению уровня дофамина в NAc и PFC.  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, находящийся на дофаминергических нейронах VTA и на неглутаматных нейронах NAc играет ключевую роль на ранних этапах развития никотиновой зависимости, поскольку через него опосредуются подкрепляющие эффекты никотина. В экспериментах на грызунах с длительно выработанной никотиновой зависимостью было показано, что введение конкурентных ингибиторов и частичных агонистов  $\alpha 4\beta 2$ nAChR не влияет на дальнейший поиск и потребление никотина связанных с внешним условным стимулом [67,68], что говорит о несущественной роли данного рецептора на поздних этапах развития зависимости.

Альтернативная гипотеза дополняет это представление, предполагая также наличие nAChR на пресинаптической мемbrane глутаматергических проекций в VTA и в NAc. На аксонах глутаматергических нейронов располагаются исключительно  $\alpha 7$ nAChR рецепторы (Рис. 1) [18,23,69]. На уровне VTA активация этих рецепторов никотином усиливает выброс глутамата, который в свою очередь начинает оказывать свое возбуждающее действие на дофаминергические нейроны [20]. На уровне NAc участие  $\alpha 7$ nAChR в первичных эффектах никотина не до конца понятно [70]. В то время как введение антагонистов  $\alpha 4\beta 2$ nAChR на начальных этапах зависимости предотвращает ее развитие [71,72], введение антагонистов  $\alpha 7$ nAChR не влияет на развитие предпочтения к никотину.

Никотиновая зависимость, как и прочие, не развивается после однократного приема никотина. Быстрыми и первичными эффектами введения никотина является выброс дофамина в проекционных зонах мезокортиколимбического пути, что, несомненно, обусловлено активацией  $\alpha 4\beta 2nAChR$ , находящихся на телах и дендритах дофаминергических нейронов, однако за развитие зависимости отвечают более длительные пластические изменения в мозге, которые возникают в том числе в иннервирующих VTA и NAc проекциях при хроническом приеме никотина. Длительное потребление никотина ассоциировано с десенсибилизацией и уменьшением количества nAChR, причем скорость десенсибилизации среди разных видов нейронов отличается. Например, десенсибилизация никотином ГАМК-ergicических нейронов VTA, экспрессирующих гены субъединиц  $\alpha 4$  и  $\beta 2$  (как и дофаминергические нейроны) происходит быстрее, чем десенсибилизация глутаматергических нейронов, в связи с тем, что на их терминалях преобладают разные типы nAChR [73].  $\alpha 4\beta 2nAChR$  является гетеромером, высокоафинным к агонистам (активируется в наномолярных концентрациях) в то время, как гетеромер  $\alpha 7nAChR$  активируется при микромолярных концентрациях агониста.  $\alpha 7nAChR$  находящийся на глутаматергических терминалях как в NAc, так и в VTA, не десенсибилизируется низкими концентрациями никотина, попадающими в кровоток при курении табака [73,74]. В то же время  $\alpha 4\beta 2$ , преобладающий на телах дофаминергических нейронов и ГАМК интернейронах и ГАМК-терминалях десенсибилизируется в течение нескольких минут после введения никотина. В конце концов, это приводит к ослаблению выброса ГАМК в VTA по отношению к глутамату после приема никотина, а в свою очередь избыток глутамата и недостаток ГАМК опосредованно усиливают выброс дофамина в NAc [73]. Таким образом, в настоящее время сформирована гипотеза о том, что эффекты никотина на поздних этапах никотиновой зависимости опосредуются через выброс глутамата в VTA и NAc.

Введение конкретных антагонистов  $\alpha$ 7nAChR после длительно выработанной никотиновой зависимости у грызунов приводило к изменению в поиске и предпочтении никотина [67,75]. Различными научными группами также было показано, что никотин вызывает долговременную потенциацию нейронов гиппокампа, отдающего мощные глутаматергические проекции вентральный стриатум, усиливая NMDA-зависимые токи [76–78]. Кроме того, было отмечено увеличение уровня глутамата в ответ на предъявление никотина в неокортексе, дорсальном стриатуме, NAc и гипоталамусе [79–82], а введение антагониста ионотропных глутаматных рецепторов предотвращало никотин-индуцированное повышение дофамина в стриатуме, глутаматергически иннервируемого этими структурами [83]. Эти данные подтверждают локализацию nAChR на пресинапсе глутаматергических нейронов и важную роль обширной глутаматергической иннервации в развитии эффектов никотина.



**Рисунок 1. Организация мезостриатного пути и основные подтипы холинорецепторов.**

## **2.4.Перинатальный стресс и развитие наркотической зависимости**

Во взрослом организме существует явная зависимость между стрессом и развитием аддикций. Стressорная реакция опосредуется многими факторами, ключевая роль среди которых принадлежит глюокортикоидным гормонам. Глюокортикоиды оказывают свое влияние путем связывания с глюокортикоидными и минералокортикоидными рецепторами (GR и MR, соответственно), функционирующими как транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию большого числа генов, а также опосредующими быстрые негеномные эффекты в некоторых областях мозга [84,85]. Помимо обеспечения стрессорной реакции глюокортикоидам отводится центральная роль в поддержании метаболизма, регуляции иммунной системы и регенеративного потенциала взрослого организма, а также в правильном развитии плода. Кроме того, глюокортикоиды стимулируют выброс нейропептидов, таких как динорфин, энкефалин, тахикинин, кортиколиберин и нейротензин, особенно в области базальных ганглиев и NAc [86,87]. В эмбриогенезе GR экспрессируются в большинстве тканей, в фетальной и материнской частях плаценты. Участвуя в процессах органогенеза и гистогенеза, GR необходимы с самого начала эмбрионального развития. Для человека и грызунов показано, что изменения внутренней среды на ранних стадиях развития имеют решающее значение для программирования тканеспецифических паттернов экспрессии GR [88–93]. Для мозга, в частности, нормальная стимуляция GR критична для созревания дофаминергической системы, в особенности в мезолимбических участках [94].

Важнейшая роль глюокортикоидной системы матери в нормальном созревании плода предопределяет тяжесть последствий изменения ее функционирования в патогенезе пренатального стресса. Глюокортикоиды влияют на уязвимость мозга плода и новорожденного к гипоксии-ишемии, однако результаты противоречивы и зависят от экспериментального

протокола [95–98]. Модификации уровня глюкокортикоидов в течение пренатального периода приводят к перепрограммированию развития мозга, и влияют на созревание механизмов нейропластичности [99], что отражается в поведении и способности к обучению в дальнейшей жизни [100]. В контексте современного общества такое перепрограммирование зачастую оказывает негативное влияние на дальнейшую жизнь человека, пережившего пренатальный стресс. Подавляющее большинство исследований рассматривает исключительно негативный аспект повышенного уровня глюкокортикоидов в пренатальном периоде, но также появляются работы, акцентирующие внимание на возможной физиологической стороне данного явления. В частности, эволюционно оно могло играть важную роль в подготовке потомства к выживанию в суровых условиях, вероятно путем ускоренного раннего постнатального развития мозга, тем самым повышая шансы на репродукцию [101–103].

Изучение анамнеза эмоционально нестабильных детей показывает, что их матери чаще переживали хронический эмоциональный стресс в течение беременности по сравнению с матерями эмоционально стабильных детей [104]. Дети, рожденные от матерей, переживших стресс во время беременности, имеют проблемы с темпераментом и поведением в будущем [105], а также проблемы с концентрацией внимания в возрасте 7 лет [106]. Некоторые авторы ассоциируют повышенные уровни глюкокортикоидов в пренатальном периоде с последующим развитием аутизма, синдромом дефицита внимания, гиперактивностью и другими патологиями, непосредственно связанными с изменениями в дофаминергической системе [107]. При изучении анамнеза пациентов также выявлено, что тяжелые психоэмоциональные травмы матери в первый триместр беременности ассоциированы с повышенным риском развития шизофрении [57]. Дети, матери которых пережили сильный стресс во время беременности, в возрасте

6 месяцев, 5 и даже 10 лет демонстрируют повышенную активность гипоталамо-гипофизарно андренокортикальной системы (НРА) [105]. Устойчивая гиперактивация НРА и нарушения ее регуляции в детском возрасте вносят значительный вклад в развитие предрасположенности к аффективным расстройствам в течение всей последующей жизни. В модельных экспериментах на крысах показана тесная взаимосвязь между нарушением глюкокортикоидного гомеостаза матери и развитием поведенческих отклонений в постнатальном периоде у потомства. У грызунов усиливается тревожность [108–110] и нередко появляется ангедония [111,112]. Пренатальный стресс вызывает изменение активности дофаминергических нейронов в VTA, что в электрофизиологических исследованиях проявляется в их гипервозбудимости у мышей [113]. Потомство стрессированных на последней неделе беременности крыс демонстрирует повышенную склонность к самоинъекции большими дозами амфетамина по сравнению с контролем [58], а также проявляют большую склонность к потреблению морфина и кокаина [114].

В регуляции взаимодействия между глюкокортикоидной системой матери и плода значительную роль играют катехоламины – адреналин и норадреналин. Катехоламины проходят через гематоплацентарный барьер, попутно связываясь с рецепторами в тканях самой плаценты [115]. В исследованиях на трофобластах человека было показано, что норадреналин и адреналин вызывают быстрое уменьшение транскрипции HSD2 (Hydroxysteroid dehydrogenase 2) – фермента, катализирующего быструю инактивацию глюкокортикоидов [116]. HSD2 играет большую роль в раннем пренатальном периоде, предохраняя плод от воздействия 80–90% материнских глюкокортикоидов [117,118]. Однако, к поздним срокам гестации экспрессия гена HSD2 уменьшается [119], что повышает влияние глюкокортикоидной системы матери на плод. То есть плод наиболее чувствителен к стрессу матери

на поздних сроках пренатального развития. Однако при сильных повторяющихся стрессах, которые вызывают длительный выброс катехоламинов, глюкокортикоиды могут оказывать свое влияние и на более ранних сроках эмбриогенеза [120]. HSD2 не влияет на синтетические глюкокортикоиды, в связи с чем они беспрепятственно проходят через гематоплацентарный барьер на всех сроках пренатального развития. Кроме того, в *in vitro* исследованиях было показано, что дексаметазон вызывает увеличение транскрипции HSD2 [120], что на поздних сроках теоретически может приводить к разобщению между глюкокортикоидной системой матери и плода. Сведения относительно того, на каких сроках беременности человека повышенный уровень глюкокортикоидов в крови матери оказывает наибольшее негативное влияние на развитие дофаминергической системы, противоречивы. В экспериментах на грызунах наибольший неблагоприятный эффект на развитие дофаминергической системы, в частности ведущий к формированию аддиктивных состояний, вызывают стрессорные воздействия на последней неделе гестации, что, впрочем, может быть связано не только с прямым действием глюкокортикоидов на дофаминергическую систему, но и на другие нейрохимические системы, взаимосвязанные с ней. Среди наиболее изученных стоит выделить глутаматергическую медиаторную систему и систему нейрогормона НРА кортиколиберина. Немаловажным является тот факт, что пренатальный стресс оказывает влияние на развитие иммунной системы потомства [121]. Несмотря на противоречивость результатов, полученных с использованием парадигмы пренатального стресса, в целом можно считать, что стресс матери ослабляет пролиферацию лимфоцитов и активность макрофагов, снижает общий уровень провоспалительных цитокинов у потомства во взрослом периоде [122]. Вторым важным моментом является то, что глюкокортикоиды оказывают системное супрессирующее действие на иммунную систему матери, снижая активность транспорта материнских иммуноглобулинов через плаценту [122], но повышая уровень

провоспалительных цитокинов. У человека во время беременности в ответ на стресс повышается уровень TNF- $\alpha$  и IL-10, но снижается уровень IL-6 [123], что предположительно может оказывать влияние на развитие плода. Наличие взаимосвязи между иммунным ответом матери и развитием мозга плода было обнаружено в экспериментах с введением вирусных антигенов беременным самкам крыс. Усиленный иммунный ответ матери вызывал у потомства увеличение количества дофаминергических нейронов и их раннее пренатальное созревание [124], что указывает на роль иммунной системы матери в развитии дофаминергической системы мозга плода. Ввиду того, что до сих пор не ясно, какой из компонентов материнского иммунитета может оказывать влияние на развитие дофаминергических нейронов потомства и как с этим может быть связан стресс матери, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

## **2.5.Пренатальная гипоксия, как частный случай перинатального стресса и многофакторная патология развития плода. Влияние пренатальной гипоксии на глюкокортикоидную систему мозга.**

Многочисленные физиологические и клинические данные показывают, что внутриутробная гипоксия является одним из основных факторов, способных оказать неблагоприятное воздействие на развитие плода. Последствия гипоксии для плода во многом определяются сроком беременности. В пренатальном периоде человека выделяют период, отмеченный наиболее значительными по своим последствиям изменениями центральной нервной системы, связанными с действием гипоксии и других неблагоприятных факторов. Этот период приходится на 13-26-ю недели беременности и совпадает со стадией интенсивного роста и усложнения структурной организации мозга плода. В эти сроки происходит клеточная пролиферация, дифференцировка нейронов, образование аксонов и установление синаптических связей. Воздействие гипоксии в этот период, как

правило, не вызывает пороки развития плода, но может обусловить в дальнейшем возникновение функциональных нарушений ЦНС, приводящих к неврологическим расстройствам и расстройствам поведения, снижению памяти и интеллекта.

Выделяют еще один период, требующий особого внимания – это поздние сроки беременности, непосредственно предшествующие рождению, и, особенно, период родов, когда плод подвергается интенсивным воздействиям различных стрессовых факторов. Многочисленные наблюдения свидетельствуют, что перед родами и непосредственно в период родов у плода человека и многих млекопитающих резко повышается функция коры надпочечников. Воздействие стрессовых факторов и гипоксия плода в последние недели беременности впоследствии может явиться причиной нарушения в поведении, эмоциональной сфере и отставания в физическом развитии ребенка. В период позднего пренатального онтогенеза, который характеризуется как период наиболее интенсивного роста и развития головного мозга плода, происходят значительные структурные и функциональные перестройки тех его отделов, которые в дальнейшем будут отвечать за высшие интегративные процессы, в частности за память и способность к обучению.

Модель пренатальной гипоксии представляет особую ценность, еще и с той точки зрения, что травмы матери и плаценты, которые способны провоцировать гипоксические состояния плода в подавляющем большинстве случаев сопровождаются стрессорной реакцией матери, выраженной в выбросе глюкокортикоидных гормонов, которые свободно проходят через гематоплацентарный барьер.

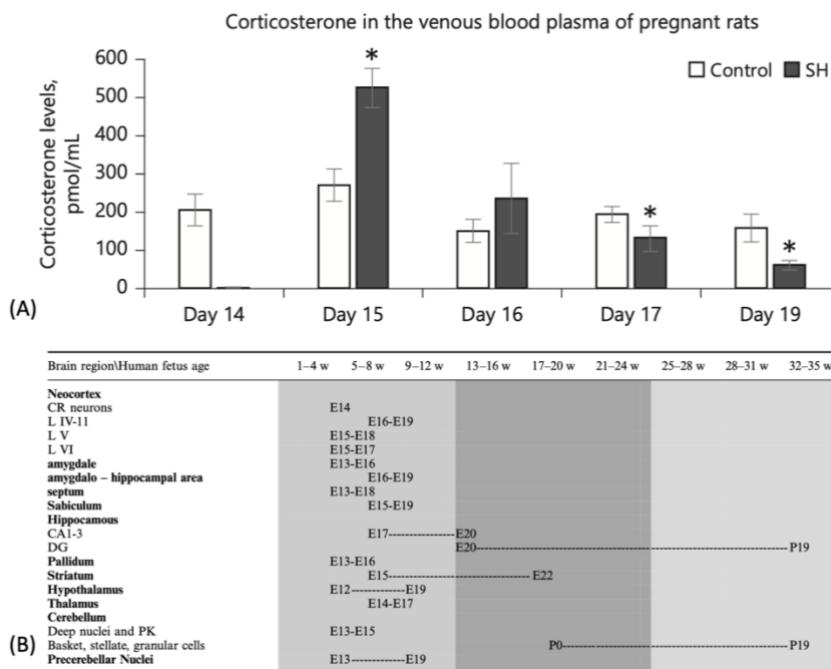
Уровни глюкокортикоидов в период пренатального онтогенеза являются одним из наиважнейших факторов, вносящих вклад в феномен, названный «стрессорное программирование» [103]. Стрессорный ответ матери во время

беременности может подготавливать плод к выживанию в суровых условиях после рождения. Взаимодействие развивающегося плода с внешней средой через глюкокортикоидную систему матери влияет на функционирование глюкокортикоидной системы потомства в постнатальном онтогенезе. Особую важность представляет длительность воздействия и временная точка, на которую приходится выброс глюкокортикоидов. Таким образом, гипотеза о предиктивной адаптации концептуализирует идею о роли глюкокортикоидов в развитии индивидуального фенотипа, лежащего в основе специфического стресс-индуцируемого поведения в течение жизни [125–127].

В наших предыдущих исследованиях был проведен анализ перепрограммирования глюкокортикоидной системы потомства. Нами было показано, что 3 сеанса ПГ в периоде 14-16-е сутки гестации индуцируют гормональный ответ матери, идентичный таковому при психоэмоциональном стрессе (Рис. 2). Избыток глюкокортикоидов, продуцируемый организмом самки в ответ на экстремальное воздействие изменяет активность НРА новорожденных [93]. Уровень кортикостерона в плазме 1-суточных ПГ крысят был значительно снижен, но к 14 суткам постнатального онтогенеза возвращался к контрольному уровню [9].

По всей вероятности, именно глюкокортикоидный стресс беременных самок, переживших гипоксию в период гестации является важным фактором, индуцирующим долговременные нарушения в глюкокортикоидной системе потомства. Массивный выброс кортикостерона в кровоток беременной самки через сутки после первого гипоксического воздействия возникает во временной точке, ассоциированной с началом созревания стриатума и окончанием созревания паллидума [128]. Латеральный гипotalамус, который отдает VGluT2-позитивные афференты к VTA, также развивается во временном интервале воздействия трех сеансов гипоксии в то время, как созревание вентрального гиппокампа начинается на 17-е сутки пренатального

развития, во время периода компенсаторного снижения уровня кортикостерона в организме матери.



**Рисунок 2. Уровни кортикостерона в венозной крови беременных самок крыс (А) и критические периоды закладки структур мозга (В).** Выброс глюкокортикоидов организмом беременной самки не демонстрирует собой монолитный паттерн, а представляет последовательное повышение и затем критическое снижение к концу беременности. На Рисунке (А) представлены данные по уровням кортикостерона в крови беременных самок крыс из уже опубликованной нами ранее статьи [9]. Сначала наблюдается повышение, приходящее на созревание паллидума и частично на созревание стриатума (В) [128]. Снижение приходится на созревание гиппокампа. Возникает вопрос, в чем же пертурбации уровня глюкокортикоидов выражаются в дальнейшем функционировании структур, и как сформированный фенотип может влиять на развитие никотиновой зависимости?

Изменения, вызываемые пертурбациями уровня глюкокортикоидов у беременных самок, имеют долгосрочные последствия на НРА потомства и на рецепцию глюкокортикоидов в мозге, что в свою очередь приводит к хроническим нарушениям глюкокортикоид-зависимых процессов у потомства. В предыдущих работах нами было показано хроническое снижение

уровня GR в нейронах гиппокампа [9], а также ослабление глюкокортикоид зависимой транскрипции в нем же [16]. Кроме того, был обнаружен системный эффект пренатальной гипоксии, выражавшийся в пожизненном увеличении внутривенного уровня кортикостерона потомства, а также усиленной его рецепции в печени[9].

Наиболее важными с точки зрения настоящего исследования являются хронические изменения глюкокортикоид-зависимой транскрипции, в частности экспрессии генов метаболизма глутамата, что обсуждено в следующем параграфе.

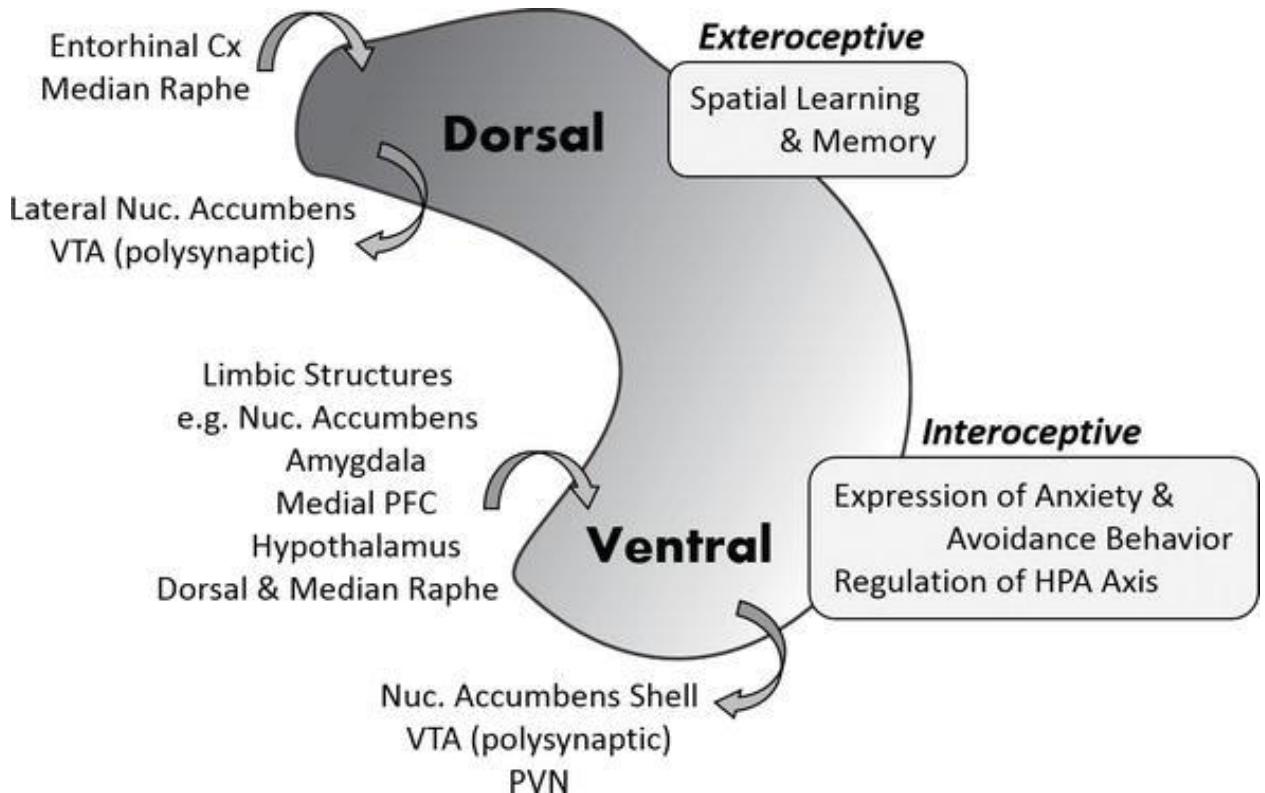
## **2.6.Вызванные пренатальной гипоксией нарушения в глутаматергической системе мозга**

Наиболее распространенной возбуждающей медиаторной системой мозга, опосредующей более чем 70% синаптических передач в центральной нервной системе, является глутаматергическая. Хорошо изучена глутаматергическая регуляция дофаминергических нейронов, идущих от VTA в PFC и NAc, со стороны гиппокампа, амигдалы и таламуса. При этом глутаматергическое взаимодействие происходит и между конечными структурами мезокортиоколимбической системы в основном под контролем PFC и гиппокампа, в то время как VTA в первую очередь регулируется субкортикальными структурами, в частности проекциями латерального гипоталамуса и латеродорсального тегментума [129,130].

Гиппокамп является структурой мозга, тесно ассоциированной с пространственной и кратковременной памятью. Дорсальная часть гиппокампа крысы (аналог переднего гиппокампа человека) получает экстерорецептивную информацию от энторинальной коры [131], в то время какentralный гиппокамп получает интерорецептивные стимулы от лимбических структур, таких как NAc, амигдала, PFC, и гипоталамус [131–135]. Стоит отметить, что оба региона гиппокампа (дорсальный и centralный) участвуют в

формировании памяти, причем его дорсальная часть преимущественно участвует в формировании пространственной памяти [136]. Через основание гиппокампа (субикулюм), к NAc отходят крупнейшие глутаматергические проекции [137,138], однако дорсальный и вентральный гиппокамп оказывают различный эффект на аккумбальную активность [139]. Вентральный субикулюм отдает проекции к медиальной оболочке NAc, его дорсальная часть отдает проекции к сердцевине и латеральной оболочке NAc [132,140,141]. Глутаматергические проекции гиппокампа к оболочке NAc необходимы для формирования положительного подкрепления, связанного с местом [142,143].

Некоторыми исследователями была обнаружена взаимосвязь между коактивацией вентрального гиппокампа и дофаминергических нейронов VTA, и долговременным усилением памяти, связанной с награждающим стимулом. Также высказываются предположения о том, что вентральный гиппокамп использует предшествующий опыт для корректировки дофаминового сигналинга в NAc [144,145]. Взаимодействия между вентральными глутаматергическими проекциями гиппокампа и нейронами, экспрессирующими постсинаптические дофаминовые рецепторы D1 в оболочке NAc, способствуют формированию контекстной памяти о наркотическом опыте и дальнейшему поиску наркотического препарата [146–148]. Так, было показано, что усиление активности вентрального гиппокампа ассоциировано с поиском наркотиков и ассоциируется с предпочтением места, индуцируемым введением наркотического вещества [149,150], напротив, его ингибирование ослабляет поведение, связанное с поиском наркотиков [126–128].



**Рисунок 3. Проекции дорсального и вентрального гиппокампа к структурам дофаминергической системы [145].** В настоящее время имеется хорошее понимание принципов работы дорсального гиппокампа. Дорсальный гиппокамп отвечает за формирование кратковременной пространственной памяти, в нем находятся нейроны места, за которые О'Киф в 2014 году получил Нобелевскую премию. С вентральным гиппокампом не все так однозначно. Вентральный гиппокамп получает интерорецептивные стимулы от лимбических структур. Сам в свою очередь отдает проекции к NAc. По последним исследованиям, в плане аддикций, сигналинг вентрального гиппокампа участвует в формировании положительного подкрепления, связанного с местом, способствует формированию контекстной памяти о наркотическом опыте и дальнейшему поиску наркотического препарата, также было показано, что усиление активности вентрального гиппокампа ассоциировано с поиском наркотиков, напротив, его ингибиция ослабляет поведение, связанное с поиском наркотиков.

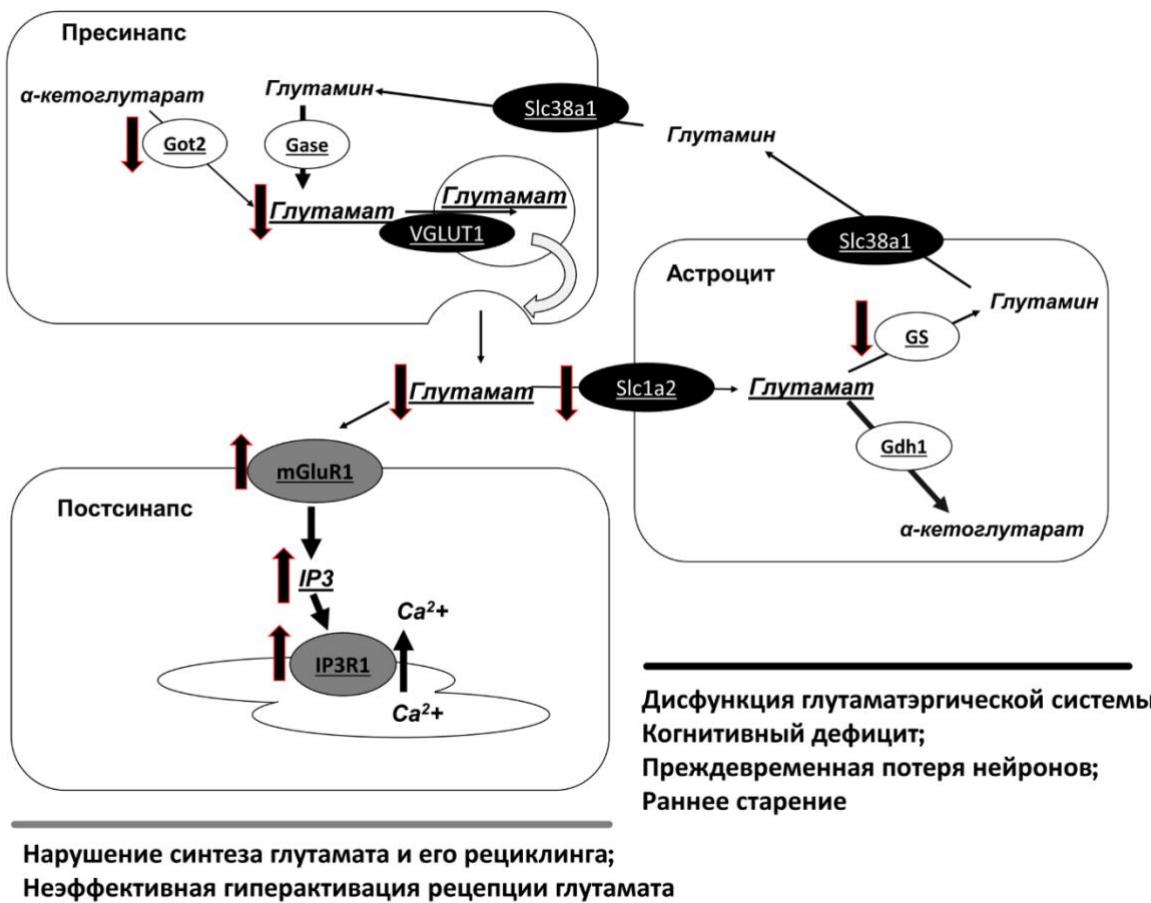
В пилотных исследованиях, проведенных в лаборатории регуляции функций нейронов мозга было установлено, что в гиппокампе ювенильных и взрослых крыс, переживших гипоксию на 14-16 сутки пренатального онтогенеза наблюдается повышенное количество рецепторов инозитол-3-фосфата

(IP3R1), а в ответ на аппликацию глутамата или агониста глутаматных рецепторов I группы происходит чрезмерное высвобождение инозитол-3-фосфата (IP3) и эксайтотоксический всплеск внутриклеточного кальция [154,155].

Эти данные указывают на вызванную пренатальной гипоксией повышенную активность внутриклеточных элементов сигнальной трансдукции от рецепторов глутамата в гиппокампе и позволяют предположить ассоциированное с возрастом усугубление нарушений работы глутаматергической системы в этой структуре мозга, отвечающей, в частности, за пространственную память.

Последующие работы показали, что повышенная активность рецепторной части глутаматергической системы гиппокампа сопряжена с ослаблением биосинтеза и увеличением деградации глутамата, а также сопровождалось увеличением глутаматной рецепции в области CA1 гиппокампа [16]. Увеличение количества рецепторов глутамата вентральном гиппокампе могло свидетельствовать о недостаточной стимуляции иннервируемых гиппокампом структур, в частности NAc. Ранее, нами также оценивалась динамика транскрипции мРНК ферментов синтеза и катаболизма глутамата в гиппокампе. Было показано, что в этой структуре мозга 2-недельных ПГ крыс снижена экспрессия гена глутаматдегидрогеназы (gdh1), фермента расщепления глутамата астроцитами. У взрослых 3-х месячных крыс экспрессия этого гена не отличается от контроля, однако происходит ослабление транскрипции глутаминазы (gase), фермента, ответственного за дезаминирование глутамина в нейронах и, соответственно восстановление пула глутамата, возвращаемого в нейроны из астроцитов [16].

## Пренатальная гипоксия



**Рисунок 4 [16] Графический абстракт результатов предыдущих работ по анализу дисфункции глутаматергической системы, вызванной ПГ.** Ранее нами было показано, что в этой структуре мозга ПГ крыс на пресинапсе снижена экспрессия глутамат-оксалоацетат трансаминазы (got2), фермента синтеза глутамата нейронами, также происходит ослабление транскрипции глутамина (gase), фермента, ответственного за дезаминирование глутамина в нейронах и, соответственно восстановление пула глутамата, возвращаемого в нейроны из астроцитов. В самих астроцитах снижена экспрессия глутаминсинтетазы (gs), фермента трансформации захваченного астроцитами глутамата в глутамин. На постсинапсе наблюдается увеличение количества метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR1), а также гиперактивация фосфоинозитидной системы, что подтверждает вывод данной статьи о том, что в гиппокампе ПГ крыс хронически ослабевает биосинтез глутамата, что связано с ослаблением глюкокортикоид-зависимой транскрипции генов анabolизма и катаболизма глутамата.

Но самые существенные изменения транскрипции генов, вовлекающихя в метаболизм глутамата, в гиппокампе ПГ крыс наблюдаются в возрасте 18 месяцев. Так, у 18-месячных ПГ крыс происходит уменьшение транскрипции мРНК генов глутамат-оксалоацетат трансаминазы (got2), фермента синтеза глутамата нейронами, и глутаминсинтетазы (gs), фермента трансформации захваченного астроцитами глутамата в глутамин.

При этом экспрессия gdh1 не отличается от контроля, что предположительно должно способствовать преимущественному расщеплению глутамата астроцитами вместо его рециклинга в нейроны.

Экспрессия gase в гиппокампе 18-месячных ПГ крыс также не отличается от контроля, однако недостаточная эффективность синтеза глутамина и повышенное расщепление глутамата астроцитами не позволяют продукту данного гена осуществлять эффективный рециклинг глутамата нейронами, что на фоне ослабленной экспрессии got2 неизбежно приведет к дефициту общего количества глутамата (результаты просуммированы на Рисунке 4) [16].

Таким образом, суммируя литературные данные и полученные нами ранее результаты, можно предположить, что глутаматергическая стимуляция NAc от гиппокампа должна ослабевать у крыс, переживших ПГ. В настоящем исследовании это было косвенно подтверждено показанными нами изменениями паттерна фосфорилирования DARPP-32 в NAc.

VTA также представляет интерес с точки зрения глутаматергической иннервации. Как показано в обзоре Гейзлера VTA в основном получает глутаматергические проекции от подкорковых структур [156]. Одним из отличий глутаматергических проекций от подкорковых структур к VTA является наличие в них VGluT2 [156] (в отличие от VGluT1-позитивных аксонов, отходящих от кортикальных регионов [40,26]). Наибольшее число VGluT2-экспрессирующих нейронов, проецирующихся к дофаминергическим

нейронам VTA, находятся в латеральном гипоталамусе [156], некоторые афференты к VTA отходят от латеродорсального тегментума и педунколопонтинных тегментарных ядер ствола мозга [158]. 7% VGluT2-экспрессирующих нейронов, иннервирующих VTA отходят от латеральной хабенулы и являются главным источником сигналов, связанных с отрицательным подкреплением, поскольку образуют синапсы с ГАМК интернейронами VTA. Таким образом, усиление активности глутаматергических нейронов гипоталамуса, и других структур процирующих аксоны непосредственно к телам дофаминергических нейронов должны приводить к усилению их активности и соответственно к реализации «дофаминовых» эффектов, в то время как активность латеральной хабенулы должна приводить к ослаблению активности дофаминергических нейронов. Как упоминалось, в VTA никотин активирует  $\alpha 4\beta 2$  и  $\alpha 7$  nAChR.  $\alpha 7$  nAChR находящийся на глутаматергических терминалях не десенсилизируется низкими концентрациями никотина, ассоциированными с курением табака [73,74]. Однако, отличные от  $\alpha 7$  nAChR рецепторы на ГАМКергических нейронах претерпевают быструю десентизацию сразу после никотинового воздействия, и как следствие, происходит ослабление ингибирующего влияния на дофаминергические нейроны [73,74]. Таким образом, введение никотина, супрессирующее эффект ГАМК и усиливающее глутаматный эффект на дофаминергические нейроны VTA, может приводить к ускоренному развитию зависимости у ПГ крыс, в случаях изменений локального глутаматного сигналинга.

### **3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1. Животные**

В работе использовали крыс линии Вистар из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. При проведении экспериментов соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета

Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар, рожденных интактными самками (Контроль) и самками, подвергшимися трем сеансам тяжелой гипобарической гипоксии на 14, 15 и 16-е сутки беременности (пренатальная гипоксия, ПГ). Выбор сроков обусловлен тем, что у крыс в течение этого периода происходит окончание созревания паллидума и начало созревания стриатума и гиппокампа [128]. Кроме того, к этому сроку оканчивается процесс аксонального наведения дофаминергических проекций к стриатуму и наступает процесс ориентирования в стриатуме [24].

Для моделирования условий гипобарической гипоксии беременных крыс помещали в барокамеру проточного типа при температуре от 20° до 25°C и ступенчато понижали давление до 180 мм рт. ст. (продолжительность воздействия – по 3 ч в течение 3 суток с интервалом 24 ч между сеансами). Ступенчатое снижение давления давало крысам возможность адаптироваться. Каждые 15 мин осуществляли продув камеры.

Крысят отлучали от матери в возрасте 30 суток и помещали в клетки стандартного размера 60 × 30 × 20 см по 6 особей в каждой. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет/темнота 12 : 12 ч, температуре 20–23 °С и при постоянном доступе к воде и пище.

С целью сбора образцов мозга для биохимического и иммуногистохимического анализа 3-месячные самцы крыс были декапированы с помощью гильотины. Для ПЦР-анализа также использовались образцы мозга 2-недельных самцов крыс.

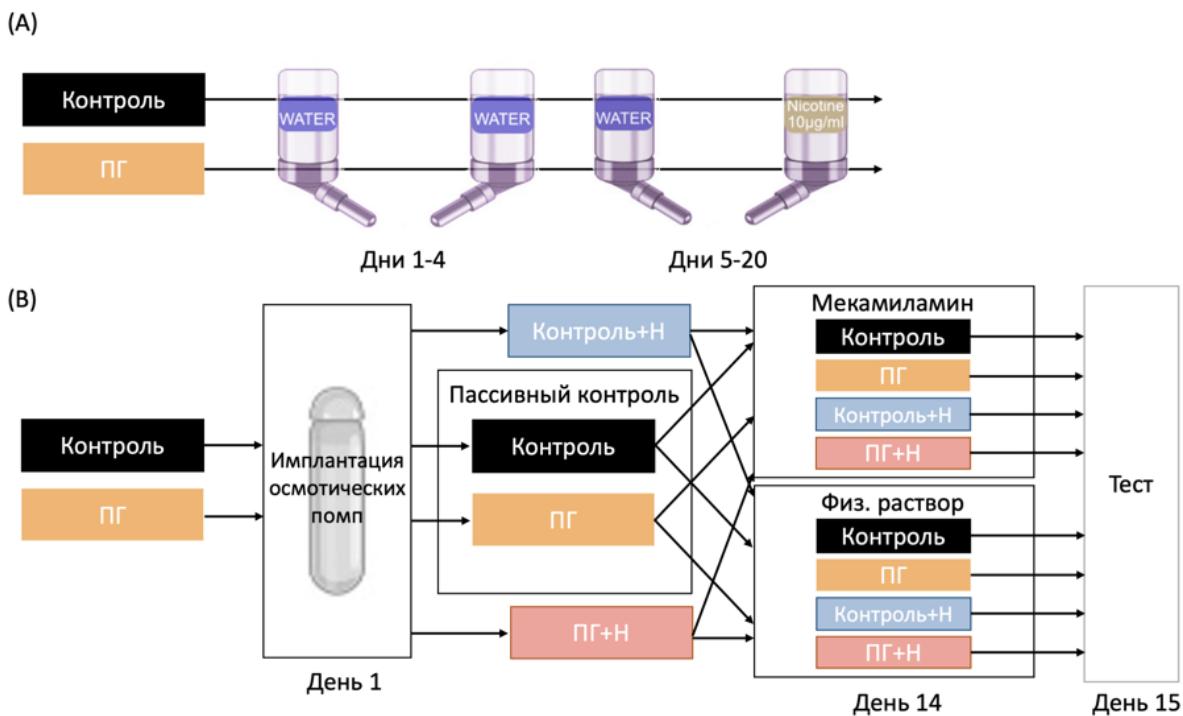
### **3.2. Оценка свободного потребления никотина**

С целью оценки потребления никотина крыс рассаживали индивидуально в полипропиленовые клетки стандартного размера ( $60 \times 30 \times 20$  см), экипированные двумя наполненными водой поилками слева и справа. Дизайн эксперимента представлен на **Рисунке 5А**. Каждый день от начала эксперимента, содержимое клеток взвешивали для оценки потребленной жидкости, а затем обновляли. На 5 день эксперимента одну из бутылок наполняли раствором тартрата никотина (Fisher Bioreagents, США) с концентрацией 10 мкг/мл. Каждый день после измерения потребления воды и раствор никотина обновляли, а бутылки меняли местами для исключения выработки пространственного предпочтения. Результаты по количеству никотина, потребляемого в течение 16 суток эксперимента рассчитаны и представлены для первых 8 суток и последних 8 суток эксперимента как соотношения общего количества потребленного никотина к потребленной жидкости и к среднему весу тела каждого животного в граммах.

### **3.3. Хроническое парентеральное введение никотина и оценка абстинентного синдрома**

#### ***3.3.1. Хирургические процедуры***

Крысы содержали в группах по 5-6 животных. Дизайн эксперимента представлен на **Рисунке 5В**. На первый день проведения экспериментов крысам под диэтиловым эфирным наркозом имплантировали осмотические помпы (Alzet 2002, Alza Corporation, CA, США), рассчитанные на 2 недели использования при обеспечении скорости введения раствора 0,5 мкл/ч. Концентрация никотина в помпах была скорректирована таким образом, чтобы каждое животное получало 9 мг/кг никотина в сутки. Ложно оперированным животным также имплантировали осмотические помпы, но вместо раствора никотина они содержали физиологический раствор.



**Рисунок 5. Дизайн и тайминги поведенческих экспериментов.** На схеме (А) продемонстрированы этапы эксперимента со свободным потреблением никотина. На схеме (В) продемонстрированы этапы эксперимента с хроническим парентеральным введением никотина и дальнейшей оценкой мекамиламина-индуцируемого абстинентного синдрома.

### 3.3.2. Оценка мотивационного эффекта мекамиламина после хронического парентерального введения никотина в тестовой установке с рисунком

Выработку условнорефлекторного избегания и последующее тестирование проводили по методу Сузуки [29]. Для выработки аверсии к одной из половин тестовой установки нами был использован неконкурентный антагонист nAChR – мекамиламин, поскольку различные научные группы в экспериментах на крысах показали, что мекамиламин вызывает симптомы никотиновой абстиненции [29,159]. Тестовая установка, размером 30×60×30 см была разделена на два отсека одинакового размера подвижной перегородкой (Рис. 6). Один отсек был окрашен в монохромную полоску, другой в монохромные круги, что позволяло крысам ассоциировать неприятные симптомы с одним из отсеков, в который они помещались после введения мекамиламина. На утро (9:00) на 14 день введения раствора никотина

(или физиологического раствора) крысам подкожно инъецировали мекамиламин в дозе 1.0 мг/кг или физиологический раствор (1 мл/кг), после чего крыс немедленно помещали в одну из половин тестовой установки на 60 минут. Вечером того же дня (19:00) всем крысам вводили физиологический раствор и помещали в противоположную половину тестовой установки на 60 минут. Совмещения инъекции (мекамиламин или физиологический раствор) и половины тестовой установки (монохромные полосы или круги) были случайны и сбалансираны среди крыс, получавших инъекции мекамиламина. На утро следующего дня тестирование реакции предпочтения места выполняли следующим образом: поднимали перегородку, разделяющую 2 части тестовой установки, помещали крысу в центр установки и фиксировали время пребывания в каждой половине установки на протяжении 15 минут. Для групп, получавших мекамиламин данные представлены в виде разности времени пребывания в мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки и времени пребывания в другой половине (отрицательные значения – избегание места). Для групп, не получавших мекамиламин вычитание производилось из времени половины, ассоциированной с утренним введением физиологического раствора.



**Рисунок 6. Поведенческая установка для оценки мотивационного эффекта мекамиламина.**

### ***3.3.3. Оценка мотивационного эффекта мекамиламина после хронического парентерального введения никотина в черно-белой тестовой установке***

Аналогичное обучение и тестирование также проводили в черно-белой тестовой установке, в которой крысы изначально избегали белую половину. Дизайн эксперимента соответствует описанному выше. Единственным отличием являлось то, что крыс помещали в черную половину тестовой установки в процессе обучения с мекамиламином (или физиологическим раствором), а результат тестирования избегания места выражали в % времени пребывания в белой половине тестовой установки от 15-минутной тестовой сессии.

### **3.4. Оценка уровня дофамина методом ИФА**

Образцы вентрального стриатума и VTA 3-месячных крыс были гомогенизированы в PBS-буфере. Уровень дофамина оценивали с использованием Dopamine ELISA Kit (KA1887, Abnova, Тайвань) согласно протоколу производителя. Детекцию осуществляли на планшетном спектрофотометре (SPECTROstar NANO, BMG Labtech, Германия). Количество дофамина оценивали по стандартной кривой и выражали в нг на мг общего белка. Общий белок оценивали с использованием PierceTM Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

### **3.5. Анализ белков DAR1, pThr34DARPP-32, кальцинейрина и GR методом вестерн blot**

Для экстракции белков образцы PFC, NAc и гипоталамуса гомогенизировали в ручном гомогенизаторе стекло-стекло в 50мМ Трис-HCl буфере (TBS, pH 8.0), содержащем 150мМ NaCl, 1% тритон X100, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440, Thermo Scientific, США), инкубировали на качалке 30 минут при температуре +4°C, после чего

центрифугировали 10 минут при 14 000g. Содержание общего белка измерялось с использованием PierceTM Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), следуя протоколу производителя. Равные количества общего белка кипятились в течение 5 минут при +95°C с трехкратным буфером Лэммли.

Белки тотальных экстрактов были разделены в SDS-PAGE геле и перенесены на PVDF мембрану (Thermo Fisher Scientific, США). После часовой блокировки в TBS с 5% молоком мембранны инкубировали в TBS с кроличьими первичными антителами против DRD1 (1:1,000, SAB4500671, Sigma-Aldrich, США), pThr34DARPP32 (1:1,000, SAB4504378, Sigma-Aldrich), DARPP-32 (1:1,000, SAB4503330, Sigma-Aldrich), кальцинейрина (1:2000, ab3673, Abcam, Великобритания), GR (1:1,000, ab183127, Abcam) и β-актина (1:2,000, a9044, Sigma-Aldrich) при комнатной температуре в течение 2 часов. Мембранны отмывали трижды в TBST (TBS с 0.1 % Tween 20) и инкубировали в TBS с HRP-конъюгированными вторичными антителами против кролика (0,25 мкг/мл, a16096, Thermo Fisher Scientific) в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембранны трижды отмывались в TBST. Иммунопозитивные белковые бэнды визуализировали при помощи Clarity Max ECL kit (Bio-Rad, США) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Интенсивность люминесценции белков интереса оценивали при помощи приложения ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США) и нормировали на DARPP-32 (для pThr34DARPP32) и β-актин (для DRD1, кальцинейрина и GR).

### **3.6. Иммунофлюоресцентный анализ**

#### **3.6.1. Пробоподготовка**

Образцы мозга 3 месячных крыс, содержащие субъядра VTA погружали в фиксатор (28 мл Fine Fix, Milestone, Italy + 72 мл 96% этанола) на 24 часа при +4°C. Дегидратация тканей в гистопроцессоре достигалась последовательным помещением образцов в растворы спиртов восходящей концентрации: Этанол

70% (1.5 часа) → Изопропанол 70% (1час) → Изопропанол 80% (1час) → Изопропанол 96% (1час) → Изопропанол 96% (1час) → Изопропанол 96%/минеральное масло (5:1) (1час) → Изопропанол 96%/минеральное масло (2:1) (1час) → минеральное масло (2часа) при комнатной температуре. Далее образцы помещали в жидкий парафин (4 раза, по 1 ч) при 56°C, после чего изготавливали парафиновые блоки. Парафиновые блоки нарезали на 7 мкм срезы на уровне -5.28 от линии брегмы. Срезы монтировали на стекла с L-полиэтиленовой подложкой и перед иммуногистохимическим окрашиванием депарафинизировали в ксилоле (дважды по 5 мин), регидрировали в этиловых спиртах нисходящей концентрации (96% → 96% → 96% → 70% по 5 мин) и демаскировали в цитратном буфере (рН 6.0).

### **3.6.2. Иммунофлюоресцентная детекция**

Перед проведением иммуногистохимических исследований все первичные антитела были проверены на соответствие молекулярной массе методом вестерн blot, за исключением антител не пригодных для использования в данном методе по предписаниям производителя. В парабрахиальном субъядре VTA был применен метод тройной иммунофлюоресценции для выявления Nurr1+ (Nuclear receptor related protein 1) и TH+ (tyrosine hydroxylase) нейронов, демонстрирующих дофаминовый фенотип. Антитела против VGlut2 использовались для оценки количества глутаматергических терминалей. Срезы мозга, содержащие VTA, инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C с первичными кроличьими антителами против Nurr1 (N4663, Sigma-Aldrich, США), козьими поликлональными антителами против TH (SAB2501155, Sigma-Aldrich, США), мышиными моноклональными антителами против VGlut2 (AMAb91081, Sigma-Aldrich, США). После инкубации с первичными антителами срезы инкубировались с коктейлем из вторичных флюоресцентных антител: антитела против кролика CF633 (SAB4600132, Sigma-Aldrich, USA), антитела против мыши CF568 (SAB4600425, Sigma-

Aldrich, USA) и антитела против козы CF488A (SAB4600232, Sigma-Aldrich, USA). Высушенные срезы покрывались монтирующей средой (Sub-X Mounting Medium, Leica Biosystems, США) и анализировались на конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). В поле зрения случайно выбиралось 3 Nurr1/TH позитивных нейрона, на которых оценивали уровень глутаматной иннервации по VGlut2+ областям (средняя интенсивность флюоресценции).

### 3.7. ПЦР в реальном времени

Общую РНК изолировали из NAc, PFC, гиппокампа, VTA 2-недельных и 3-месячных крыс, используя набор ExtractRNA (BC032, Евроген, Россия), очищали от ДНК с применением наборов DNaseI (EN0521, Thermo Fisher Scientific, США) и CleanRNA Standard (BC033, Евроген) согласно инструкциям производителя. Синтез кДНК производили из 1 мкг общей РНК с помощью MMLV Reverse Transcription Kit (SK021, Евроген). Количествоенную ПЦР в реальном времени проводили, используя набор qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген) на амплификаторе Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров, температуры плавления и размеры фрагментов представлены в Таблице 1.

**Таблица 1. Характеристики используемых праймеров.**

Ген	Последовательность праймеров (5' – 3')	Температура отжига	Длина продукта (пн)
<b><i>α7nAChR</i></b> <i>(chrna7)</i>	F: CTCTTGGAAATAACTG TCTT R: CGAAGTATTGTGCTATCA	55.6	105
<b>GR</b> ( <i>nr3c1</i> )	F: ATCATAACAGACAATCAAG R: GGTATCCTATGAAGA GTA	55.6	156
<b>Beta2-microglobulin</b> <i>(b2m)</i>	F: TGCCATTCAAGAAAATCCCC R: GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT	57	73

Уровень экспрессии генов *chrna7* и *nr3c1* определяли, используя  $\Delta\Delta Ct$  метод, нормализуя данные на количество мРНК референтного гена *b2m*.

### **3.8 Статистический анализ**

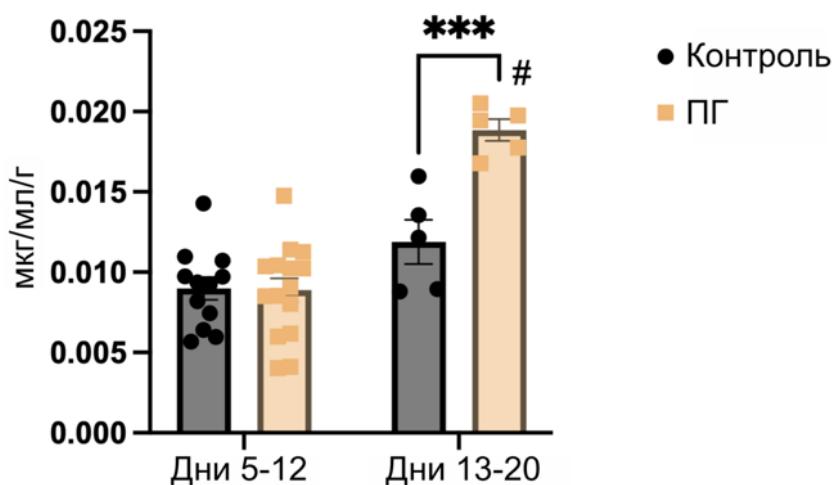
Полученные данные были статистически обработаны с использованием приложения Prism 9.2 (GraphPad Software, США). Все выборки оценивались на нормальность при помощи теста Шапиро-Уилка ( $P > .05$ ) и построением графиков квантиль-квантиль (QQ-plot). Двух- и трехфакторная ANOVA и t-тест Стьюдента для независимых переменных были использованы, как параметрические тесты. Выборки, имеющие нормальные распределения, представлены как среднее  $\pm$  SEM. Post hoc сравнения выполнялись с использованием теста Сидака. Результат принимался статистически значимым при  $P < .05$ . В случае отсутствия нормального распределения использовался U-тест Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп, или тест Данна без корректировок сравнения. Непараметрические распределения на графиках представлены медианой. Корреляционный анализ производился с использованием непараметрического теста Спирмена.

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **4.1. Эффекты пренатальной гипоксии на динамику потребления никотина у взрослых крыс**

Перед началом эксперимента нами было оценено дневное потребление воды в условиях, идентичных с условиями дальнейшего потребления никотина, в течение первых 4 суток. Количество ежедневно потребленной животными жидкости на грамм массы тела было постоянным для каждой группы и одинаковым между группами. На **Рисунке 7** показано увеличение потребленного никотина начиная с 5 суток: в течение 16 суток эксперимента у ПГ группы (two-way ANOVA time F (1, 8) = 43.21,  $P < .001$ ;  $0.008 \pm 0.0007$  против  $0.019 \pm 0.0007$  между днями 5-12 и 13-20 соответственно,  $P < .001$ ,

Sidak's test, n=5-15), но не у группы Контроля ( $0.008 \pm 0.0007$  против  $0.012 \pm 0.0014$  между днями 5-12 и 13-20 соответственно,  $P > .05$ , Sidak's test, n=5-14). На 13-20 сутки эксперимента, ПГ крысы потребляли больше никотина, чем контрольная группа (two-way ANOVA time x group F (1, 8) = 13.03,  $P < .01$ ;  $0.12 \pm 0.0014$  против  $0.19 \pm 0.0007$  для групп контроля и ПГ соответственно,  $P < .001$ , Sidak's test, n=5). В течение первых 8 суток (5-12 сутки) потребления никотина отличий между группами обнаружено не было.



**Рисунок 7. Потребление никотина в тесте свободного потребления.** На диаграмме продемонстрировано увеличение в потреблении никотина в течение 16 дней эксперимента внутри группы ПГ (two-way ANOVA time F (1, 8) = 43.21,  $P < .001$ ; # -  $P < .001$ , Sidak's test), но не внутри группы Контроля. Между группами не было обнаружено изменений в потреблении никотина в течение первых 8 дней потребления. Достоверные различия были обнаружены на дни 13-20, группа ПГ потребляла больше никотина чем группа контроля (two-way ANOVA time x group F (1, 8) = 13.03,  $P < .01$ ; \*\*\* -  $P < .001$ , Sidak's test). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM (standard error of mean, стандартная ошибка среднего).

#### 4.2. Эффект хронического парентерального введения никотина на синдром отмены, спровоцированный однократным введением мекамиламина у ПГ крыс

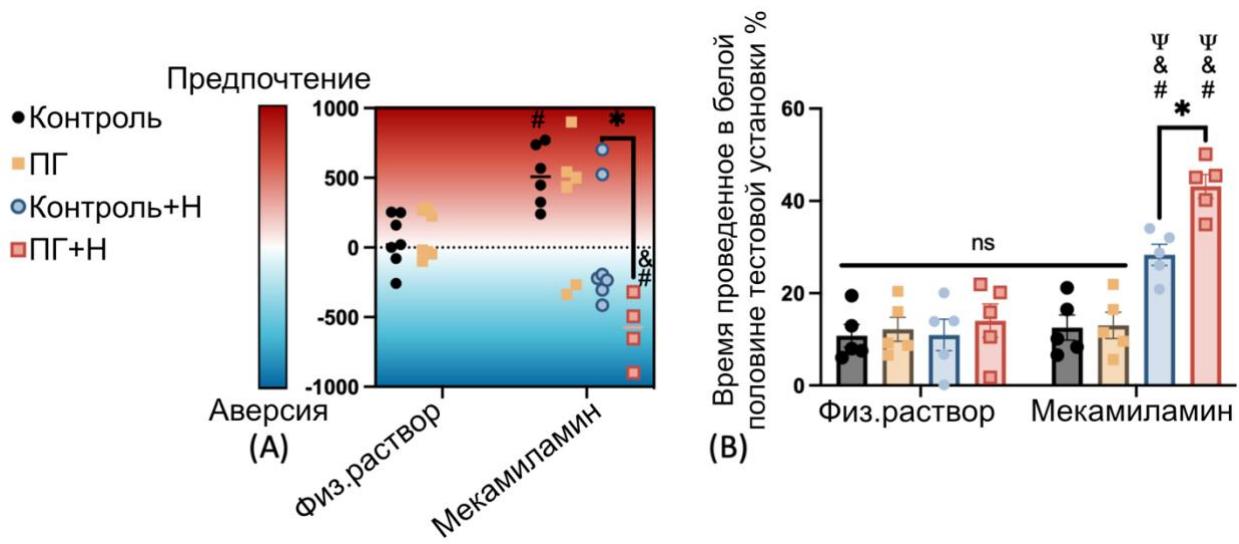
После хронического потребления никотина нами оценивался синдром отмены, который играет важную роль в компульсивном потреблении

никотина. Вследствие того, что никотиновая зависимость имеет относительно мягкие симптомы отмены, в настоящем исследовании мы тестировали аверсию к антагонисту никотина - мекамиламину, описанную в других исследованиях [29].

В тестовой установке, окрашенной монохромными кругами и полосами (**Рис. 8А**) нами было выявлено, что ложно оперированые Контрольная и ПГ группы, получившие физиологический раствор перед обучением в тестовой установке, не демонстрировали предпочтение к какой-либо половине. Также нами было обнаружено что ложно оперированная Контрольная (но не ПГ) группа, демонстрирует слабую тенденцию к мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки (21 у ложно оперированной Контрольной группы, получившей физиологический раствор против 508 у ложно оперированной Контрольной группы, получившей мекамиламин,  $P < .05$ , uncorrected Dunn test,  $n=6-7$ ).

После хронического введения никотина, группа ПГ проявляет более выраженную аверсию к мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки по сравнению с Контролем (-221 у хронически никотинизированной Контрольной группы, получившей мекамиламин против -574.5 у хронически никотинизированной группы ПГ, получившей мекамиламин,  $P < .05$ , uncorrected Dunn test,  $n=4-7$ ). Кроме того, получавшая никотин группа ПГ (но не Контрольная группа) отличалась от соответствующей ложнооперированной группы, которая получала инъекцию физиологического раствора перед помещением в тестовую установку (-574.5 у хронически никотинизированной группы ПГ, получившей мекамиламин против -18 у ложно оперированной группы ПГ, получившей физиологический раствор,  $P < .05$ , uncorrected Dunn test,  $n=4-6$ ) и от соответствующей ложно оперированной группы получавшей мекамиламин (-574.5 у хронически никотинизированной

группы ПГ, получившей мекамиламин против 468 у ложно оперированной группы ПГ, получившей мекамиламин,  $P < .001$ , uncorrected Dunn test,  $n=4-6$ ).



**Рисунок 8. Аверсия к мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки у крыс, получавших никотин в течение 2 недель.**

На диаграмме (А) продемонстрированы результаты теста, выполненного в установке, с монохромными полосами и кругами. Более значимая аверсия после кондиционирования с мекамиламином была обнаружена у ПГ крыс по сравнению с контролем (\* -  $p < .05$ , uncorrected Dunn test); значимые отличия против соответствующей ложнооперированной группы, получавшей инъекцию физиологического раствора перед обучением (# -  $P < .05$ , uncorrected Dunn test); значимые отличия против соответствующей ложнооперированной группы, получавшей инъекцию мекамиламина перед обучением (& -  $P < .05$ , uncorrected Dunn test). Данные рассчитаны как медиана.

На диаграмме (Б) продемонстрированы результаты теста, выполненного в черно-белой тестовой установке. Совмещение 2-недельного введения никотина с инъекциями мекамиламина демонстрируют сильный эффект на группы Контроля и ПГ (ANOVA mecamylamine x nicotine F (1, 16) = 19.43,  $P < .001$ ; значимые различия против соответствующей ложнооперированной группы, получавшей физиологический раствор перед обучением # -  $P < .05$ , Sidak's test; значимые различия против соответствующей ложнооперированной группы получавшей мекамиламин перед обучением & -  $P < .05$ , Sidak's test; значимые различия против соответствующей группы, получавшей никотин в течение 2 недель и затем получившей инъекцию физиологического раствора - Ψ -  $P < .05$ , Sidak's test).

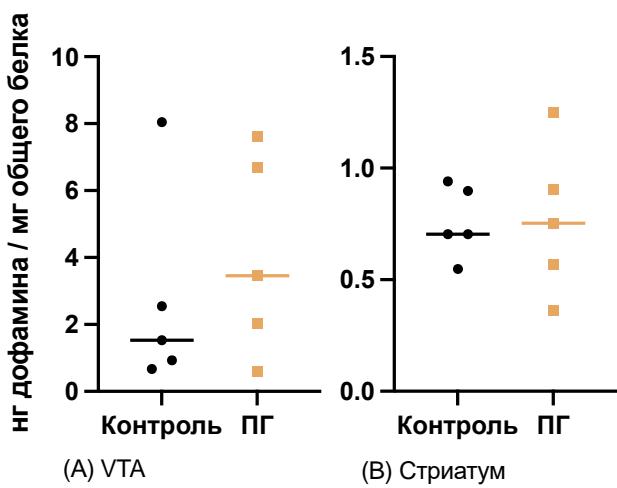
Как и в первом teste, получавшая никотин группа ПГ проявляет большую аверсию к мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки по сравнению с соответствующей Контрольной группой, получавшей никотин (\* -  $P < .05$ , Sidak's test). Данные рассчитаны как средние  $\pm$  SEM.

С целью устранения эффекта, обнаруженного у ложно оперированной Контрольной группы, получившей мекамиламин, нами был проведен эксперимент по аналогичному протоколу, но в чёрно-белой тестовой установке (**Рис. 8В**), в котором крысы изначально предпочитали черную половину и избегали белую по естественным причинам. В этом тесте только получавшие никотин группы, избегали черную половину установки, ассоциированную с введением мекамиламина (three-way ANOVA mecamylamine x nicotine F (1, 16) = 19.43, P < .001). При этом, у группы ПГ инъекция мекамиламина индуцировала более выраженную аверсию, чем у Контрольной группы ( $28.3 \pm 2.15$  у хронически никотинизированной Контрольной группы, получившей мекамиламин против  $43.1 \pm 2.58$  у хронически никотинизированной группы ПГ, получившей мекамиламин,  $P < .05$ , Sidak's test,  $n = 5$ ).

Таким образом, основываясь на результатах поведенческих тестов, можно заключить, что изменения, вызванные пренатальной гипоксией, приводят к ускоренному развитию никотиновой зависимости и более выраженному синдрому отмены.

#### **4.3. Содержание дофамина и DAR1 в структурах мезолибического пути**

Мезокортиколимбическая система представляет из себя проекции дофаминергических нейронов, идущих от VTA к NAc и PFC. В терминальных структурах образуется сложный синапс, в котором дофаминовые проекции конвергируют с глутаматными и оказывают модулирующее действие на глутаматную проводимость. Опираясь на полученные ранее данные по ослабленному биосинтезу и сниженной эффективности глутаматергической передачи в нейронах гиппокампа, отдающего проекции в том числе в NAc, нами был проведен базовый скрининг уровня дофамина в дофаминергических путях и его дофаминовых рецепторов в рецептирующих дофамин структурах.



**Рисунок 9. Уровни дофамина в VTA и стриатуме ПГ и контрольных крыс.**

На диаграмме (А) продемонстрировано отсутствие различий в уровнях дофамина в VTA, структуре, содержащей тела дофаминергических нейронов и соответственно продуцирующей дофамин. Также не было обнаружено различий в уровнях дофамина стриатума (В), конечной структуры мезомлнимбической системы, принимающей дофаминергические проекции и рецептирующей дофамин. Данные представлены как медиана.

Сравнение тотального уровня дофамина, полученного методом ИФА, дает нам информацию о биосинтезе дофамина в VTA и его транспортировке в NAc. Нами не было обнаружено различий в уровнях дофамина в VTA (Рис. 9А,  $P = .6905$ , Mann-Whitney test) и стриатуме (Рис. 9В,  $P = .9637$ , Student's test) отсутствовали.

На Рисунке 10 представлены результаты Вестрн-блот анализа содержания дофаминового рецептора DAR1 в NAc (Рис. 10А,  $P = .40$ , Mann-Whitney test,) и PFC (Рис. 7В,  $P = .40$ , Mann-Whitney test) 3-месячных крыс. И как видно пренатальная гипоксия не приводит к изменениям уровней DAR1 в обеих рецептирующих дофамин структурах экспериментальных животных по сравнению с контролем.

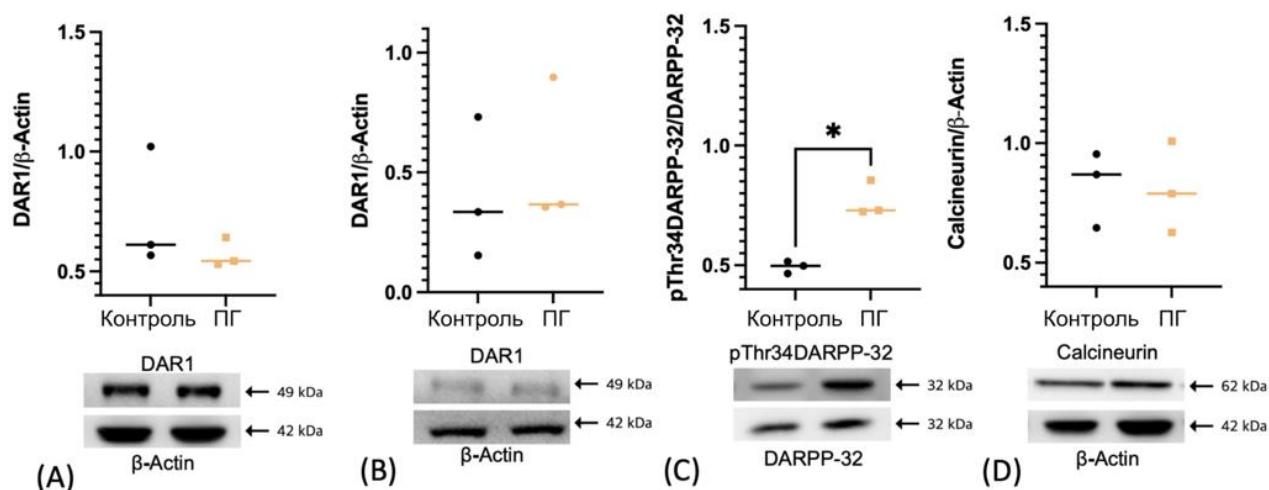
#### **4.4. Степень фосфорилирования белка DARPP-32 по 34 треониновому остатку в NAc и PFC**

Отсутствие изменений в дофаминергических нейронах в целом говорит о том, что пренатальная гипоксия не влияет на их постнатальный фенотип. Однако, учитывая ослабление глутаматергической системы гиппокампа, иннервирующего NAc, с целью оценки суперпозиции между взаимодействиями дофаминергической и глутаматергической системами NAc мы измеряли уровень фосфорилирования белка DARPP-32, который является интегратором конвергирующих на ГАМКергических средних шипиковых нейронах NAc дофаминового и глутаматного сигналинга, по 34 треониновому остатку. Активность белка DARPP-32 зависит от его фосфорилирования по множеству регуляторных сайтов, включая Thr34, Thr75. Паттерны фосфорилирования зависят от динамического баланса между активацией протеинкиназ и протеинфосфотаз. Активация DAR1 увеличивает уровень цАМФ и опосредованно этим активирует протенкиназу А, фосфорилирующую DARPP-32 по Thr34 [160]. Опосредованное действие глутамата через  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин зависимую фосфатазу кальцинейрин (PP2B) дефосфорилирует DARPP-32 по указанному сайту. Таким образом, дофамин через активацию путей DAR1/cAMP/PKA и глутамат через NMDA или AMPA рецепторы/ $\text{Ca}^{2+}$ /PP2B осуществляют взаимно антагонистичную регуляцию уровня pThr34DARPP-32 [161].

Мы использовали DARPP-32 как маркер дофамин-глутаматного взаимодействия в NAc и обнаружили увеличение количества pThr34DARPP-32 у ПГ крыс (0.5 у Контрольной группы против 0.73 у группы ПГ, Рис. 10C, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ,  $n=3$ ). Эти результаты также были подтверждены дот-блот анализом. Такое увеличение pThr34DARPP-32 у ПГ крыс происходит на фоне отсутствия изменения количества дофамина и DAR1. Основным кандидатом на участие в усилении фосфорилирования DARPP-32

является глутаматергическая система, реализующая свое влияние через кальцинейрин.

Поскольку кальцинейрин, участвующий в глутамат-опосредованном дефосфорилировании белка DARPP-32 является глюкокортикоид-зависимым геном с негативной регуляцией [162], мы провели его количественный анализ и не обнаружили различий (Рис. 10D). Таким образом, вместе с отрицательными результатами по содержанию дофамина и DAR1 это предполагает, что увеличение скорости фосфорилирования DARPP-32 не связано с изменениями в самой передаче дофаминового сигнала. Возможным объяснением могут быть изменения в передаче глутамата в стриатуме (ослабление) и/или VTA (усиление).



**Рисунок 10. Результаты вестерн-блот анализа белков NAc и PFC.** На диаграммах (A) и (B) представлены уровни DAR1 в NAc и PFC соответственно. На диаграмме (C) продемонстрированы результаты анализа уровней pThr34DARPP-32, в которых были обнаружены отличия между группами контроля и ПГ (\* - Mann-Whitney test,  $P < .05$ ). Кроме того, на диаграмме (D) представлены результаты по уровням кальцинейрина, принимающего участие в глутамат-ассоциированном дефосфорилировании pThr34DARPP-32 и являющегося глюкокортикоид- зависимым геном. Нами не было обнаружено изменений в уровне кальцинейрина в NAc, что исключает его влияние на паттерны фосфорилирования белка DARPP-32. Данные представлены как медиана.

#### **4.5. Изменения экспрессии гена *chrna7* в структурах лимбической системы**

Наиболее популярным в изучении генетических факторов предрасположенности к развитию никотиновой зависимости долгое время являлись работы по изучению полиморфизма генов, кодирующих субъединицы  $\alpha 4\beta 2\text{nAChR}$  и  $\alpha 7\text{nAChR}$  [163], демонстрирующие их ключевую роль в развитии никотиновой зависимости.  $\alpha 4\beta 2\text{nAChR}$  и  $\alpha 7\text{nAChR}$  являются наиболее распространенными типами ацетилхолиновых рецепторов в мозге [18]. Активация  $\alpha 4\beta 2\text{nAChR}$ , расположенных преимущественно на телах дофаминергических нейронов, прямо приводит к увеличению их спайковой активности и повышению уровня дофамина в NAc и PFC. Гетеромерные рецепторы, содержащие  $\beta 2$  субъединицу играют ключевую роль на начальных этапах развития никотиновой зависимости [70,164]. На аксонах глутаматергических нейронов, иннервирующих VTA и NAc располагаются исключительно  $\alpha 7\text{nAChR}$  рецепторы [18,23]. С точки зрения патогенеза пренатальной гипоксии особое внимание привлекает именно  $\alpha 7\text{nAChR}$ , поскольку экспрессия кодирующего субъединицу гена положительно регулируется глюкокортикоидными рецепторами (GR) [165,166]. Особенностью  $\alpha 7\text{nAChR}$  также является то, что он претерпевает медленную десенсибилизацию при введении агонистов [73,74], а на поздних этапах развития никотиновой зависимости выполняет ключевую роль в ее поддержании [67,75].

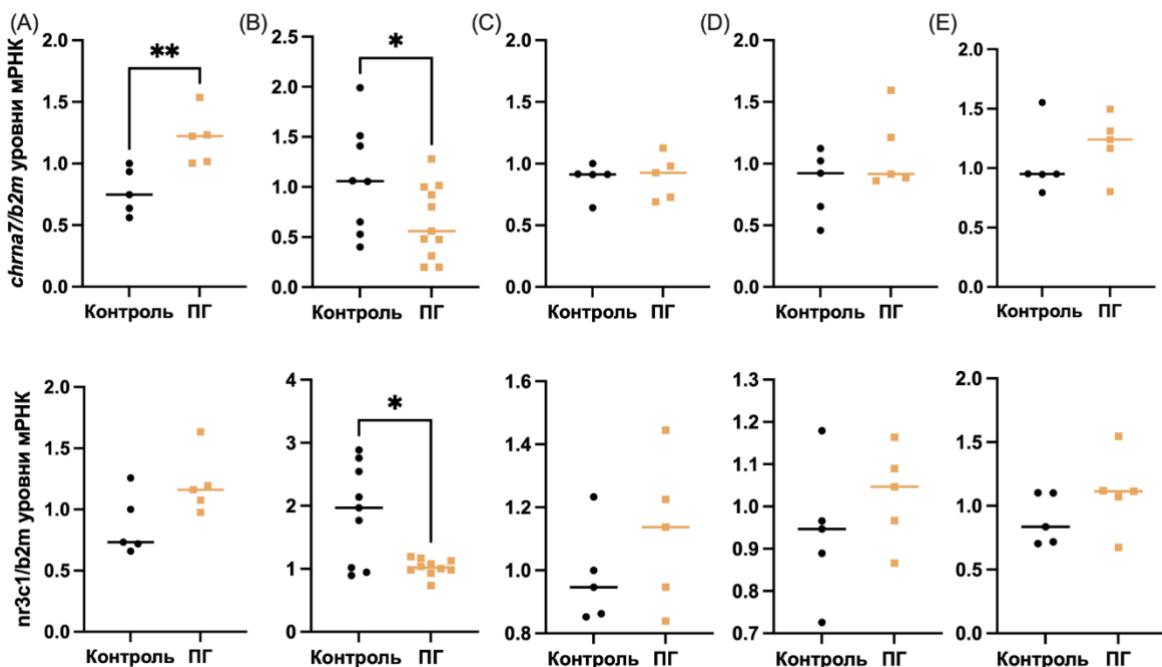
Нами было проведено исследование изменения экспрессии гена *chrna7*, кодирующего  $\alpha 7$  субъединицы nAChR, в различных структурах лимбической системы в возрасте 2 недель и 3 месяцев. У 2-недельных животных было обнаружено увеличение количества *chrna7* в PFC (Рис. 11 A, 0.74 у группы Контроля против 1.22 у группы ПГ, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ,  $n=5$ ), что не наблюдалось у 3-месячных животных ни в плане достоверных изменений (Рис 12. A), ни в плане достоверных корреляций (Рис. 14, A), несмотря на снижение

уровня экспрессии гена *nr3c1* в PFC (Рис. 12 А, 5.2 у группы Контроля против 2.5 у группы ПГ, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ,  $n=4$ ) к этому возрасту.

В гиппокампе 2-недельных ПГ крыс было обнаружено снижение экспрессии как гена *chrna7* (Рис. 11 В, 1.05 у группы Контроля против 0.56 у группы ПГ, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ,  $n=8-11$ ), так и *nr3c1* (Рис. 11 В, 1.96 у группы Контроля против 1.01 против группы ПГ, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ,  $n=9-11$ ). Синхронное снижение экспрессии *chrna7* и *nr3c1* в гиппокампе у 2-недельной группы прямо коррелировало между собой (Рис. 13 В, Spearman test,  $r = 0.73$ ,  $P < .05$ ), что в целом соответствует обнаруженному нами ранее снижению GR – зависимой транскрипции в гиппокампе ПГ крыс [16] и подтверждает гипотезу о том, что, как минимум, в структурах гиппокампа экспрессия *chrna7* является глюкокортикоид зависимой.

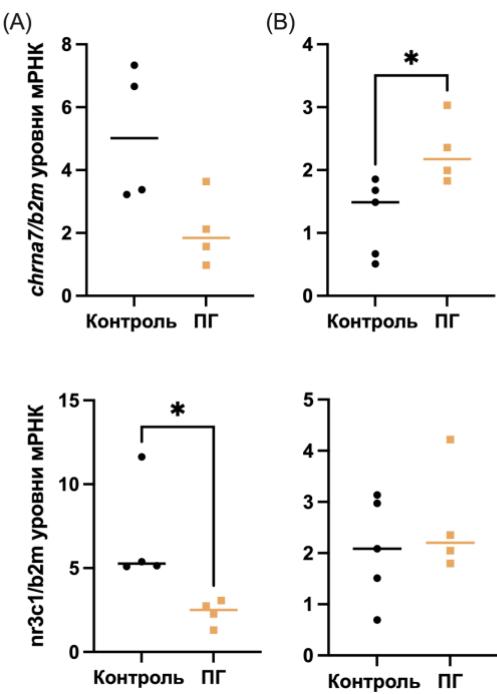
Интересным является наличие корреляции в экспрессии *chrna7* и *nr3c1* у групп ПГ в NAc, как в возрасте 2 недель (Рис. 13 С, Spearman test,  $r = 1$ ,  $P < .01$ ), так и в возрасте 3 месяцев (Рис. 14 В, Spearman test,  $r = 1$ ,  $P < .05$ ). При этом достоверное увеличение в экспрессии гена *chrna7* у группы ПГ в NAc наблюдается к возрасту 3 месяцев (Рис 12 В, Mann-Whitney test,  $P < .05$ ), а в возрасте 2 недель изменения отсутствуют (Рис. 11 С). Увеличенная аккумбальная экспрессия гена *chrna7* в возрасте 3 месяцев может являться одним из факторов предрасположенности к ускоренному развитию никотиновой зависимости несмотря на то, что результат по количеству *chrna7* в NAc является противоречивым, поскольку мРНК *chrna7* содержится только в глутаматергических проекциях к этой структуре. Как упоминалось ранее, NAc иннервируется глутаматергическими проекциями от PFC, гиппокампа, таламуса и амигдалы. Факт усиленной экспрессии *chrna7* на глутаматергических терминалях NAc остается важным для развития никотиновой зависимости, несмотря на то что их источник пока остается

неизвестным.



**Рисунок 11. Экспрессия *chRNA7* и *nr3c1* в структурах лимбической системы 2-недельных самцов крыс.** (A) – PFC, (B) – гиппокамп, (C) – NAc, (D) – VTA, (E) – амигдала. В структурах PFC (A) нами было обнаружено усиление экспрессии гена *chRNA7* (\*\* -  $P < .01$ , Mann-Whitney test), кодирующего субъединицы  $\alpha 7$ nAChR. В гиппокампе (B) было обнаружено снижение экспрессии *chRNA7* (\*) -  $P < .05$ , Mann-Whitney test), что коррелирует со снижением экспрессии гена *nr3c1* (\*) -  $P < .05$ , Mann-Whitney test), кодирующего GR рецептор и подтверждает литературные данные о том, что *chRNA7* является глюкокортикоид-зависимым геном. В остальных структурах, а именно (C) NAc, (D) VTA и (E) амигдале не было обнаружено изменений в экспрессии обоих генов. Данные представлены как медиана.

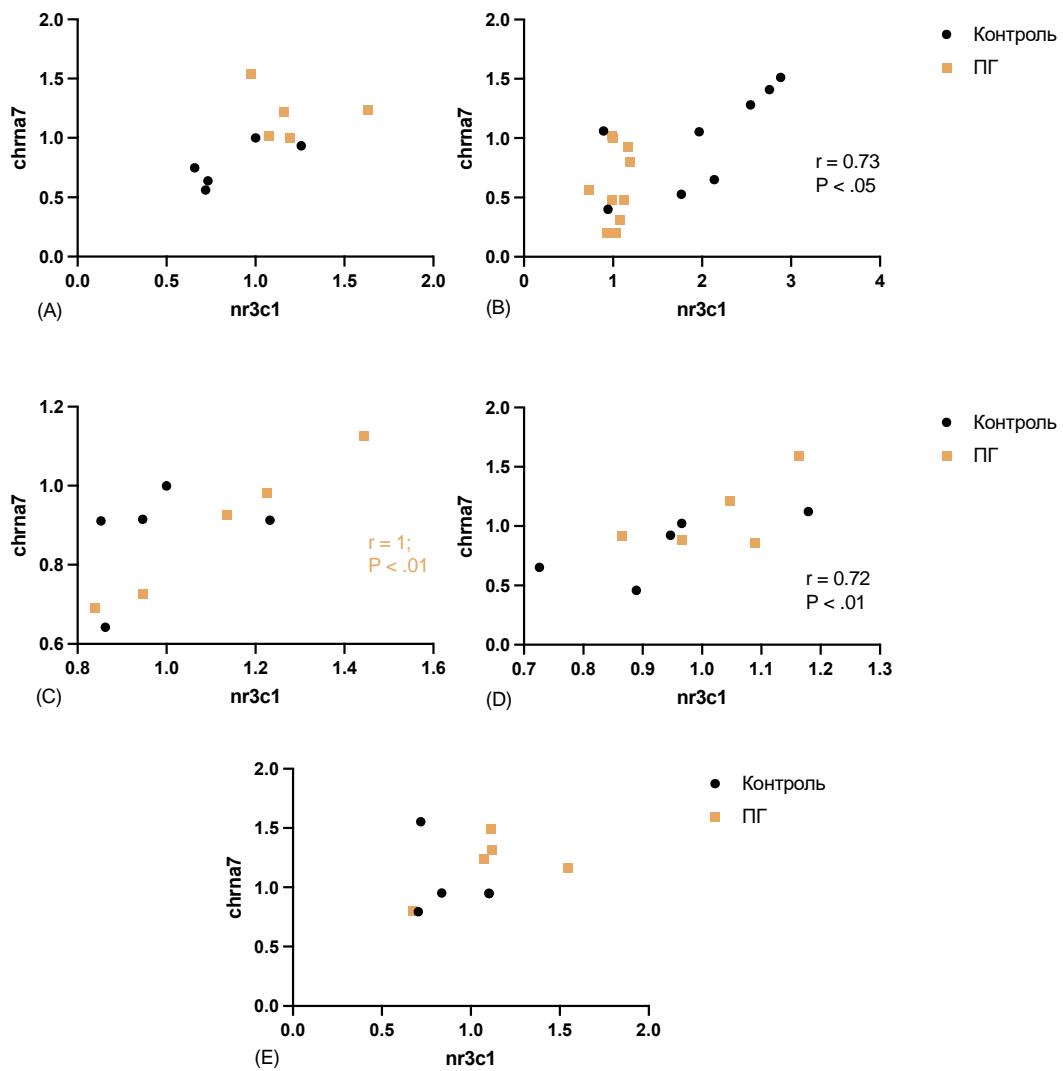
В NAc существует популяция ацетилхолинергических интернейронов, занимающая до 1% от всей нейрональной популяции NAc [167]. С использованием метода хемогенетического ингибирования, была показана вовлеченность ацетилхолиновых интернейронов NAc в выработку поведения, связанного с поиском никотина, а также в развитии глутаматергической нейропластичности [168].



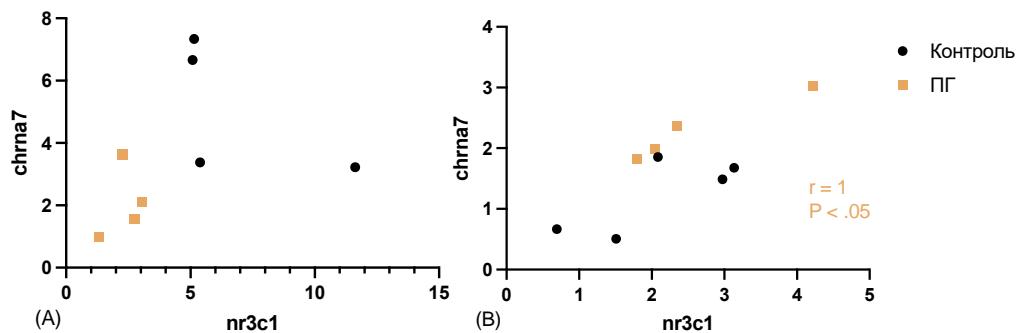
**Рисунок 12.** Экспрессия *chrna7* и *nr3c1* в структурах лимбической системы 3-месячных самцов крыс. (А) – PFC, (Б) – NAc. В структурах PFC (А) у 3-месячных животных не было обнаружено достоверных изменений в экспрессии гена *chrna7*, однако было обнаружено снижение экспрессии *nr3c1* (\* -  $P < .05$ , Mann-Whitney test), кодирующего GR. В NAc (Б) было обнаружено достоверное увеличение экспрессии *chrna7* (\* -  $P < .05$ , Mann-Whitney test), что предположительно приводит к большей чувствительности нейронов данной структуры и оканчивающихся в ней терминалях к никотину. При этом достоверных отличий в экспрессии *nr3c1* в данной структуре обнаружено не было. Данные представлены как медиана.

Таким образом, обнаруженное в настоящей работе увеличение количества  $\alpha 7\text{nAChR}$  в NAc предположительно повышает чувствительность данной структуры к никотину в эксперименте с хроническим парентеральным введением.

Наличие корреляции в экспрессии *chrna7* и *nr3c1* в VTA (Рис. 13, D), даже при отсутствии отличий (Рис. 11, D) имеет важное значение с точки зрения потенциального влияния глюкокортикоидов матери в период созревания VTA (более ранние сроки беременности крысы) на развитие никотиновой зависимости во взрослом возрасте у потомства.



**Рисунок 13. Корреляционный анализ экспрессии глюкокортикоид зависимого гена *chRNA7* к экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора *nr3c1* в структурах мезолимбической системы 2-недельных крыс. (А) – PFC (Б) – гиппокамп (С) – NAc (Д) – VTA (Е) – амигдала.** В гиппокампе 2-недельных Контрольных крыс (Б) нами была обнаружена положительная корреляция между экспрессией *chRNA7* и *nr3c1* ( $P < .05$ , Spearman test,  $r = 0.73$ ). Несмотря на то, что в NAc (С) ПГ крыс не было обнаружено достоверного увеличения *nr3c1*, количество мРНК *nr3c1* коррелирует с увеличенным количеством глюкокортикоид-зависимого гена *chRNA7* ( $P < .05$ , Spearman test,  $r = 1$ ). В VTA, не демонстрирующей различий в экспрессии *nr3c1* и *chRNA7* между группами, тем не менее при анализе совмещенной выборки также была обнаружена положительная корреляция ( $P < .05$ , Spearman test,  $r = 0.72$ ,  $n = 10$ ). В структурах PFC и амигдалы достоверных корреляций обнаружено не было.



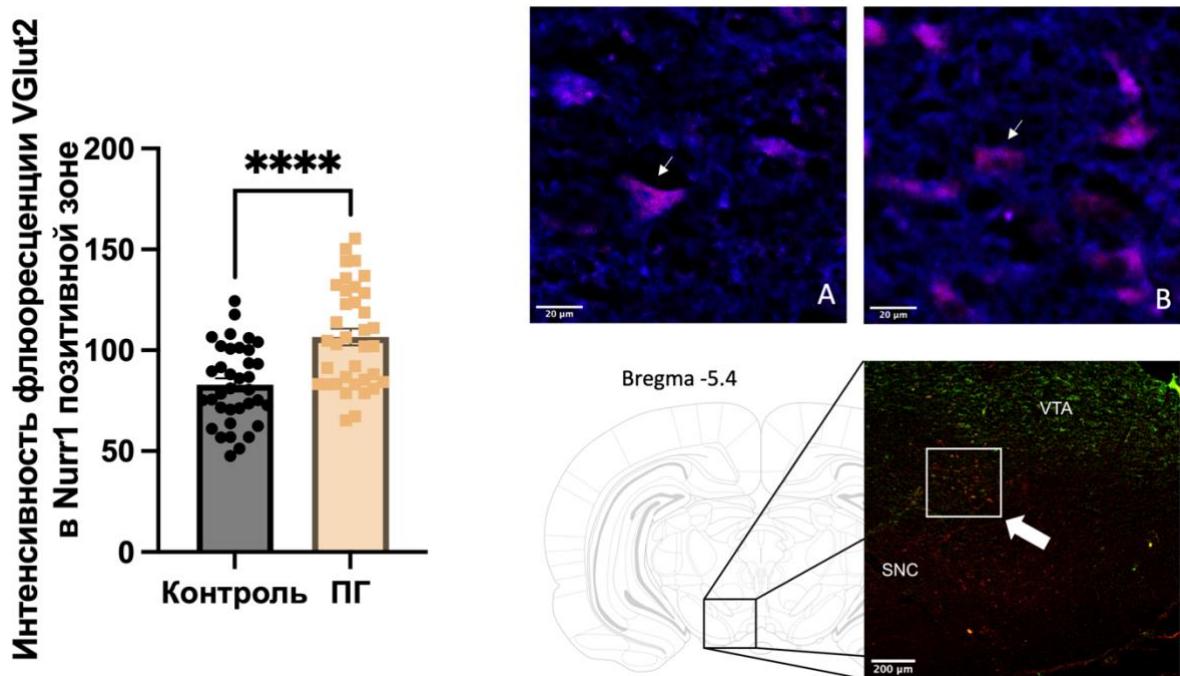
**Рисунок 14.** Корреляционный анализ экспрессии глюкокортикоид зависимого гена *chrna7* к экспрессии гена глюкорецептора *nr3c1* в структурах PFC и NAc 3-месячных крыс. При анализе зависимости экспрессии *chrna7* от *nr3c1* достоверные корреляции у 3-месячных крыс были обнаружены только для группы ПГ в NAc ( $P < .05$ , Spearman test,  $r = 1$ ). Что указывает на синхронность изменений в паттернах биосинтеза глюкокортикоидного рецептора и глюкокортикоид-зависимой экспрессии гена *chrna7* в возрасте 3 месяцев.

Тем не менее, даже нормальное количество транскрипта гена *chrna7* в VTA ПГ крыс имеет важное значение в развитии никотиновой зависимости, поскольку, как будет показано далее, количество VGluT2 позитивных терминалей, содержащих  $\alpha 7\text{nAChR}$ , у них увеличено.

#### 4.6. Эффект пренатальной гипоксии на VGluT2-позитивную глутаматергическую иннервацию Nurr1 позитивных нейронов VTA

VGluT2 является наиболее широко экспрессируемым типом глутаматных транспортеров в нейронах подкорковых глутаматергических структур. Практически все глутаматергические аксоны, оканчивающиеся на VTA, экспрессируют VGluT2 [130], а наибольшая иннервация приходится на проекции латерального гипоталамуса. Мы использовали VGluT2 как маркер глутаматных терминалей в VTA и обнаружили увеличение содержания VGluT2 на Nurr1 позитивных телах нейронов VTA у ПГ крыс по сравнению с контролем (Рис. 15,  $82.8 \pm 3.23$  у Контрольной группы против  $106.68 \pm 4.2$  у группы ПГ,  $P < .0001$ , Student's test,  $n = 36$ ), что означает усиленную

иннервацию дофаминергических нейронов глутаматергическими проекциями у экспериментальных животных.

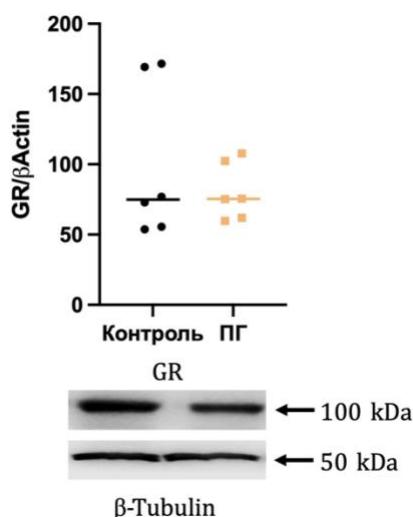


**Рисунок 15. VGlut2-позитивная иннервация дофаминергических нейронов VTA.** На левой диаграмме продемонстрировано увеличение VGlut2 позитивного сигнала в Nurr1 позитивных телах дофаминергических нейронов у ПГ крыс по сравнению с контролем. Данные рассчитаны как средняя  $\pm$  SEM (Student's test,  $P < .0001$ ). Правые изображения демонстрируют микрофотографии VTA. Большая белая стрелка указывает на регион интереса ( $\times 20$ , scale bar 200  $\mu\text{m}$ , красный – Nurr1 позитивные тела DA нейронов, зеленый – TH позитивные тела нейронов). Малые белые стрелки демонстрируют Nurr1 позитивные тела дофаминергических нейронов. (А – контроль, В – ПГ;  $\times 63$ , scale bar 20  $\mu\text{m}$ , красный – Nurr1 позитивные тела дафаминергических нейронов, синий – VGlut2 позитивные глутаматергические терминали).

#### 4.7. Эффект пренатальной гипоксии на количество GR в иннервирующем VTA гипоталамусе

Поскольку латеральный гипоталамус является мажорным источником глутаматергической иннервации для VTA, а глюкокортикоидные рецепторы являются транскрипционными факторами, регулирующими экспрессию ферментов синтеза-деградации глутамата, была проведена оценка количества

GR в этой структуре мозга. Если для высших глутаматергических структур нами ранее было показано снижение глюкокортикоид-зависимой транскрипции, то для структуры, отдающей мажорные глутаматергические проекции к VTA - гипоталамуса изменений в количестве GR обнаружено не было (Рис. 16). Исходя из этого факта, следует ожидать отсутствие изменений в экспрессии *chrna7* в проекциях от гипоталамуса к VTA, что должно усиливать эффект никотина на VTA через глутаматные проекции.



**Рисунок 16. Уровни GR в гипоталамусе.** При анализе количества GR в структурах гипоталамуса достоверных отличий между группами контроля и ПГ обнаружено не было. Результат продемонстрирован как медиана.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании было обнаружено, что изменения, возникающие в мозге крыс, переживших пренатальную гипоксию на 14-16 сутки гестации, предопределяют склонность к развитию никотиновой зависимости во взрослом возрасте. Это подтверждается тестом свободного потребления никотина, который продемонстрировал быстрое развитие предпочтения к никотину. После хронического принудительного потребления никотина нами также оценивался синдром отмены, который играет важную роль в компульсивном потреблении никотина. Вследствие того, что

никотиновая зависимость имеет относительно мягкие симптомы отмены, в настоящем исследовании мы тестировали аверсию к антагонисту никотина - мекамиламину, описанную в других исследованиях [29].

Введение мекамиламина (неспецифический антагонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, nAChR) провоцирует аверсию у контрольных и ПГ крыс, хронически получавших никотин, но не у ложнооперированных крыс, хронически получавших физиологический раствор. Кроме того, у ложнооперированных контрольных (но не ПГ) крыс введение мекамиламина провоцировало слабое предпочтение к месту, ассоцииированному с его введением. По всей вероятности, наблюдаемый эффект обусловлен слабым анксиолитическим эффектом мекамиламина [131]. Для проверки этого эффекта, мы выполняли другой тест, в котором введение мекамиламина было ассоциировано с черной половиной тестовой установки, предпочтаемой крысами по естественным причинам. В этом teste, только получавшие никотин крысы избегали черную половину установки, ассоцииированную с инъекцией мекамиламина. В обоих тестах, группа ПГ демонстрировала более выраженную аверсию к мекамиламин-ассоциированной половине тестовой установки в сравнении с контролем. Таким образом, основываясь на результатах поведенческих экспериментов, можно заключить, что пренатальная гипоксия на 14-16-е сутки гестации приводит к облегчению развития никотиновой зависимости и более выраженному синдрому отмены.

Как и для любой другой зависимости, основным нервным контуром, участвующим в развитии никотиновой зависимости, является мезокортиколимбический дофаминергический путь. В механизме развития никотиновой зависимости принимает участие множество факторов разного пространственного порядка, такие как быстрые и медленные изменения внутриклеточного сигналинга, пластические изменения рецептирующих дофамин нейронов, а также пластические изменения корегулирующих

нейронов. С точки зрения предрасположенности к развитию зависимости имеет большое значение изначальное состояние обозначенных нейрональных групп и проекций. Пренатальная гипоксия рассматривается нами, как патология, эпигенетически и пластически модифицирующая мезокортиколимбическую систему. Как описывалось в обзоре литературы, мезокортиколимбическая система представляет из себя проекции дофаминергических нейронов, идущих от VTA к NAc и PFC. В терминальных структурах образуется сложный синапс, в котором дофаминовые проекции конвергируют с глутаматными и оказывают модулирующее действие на глутаматную проводимость. Основываясь на полученные ранее данные по ослабленному биосинтезу и сниженной эффективности глутаматергической передачи в нейронах гиппокампа [23], отдающего проекции в том числе в NAc, в данном исследовании был проведен базовый скрининг уровня дофамина в дофаминергических путях и его дофаминовых рецепторов в рецептирующих дофамин структурах. Нами не было обнаружено отклонений в содержании дофамина как в VTA, структуре, где происходит биосинтез дофамина, так и в стриатуме, где оканчиваются аксоны мезолимбического пути. Также не было обнаружено каких-либо изменений уровня DAR1, рецептора, ассоциированного с развитием аддикций и Павловского условного рефлекса, в NAc и PFC [170].

Отсутствие изменений в дофаминергических нейронах, говорит о том, что пренатальная гипоксия не влияет на их фенотип. Однако, учитывая ослабление глутаматергической системы гиппокампа, иннервирующего NAc, с целью оценки суперпозиции между взаимодействиями дофаминергической и глутаматергической системами NAc был измерен уровень фосфорилирования белка DARPP-32, который является интегратором конвертирующих на ГАМКергических средних шипиковых нейронах NAc дофаминового и глутаматного сигналинга, по 34 треониновому остатку. В различных исследованиях показано, что в отличие от строгого разделения на

D1 и D2 нейрональные субпопуляции в дорсальном стриатуме, до 30% средних шипиковых нейронов в NAc экспрессирует оба подтипа дофаминовых рецепторов [171,172]. В то же время, активность белка DARPP-32 зависит от его фосфорилирования по множеству регуляторных сайтов, включая Thr34, Thr75. Паттерны фосфорилирования зависят от динамического баланса между активацией протеинкиназ и протеинфосфотаз. Активация DAR1 увеличивает уровень цАМФ и опосредованно этим активирует протенкиназу A, фосфорилирующую DARPP-32 по Thr34 [160]. Опосредованное действие глутамата через кальций-кальмодулин зависимую фосфатазу кальцинейрин (PP2B) дефосфорилирует DARPP-32 по указанному сайту. Таким образом, дофамин через активацию путей DAR1/cAMP/PKA и глутамат через NMDA или AMPA рецепторы/Ca<sup>2+</sup>/PP2B осуществляют взаимно антагонистичную регуляцию уровня pThr34DARPP-32 [173]. Мы использовали DARPP-32 как маркер дофамин-глутаматного взаимодействия в NAc и обнаружили увеличение количества pThr34DARPP-32 у ПГ крыс. Такое увеличение у ПГ крыс не может быть объяснено изменениями в количестве дофамина и DAR1. Существует две потенциальные гипотезы, способные объяснить увеличение уровня pThr34DARPP-32, которые помимо прочего позволяют предположить потенциальные изменения в локальной глутаматной трансмиссии и связанное с этим облегченное развитие никотиновой зависимости у ПГ крыс.

Первая гипотеза предполагает ослабление локальной глутаматной иннервации в NAc, состоящей из двух частей. Отвечающее за оценку подкрепляющего стимула и инициирующее двигательное событие, связанное с получением награды, ядро NAc (NAc core) получает проекции от PFC и дорсального гиппокампа [174]. Крупнейшая глутаматергическая проекция в оболочку NAc (NAc shell) отходит от поля CA1 гиппокампа [174,175]. Таким образом, активация гиппокампа приводит к возбуждению аккумбалльных и VTA нейронов [137,176]. Глутаматергические гиппокампальные проекции возбуждают ГАМКергические нейроны NAc, которые в свою очередь

ингибируют ГАМКергические нейроны вентрального паллидума, освобождая дофаминергические нейроны VTA от ингибирующего влияния паллидума [158]. Ранее у ПГ крыс, мы показали возраст-ассоциированное снижение гиппокампального уровня глутамата, сопровождающееся снижением экспрессии генов белков, обеспечивающих метаболизм и рециклинг глутамата в гиппокампе [16]. Нарушенная глутаматергическая стимуляция от вентрального и дорсального гиппокампа может объяснить феномен повышенного уровня pThr34DARPP-32 в NAc. Однако, до сих пор непонятным остается вопрос, насколько значим вклад иннервации NAc от структур гиппокампа в развитие никотиновой зависимости, а также какую роль в этом могут играть нарушения глутаматергической системы гиппокампа.

Если подходить к вопросу развития зависимости с точки зрения глутаматергической системы, то наиболее интересным для изучения является распределение никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, расположенных на глутаматных пресинаптических мембранах. Наиболее популярными в изучении генетических факторов предрасположенности к развитию никотиновой зависимости долгое время являлись работы по изучению полиморфизма генов, кодирующих субъединицы  $\alpha 4\beta 2$ nAChR и  $\alpha 7$ nAChR [163,177], которые демонстрируют их особую важность в развитии никотиновой зависимости.  $\alpha 4\beta 2$ nAChR и  $\alpha 7$ nAChR являются наиболее распространенными типами ацетилхолиновых рецепторов в мозге [18]. Активация  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, расположенных преимущественно на телах дофаминергических нейронов, прямо приводит к увеличению их спайковой активности и повышению уровня дофамина в NAc и PFC. На аксонах глутаматергических нейронов, иннервирующих VTA и NAc преимущественно располагаются  $\alpha 7$ nAChR рецепторы [18,23]. С точки зрения патогенеза пренатальной гипоксии особое внимание привлекает именно  $\alpha 7$ nAChR, поскольку экспрессия кодирующего субъединицу гена положительно

регулируется GR [165,166]. Особенностью  $\alpha 7$ nAChR также является то, что он претерпевает медленную десенсибилизацию при введении агонистов [73,74], а на поздних этапах развития никотиновой зависимости выполняет ключевую роль в поиске никотина [67,75].

Нами было проведено исследование изменения экспрессии гена *chrna7*, кодирующего субъединицы  $\alpha 7$ nAChR, в различных структурах лимбической системы контрольных и ПГ крыс в возрасте 2 недель и 3 месяцев. У 2-недельных ПГ животных было обнаружено увеличение количества *chrna7* в PFC, что не наблюдалось у 3-месячных животных ни в плане достоверных изменений, ни в плане достоверных корреляций, несмотря на снижение уровня экспрессии GR в PFC к этому возрасту. В гиппокампе 2-недельных животных было обнаружено снижение экспрессии как  $\alpha 7$ nAChR, так и GR, что соответствует обнаруженному нами ранее снижению GR – зависимой транскрипции в гиппокампе ПГ крыс [9,16].

Интересным является наличие корреляции в экспрессии *chrna7* и GR в NAc ПГ крыс, как в возрасте 2 недель, так и в возрасте 3 месяцев. При этом достоверное увеличение в экспрессии *chrna7* у ПГ крыс по сравнению с контролем наблюдается в возрасте 3 месяцев, а в возрасте 2 недель изменения отсутствуют. Увеличенная экспрессия *chrna7* в NAc в возрасте 3 месяцев может являться одним из факторов предрасположенности к ускоренному развитию никотиновой зависимости. При этом, результат по количеству *chrna7* в NAc является противоречивым, поскольку мРНК *chrna7* содержится только в глутаматергических проекциях к этой структуре. Как упоминалось ранее, NAc иннервируется глутаматергическими проекциями от PFC, гиппокампа, таламуса и амигдалы. В PFC было показано отсутствие изменений в количестве *chrna7* у 3-месячных ПГ животных. В гиппокампе, предположительно, экспрессия *chrna7* будет снижена, как и экспрессия других GR-зависимых генов. Для поиска источника повышенной экспрессии *chrna7*,

дальнейшей дискриминации подлежат проекции таламуса и амигдалы. Тем не менее, факт усиленной экспрессии *chrna7* на глутаматергических терминалях NAc ПГ крыс остается важным для развития никотиновой зависимости, несмотря на то что их источник пока остается неизвестным.

В VTA, структуре среднего мозга, где берут начало дофаминергические нейроны, никотин также опосредует свои эффекты через активацию  $\alpha 4\beta 2$ nAChR, колокализованных с глутаматными рецепторами на дофаминергических нейронах и  $\alpha 7$ nAChR, представленных на пресинаптической мемbrane глутаматергических проекций к VTA, прямо или опосредованно вызывая выброс дофамина [20–22]. Собственно, альтернативная гипотеза предполагает изменения в возбуждающей глутаматергической стимуляции дофаминергических нейронов VTA. VTA иннервируется глутаматергическими аксонами, большинство из которых проецируется от субкортикальных структур экспрессирующих VGluT2 [156] (в отличие от VGluT1-позитивных аксонов, отходящих от кортикальных регионов [40,26]). Наибольшее число VGluT2-экспрессирующих нейронов, проецирующихся к дофаминергическим нейронам VTA, обнаружено в латеральном гипоталамусе [156], некоторые афференты к VTA отходят от латеродорсального тегментума и педунколопонтинных тегментарных ядер ствола мозга. [158]. 7% VGluT2-экспрессирующих нейронов которые иннервируют VTA, отходят от латеральной хабенулы и являются главным кандидатом на источник сигналов, связанных с отрицательным подкреплением, поскольку образуют синапсы с ГАМК интернейронами VTA. Мы выявили увеличение VGluT2-позитивных глутаматергических терминалей на телах дофаминергических нейронов в VTA ПГ крыс.  $\alpha 7$ nAChR находящиеся на глутаматергических терминалях не десенсилизируются низкими концентрациями никотина, ассоциированными с курением табака [73,74]. Однако, отличные от  $\alpha 7$ nAChR рецепторы на аксонах ГАМКергических нейрональных проекций, отходящих от паллидума и на

внутренних ГАМК интернейронах претерпевают быструю десентизацию сразу после никотинового воздействия, и как следствие, происходит ослабление ингибирующего влияния на дофаминергические нейроны [73,74]. Таким образом, введение никотина, супрессирующее эффект ГАМК и усиливающее глутаматный эффект на дофаминергические нейроны VTA может приводить к ускоренному развитию зависимости у ПГ крыс, поскольку количество глутаматергических терминалей у них базово увеличено. Другой важный факт для дискуссии — это то, что  $\alpha 7$  субъединица nAChR (как и многие гены глутаматного метаболизма и оцененный кальцинейрин) является продуктом глюокортикоид-зависимого гена с положительной регуляцией [165]. Если для высших глутаматергических структур нами было показано снижение глюокортикоид-зависимой транскрипции, то для иннервирующего VTA гипоталамуса изменений в количестве GR обнаружено не было. Исходя из этого факта, следует ожидать, как минимум, отсутствие изменений в экспрессии *chrna7* в проекциях от гипоталамуса к VTA, что должно усиливать эффект никотина на VTA через глутаматные проекции.

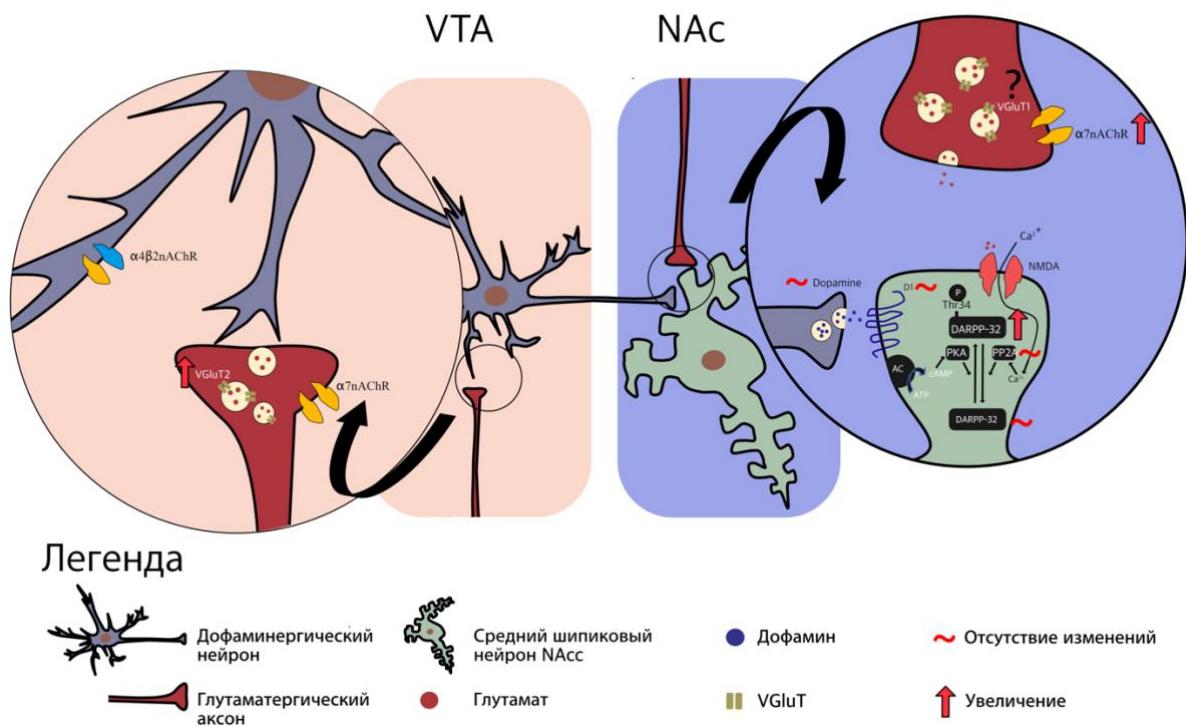
## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе было показано, что сложный фенотип, формируемый пренатальным гипоксическим стрессом, является фактором предрасположенности к никотиновой зависимости. Несмотря на то, что наиболее очевидным фактором должно быть снижение уровня кислорода в организме матери и соответственно в плацентарной крови, значимые эффекты гипоксии могут быть опосредованы эндокринной системой матери. Наши недавние работы показали, что у потомства повышение базального уровня кортикостерона, происходящее вследствие глюокортикоидного ответа матери на гипоксию остается стабильным в течение жизни [9]. По всей вероятности, именно выброс глюокортикоидов у беременных самок, переживших гипоксию в период гестации, является важным фактором,

индуцирующим долговременные нарушения в глюокортикоидной системе потомства. Уровни глюокортикоидов во время пренатального онтогенеза являются важным фактором, вносящим вклад в феномен «программирования развития через стресс» [178]. Данный феномен имеет огромную эволюционную ценность в плане подготовки потомства к выживанию в суровых условиях, возможно посредством ускоренного раннего постнатального развития мозга. Но в то же время, пренатальная гипоксия, сопровождаемая стрессом матери, является предрасполагающим фактором для развития никотиновой зависимости у потомства.

На Рисунке 17 обобщены результаты инструментальных исследований никотиновой зависимости, ассоциированной с пренатальной гипоксией. Предполагается, что основным патогенетическим звеном являются изменения, возникающие в глутаматергической передаче. Однако данные, полученные на разных структурах мозга потомства, можно трактовать по-разному. Центральным моментом, демонстрирующим изменения в глутаматной иннервации мезостриатной системы является увеличение pThr34DARPP-32 в NAc. Усиленное фосфорилирование белка DARPP-32 можно объяснить либо ослаблением локальной глутаматной трансмиссии в NAc, либо усилением дофаминергической трансмиссии от VTA. Второе предположение отвергается на уровне биосинтеза и транспортировки дофамина фактом отсутствия изменений в количестве дофамина и его рецепторов первого типа. Гипотезу ослабленной глутаматной трансмиссии в NAc частично подтверждают полученные нами ранее данные по снижению транскрипции генов белков биосинтеза глутамата в гиппокампе. Тем не менее в этой структуре было обнаружено увеличение мРНК *chrna7*, кодирующей  $\alpha 7$ nAChR – ключевую субъединицу никотинового ацетилхолинового рецептора для развития никотиновой зависимости. Этот факт указывает на то, что во время употребления никотина изначально ослабленная глутаматная передача в NAc должна потенцироваться, в свою очередь усиливая эффект иннервирующих

NAc глутаматергических структур, таких как вентральный гиппокамп и PFC, приводя к форсированному формированию памяти, связанной с эпизодами употребления никотина. Наличие ПГ-индуцируемого увеличения VGluT2+ глутаматергических проекций в VTA, позволяет предположить, что данная структура получает усиленную глутаматергическую иннервацию, что косвенно также может влиять на усиление фосфорилирования белка DARPP-32 в NAc посредством усиления спайковой активности дофаминергических нейронов. Широко известно, что длительное потребление никотина приводит к усилинию глутаматной трансмиссии в VTA. Как и в NAc, глутаматергические проекции к VTA содержат  $\alpha 7nAChR$ , которые претерпевают медленную десенсибилизацию под действием агониста, в отличие от гетеромерных рецепторов, находящихся на неглутаматных нейронах. Таким образом, у ПГ крыс в VTA изначально сформирован фенотип, предрасполагающий к развитию никотиновой зависимости, ввиду ее усиленной иннервации глутаматными проекциями.



**Рисунок 17. Возможные механизмы развития ПГ-ассоциированной никотиновой зависимости.**

## **ВЫВОДЫ**

1. Крысы, пережившие пренатальную гипоксию на 14-16 сутки эмбрионального развития, во взрослом возрасте отличаются повышенной предрасположенностью к потреблению никотина в условиях свободного выбора, а также после хронического принудительного потребления никотина в отличие от контрольных животных демонстрируют признаки выраженной зависимости.
2. В прилежащем ядре стриатума крыс, переживших пренатальную гипоксию, выявлено увеличенное фосфорилирование активируемого дофамином и супрессируемого глутаматом белка DARPP-32 при отсутствии изменений количества дофамина и дофаминовых рецепторов 1го типа. Это свидетельствует о нарушении глутаматной регуляции мезолимбической системы вследствие пренатальной гипоксии либо на уровне прилежащего ядра стриатума (предположительно ослабление), либо вентральной тегментарной области (усиление).
3. У 2-недельных крыс, переживших пренатальную гипоксию, выявлено увеличение количества мРНК *chrna7* (ген, кодирующий ацетилхолиновый receptor  $\alpha 7nAChR$ ) в префронтальной коре и снижение в гиппокампе. У 3-месячных крыс увеличение экспрессии *chrna7* также затрагивает прилежащее ядро стриатума, что дополняет понимание механизма увеличения предрасположенности пренатально гипоксированных крыс к никотиновой зависимости. Кроме того, выявленная корреляция между уровнем мРНК *chrna7* и экспрессией глюкокортикоидных рецепторов указывает на роль не связанной с гипоксией компоненты стрессорной реакции матери в формировании предрасположенности к аддиктивным патологиям.
4. В вентральной тегментарной области крыс, переживших пренатальную гипоксию, выявлено увеличение количества VGlut2+ глутаматергических терминалей на дофаминергических нейронах.

5. Ввиду того, что не претерпевающий десенсибилизацию  $\alpha 7$ nAChR, находится на глутаматергическом пресинапсе, отсутствие изменений в количестве глюкокортикоидных рецепторов гипоталамуса, глутаматергически иннервирующего вентральную тегментарную область при наличии прямой корреляции между экспрессией *nr3c1* и *chrna7*, предположительно сохраняет чувствительность данных проекций к никотину у крыс, переживших пренатальную гипоксию. Таким образом в вентральной тегментарной области формируется фенотип «глутаматергически опосредованной чувствительности» к никотину, что, по-видимому, и является предрасполагающим фактором к развитию никотиновой зависимости.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**ПГ** – пренатальная гипоксия

**HPA** – гипоталамо-гипофизарно адренокортикальная система

**DAR1** - dopamine receptor of type 1 – дофаминовый рецептор 1го типа

**DARPP-32** - dopamine and cAMP-related phosphoprotein

**NAc** - nucleus accumbens – прилежащее ядро стриатума

**GR** – глюкокортикоидный рецептор

**pThr34DARPP-32** - фосфорилированный по 34 треониновому остатку DARPP-32

**nAChR** - nicotinic acetylcholine receptor – никотиновый ацетилхолиновый receptor

**Nurr1** – nuclear receptor-related protein 1

**PFC** - prefrontal cortex – префронтальная кора

**VTA** - ventral tegmental area – вентральная тегментарная область

**VGluT2** - vesicular glutamate transporter of type 2 – везикулярный глутаматный транспортер 2 типа

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Martins S.S. et al. Racial/ethnic differences in trends in heroin use and heroin-related risk behaviors among nonmedical prescription opioid users // Drug and Alcohol Dependence. 2015. Vol. 151. P. 278–283.
2. Nielsen D.A. et al. Former heroin addicts with or without a history of cocaine dependence are more impulsive than controls // Drug and Alcohol Dependence. 2012. Vol. 124, № 1–2.
3. Crabbe J.C. Genetic Contributions to Addiction // Annual Review of Psychology. 2002. Vol. 53, № 1.
4. Briand L.A., Blendy J.A. Molecular and genetic substrates linking stress and addiction // Brain Research. 2010. Vol. 1314.
5. Bloom S. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight // Obstetrics & Gynecology. 2001. Vol. 97, № 4.
6. French N.P. et al. Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development // American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1999. Vol. 180, № 1.
7. Nyirenda M., Welberg L. Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? // Journal of Endocrinology. 2001. Vol. 170, № 3.
8. Reinisch J. et al. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth // Science (1979). 1978. Vol. 202, № 4366.
9. Vetrovoy O. et al. Long-Term Effects of Prenatal Severe Hypoxia on Central and Peripheral Components of the Glucocorticoid System in Rats // Developmental Neuroscience. 2021. Vol. 42, № 2–4

10. Xiong F., Zhang L. Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in developmental programming of health and disease // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2013. Vol. 34, № 1.
11. Tomalski P., Johnson M.H. The effects of early adversity on the adult and developing brain // *Current Opinion in Psychiatry*. 2010. Vol. 23, № 3.
12. Li Y., Gonzalez P., Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions // *Progress in Neurobiology*. 2012. Vol. 98, № 2.
13. Piešová M., Mach M. Impact of perinatal hypoxia on the developing brain // *Physiological Research*. 2020. Vol. 69, № 2. P. 199–213.
14. Graham E.M. et al. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008. Vol. 199, № 6.
15. Kurinczuk J.J., White-Koning M., Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic–ischaemic encephalopathy // *Early Human Development*. 2010. Vol. 86, № 6.
16. Vetrovoy O. et al. Prenatal Hypoxia Induces Premature Aging Accompanied by Impaired Function of the Glutamatergic System in Rat Hippocampus // *Neurochemical Research*. 2021. Vol. 46. P. 550–563.
17. Benowitz N.L. Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2009. Vol. 49. P. 57–71.
18. Dani J.A., Bertrand D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007. Vol. 47, № 1.

19. Laviolette S.R., van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour // *Nature Reviews Neuroscience*. 2004. Vol. 5, № 1.
20. Jones I.W., Wonnacott S. Precise localization of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area // *Journal of Neuroscience*. 2004. Vol. 24, № 50.
21. Picciotto M.R., Corrigall W.A. Neuronal Systems Underlying Behaviors Related to Nicotine Addiction: Neural Circuits and Molecular Genetics // *Journal of Neuroscience*. 2002. Vol. 22, № 9.
22. Watkins S.S., Koob G.F., Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: Acute positive reinforcement and withdrawal // *Nicotine and Tobacco Research*. 2000. Vol. 2, № 1. P. 19–37.
23. Marchi M. et al. Direct evidence that release-stimulating alpha7\* nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals // *Journal of Neurochemistry*. 2002. Vol. 80, № 6.
24. Prestoz L., Jaber M., Gaillard A. Dopaminergic axon guidance: which makes what? // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2012. Vol. 6.
25. Kippin T.E. et al. Prenatal Stress Enhances Responsiveness to Cocaine // *Neuropsychopharmacology*. 2008. Vol. 33, № 4.
26. Liechti M.E., Markou A. Role of the Glutamatergic System in Nicotine Dependence // *CNS Drugs*. 2008. Vol. 22, № 9. P. 705–724.
27. Dravolina O.A. et al. mGlu1 receptor blockade attenuates cue- and nicotine-induced reinstatement of extinguished nicotine self-administration behavior in rats // *Neuropharmacology*. 2007. Vol. 52, № 2. P. 263–269.

28. Paterson N.E. et al. The mGluR5 antagonist MPEP decreased nicotine self-administration in rats and mice // *Psychopharmacology (Berl)*. 2003. Vol. 167, № 3. P. 257–264.
29. Suzuki T. et al. Mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats // *European Journal of Pharmacology*. 1996. Vol. 314, № 3. P. 281–284.
30. Bissonette G.B., Roesch M.R. Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to // *Genes, Brain and Behavior*. 2016. Vol. 15, № 1. P. 62–73.
31. Braver T.S., Barch D.M., Cohen J.D. Cognition and control in schizophrenia: a computational model of dopamine and prefrontal function // *Biological Psychiatry*. 1999. Vol. 46, № 3. P. 312–328.
32. Matsumoto M., Hikosaka O. Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula // *Nature Neuroscience*. 2009. Vol. 12, № 1. P. 77–84.
33. Bromberg-Martin E.S., Matsumoto M., Hikosaka O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting // *Neuron*. 2010. Vol. 68, № 5. P. 815–834.
34. Ferdinand N.K. et al. The Processing of Unexpected Positive Response Outcomes in the Mediofrontal Cortex // *Journal of Neuroscience*. 2012. Vol. 32, № 35. P. 12087–12092.
35. Bayer H.M., Glimcher P.W. Midbrain Dopamine Neurons Encode a Quantitative Reward Prediction Error Signal // *Neuron*. 2005. Vol. 47, № 1. P. 129–141.
36. Grace A.A. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: A hypothesis for the etiology of schizophrenia // *Neuroscience*. 1991. Vol. 41, № 1. P. 1–24.

37. di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction // Behavioural Brain Research. 2002. Vol. 137, № 1–2. P. 75–114.
38. Blanchard V. et al. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon // Molecular Brain Research. 1994. Vol. 22, № 1–4. P. 29–38.
39. Abeliovich A., Hammond R. Midbrain dopamine neuron differentiation: Factors and fates // Developmental Biology. 2007. Vol. 304, № 2. P. 447–454.
40. Ono Y. et al. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells // Development. 2007. Vol. 134, № 17. P. 3213–3225.
41. Rhinn M., Brand M. The midbrain–hindbrain boundary organizer // Current Opinion in Neurobiology. 2001. Vol. 11, № 1. P. 34–42.
42. Liu A., Joyner A.L. Early Anterior/Posterior Patterning of the Midbrain and Cerebellum // Annual Review of Neuroscience. 2001. Vol. 24, № 1. P. 869–896.
43. Ye W. et al. FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate // Cell. 1998. Vol. 93, № 5. P. 755–766.
44. Smits S.M. et al. Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons // European Journal of Neuroscience. 2003. Vol. 18, № 7. P. 1731–1738.
45. Saucedo-Cardenas O. et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late

- dopaminergic precursor neurons // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998. Vol. 95, № 7. P. 4013–4018.
46. Gates M.A. et al. Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons // European Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 23, № 5. P. 1384–1390.
  47. van den Munckhof P. et al. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons // Development. 2003. Vol. 130, № 11. P. 2535–2542.
  48. Smidt M.P. et al. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene *Pitx3* // Development. 2004. Vol. 131, № 5. P. 1145–1155.
  49. Marillat V. et al. Spatiotemporal expression patterns of *slit* and *robo* genes in the rat brain // Journal of Comparative Neurology. 2002. Vol. 442, № 2. P. 130–155.
  50. Lin L., Rao Y., Isacson O. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons // Molecular and Cellular Neuroscience. 2005. Vol. 28, № 3. P. 547–555.
  51. Hivert B. Robo1 and Robo2 Are Homophilic Binding Molecules That Promote Axonal Growth // Molecular and Cellular Neuroscience. 2002. Vol. 21, № 4. P. 534–545.
  52. Serafini T. et al. Netrin-1 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System // Cell. 1996. Vol. 87, № 6. P. 1001–1014.
  53. Bagri A. et al. Slit Proteins Prevent Midline Crossing and Determine the Dorsoventral Position of Major Axonal Pathways in the Mammalian Forebrain // Neuron. 2002. Vol. 33, № 2. P. 233–248.

54. Gates M.A. et al. Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit // European Journal of Neuroscience. 2004. Vol. 19, № 4. P. 831–844.
55. Flores C. et al. Netrin receptor deficient mice exhibit functional reorganization of dopaminergic systems and do not sensitize to amphetamine // Molecular Psychiatry. 2005. Vol. 10, № 6. P. 606–612.
56. Harfstrand A. et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986. Vol. 83, № 24. P. 9779–9783.
57. Khashan A.S. et al. Higher Risk of Offspring Schizophrenia Following Antenatal Maternal Exposure to Severe Adverse Life Events // Archives of General Psychiatry. 2008. Vol. 65, № 2. P. 146.
58. Deminière J.M. et al. Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers // Brain Research. 1992. Vol. 586, № 1. P. 135–139.
59. Schultz W. Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data // Physiological Reviews. 2015. Vol. 95, № 3. P. 853–951.
60. Ranaldi R. et al. Dopamine Fluctuations in the Nucleus Accumbens during Maintenance, Extinction, and Reinstatement of Intravenous d-Amphetamine Self-Administration // The Journal of Neuroscience. 1999. Vol. 19, № 10. P. 4102–4109.
61. Pfau J.G. et al. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat // Brain Research. 1990. Vol. 530, № 2. P. 345–348.
62. Shen H., Kalivas P.W. Reduced LTP and LTD in prefrontal cortex synapses in the nucleus accumbens after heroin self-administration // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2013. Vol. 16, № 5. P. 1165–1167.

63. Thomas M.J. et al. Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine // Nature Neuroscience. 2001. Vol. 4, № 12. P. 1217–1223.
64. Robinson T.E., Kolb B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine // European Journal of Neuroscience. 1999. Vol. 11, № 5. P. 1598–1604.
65. Dajas-Bailador F., Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling // Trends in Pharmacological Sciences. 2004. Vol. 25, № 6. P. 317–324.
66. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors // Trends in Neurosciences. 1997. Vol. 20, № 2. P. 92–98.
67. Liu X. Effects of blockade of  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors on cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behaviour in rats // The International Journal of Neuropsychopharmacology. 2014. Vol. 17, № 01. P. 105–116.
68. O'Connor E.C. et al. The  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine-receptor partial agonist varenicline inhibits both nicotine self-administration following repeated dosing and reinstatement of nicotine seeking in rats // Psychopharmacology (Berl). 2010. Vol. 208, № 3. P. 365–376.
69. Feduccia A.A., Chatterjee S., Bartlett S.E. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: neuroplastic changes underlying alcohol and nicotine addictions // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2012. Vol. 5, № 83.
70. Ramachandran Nair L., Liu X. Targeting the  $\alpha 4\beta 2$ - and  $\alpha 7$ -Subtypes of Nicotinic Acetylcholine Receptors for Smoking Cessation Medication Development. // J Addict Res Ther. 2019. Vol. 10, № 2.

71. Wonnacott S., Sidhpura N., Balfour D.J. Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour // Current Opinion in Pharmacology. 2005. Vol. 5, № 1. P. 53–59.
72. Tapper A.R. et al. Nicotine Activation of  $\alpha 4^*$  Receptors: Sufficient for Reward, Tolerance, and Sensitization // Science (1979). 2004. Vol. 306, № 5698. P. 1029–1032.
73. Mansvelder H.D., Keath J.R., McGehee D.S. Synaptic Mechanisms Underlie Nicotine-Induced Excitability of Brain Reward Areas // Neuron. 2002. Vol. 33, № 6.
74. Wooltorton J.R.A. et al. Differential Desensitization and Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Midbrain Dopamine Areas // The Journal of Neuroscience. 2003. Vol. 23, № 8.
75. Brunzell D.H., McIntosh J.M. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Motivation to Self-Administer Nicotine: Implications for Smoking and Schizophrenia // Neuropsychopharmacology. 2012. Vol. 37, № 5. P. 1134–1143.
76. Fujii S. et al. Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP // Brain Research. 1999. Vol. 846, № 1. P. 137–143.
77. Yamazaki Y. et al. Nicotine-induced switch in the nicotinic cholinergic mechanisms of facilitation of long-term potentiation induction // European Journal of Neuroscience. 2005. Vol. 22, № 4. P. 845–860.
78. Yamazaki Y. et al. Nicotine exposure *in vivo* induces long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated currents in the hippocampus // European Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 23, № 7. P. 1819–1828.

79. Reid M.S. et al. Nicotine stimulation of extracellular glutamate levels in the nucleus accumbens: Neuropharmacological characterization // *Synapse*. 2000. Vol. 35, № 2. P. 129–136.
80. Meshul C.K. et al. Nicotine Alters Striatal Glutamate Function and Decreases the Apomorphine-Induced Contralateral Rotations in 6-OHDA-Lesioned Rats // *Experimental Neurology*. 2002. Vol. 175, № 1. P. 257–274.
81. Gioanni Y. et al. Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission // *European Journal of Neuroscience*. 1999. Vol. 11, № 1. P. 18–30.
82. Toth E., Vizi E., Lajtha A. Effect of nicotine on levels of extracellular amino acids in regions of the rat brain in vivo // *Neuropharmacology*. 1993. Vol. 32, № 8. P. 827–832.
83. Toth E. et al. Effect of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: Role of glutamic acid // *Neurochemical Research*. 1992. Vol. 17, № 3. P. 265–271.
84. de Kloet E.R., Karst H., Joëls M. Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008. Vol. 29, № 2. P. 268–272.
85. Karst H. et al. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102, № 52. P. 19204–19207.
86. Angulo J.A., McEwen B.S. Molecular aspects of neuropeptide regulation and function in the corpus striatum and nucleus accumbens // *Brain Research Reviews*. 1994. Vol. 19, № 1. P. 1–28.

87. Schoffelmeer A.N.M. et al. Morphine-induced increase in D-1 receptor regulated signal transduction in rat striatal neurons and its facilitation by glucocorticoid receptor activation: Possible role in behavioral sensitization // Neurochemical Research. 1996. Vol. 21, № 11. P. 1417–1423.
88. Cole T.J. et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. // Genes & Development. 1995. Vol. 9, № 13. P. 1608–1621.
89. Turner J.D. et al. Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms // Nucleic Acids Research. 2008. Vol. 36, № 22. P. 7207–7218.
90. Mueller B.R., Bale T.L. Sex-Specific Programming of Offspring Emotionality after Stress Early in Pregnancy // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28, № 36. P. 9055–9065.
91. Weaver I.C.G. et al. The Transcription Factor Nerve Growth Factor-Inducible Protein A Mediates Epigenetic Programming: Altering Epigenetic Marks by Immediate-Early Genes // Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 27, № 7. P. 1756–1768.
92. Weaver I.C.G. Reversal of Maternal Programming of Stress Responses in Adult Offspring through Methyl Supplementation: Altering Epigenetic Marking Later in Life // Journal of Neuroscience. 2005. Vol. 25, № 47. P. 11045–11054.
93. Xiong F., Zhang L. Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in developmental programming of health and disease // Frontiers in Neuroendocrinology. 2013. Vol. 34, № 1. P. 27–46.

94. Harfstrand A. et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986. Vol. 83, № 24. P. 9779–9783.
95. Tombaugh G.C. et al. Glucocorticoids Exacerbate Hypoxic and Hypoglycemic Hippocampal Injury In Vitro: Biochemical Correlates and a Role for Astrocytes // Journal of Neurochemistry. 1992. Vol. 59, № 1. P. 137–146.
96. Flavin M.P. Influence of Dexamethasone on Neurotoxicity Caused by Oxygen and Glucose Deprivationin Vitro // Experimental Neurology. 1996. Vol. 139, № 1. P. 34–38.
97. Tuor U.I. Glucocorticoids and the Prevention of Hypoxic-Ischemic Brain Damage // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 1997. Vol. 21, № 2. P. 175–179.
98. Whitelaw A. Antenatal steroids and the developing brain // Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition. 2000. Vol. 83, № 2. P. 154F – 157.
99. Yehuda R., Fairman K.R., Meyer J.S. Enhanced Brain Cell Proliferation Following Early Adrenalectomy in Rats // Journal of Neurochemistry. 1989. Vol. 53, № 1. P. 241–248.
100. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2008. Vol. 32, № 6. P. 1073–1086.
101. Hartman S. et al. Prenatal Stress as a Risk—and an Opportunity—Factor // Psychological Science. 2018. Vol. 29, № 4. P. 572–580.
102. Pluess M., Belsky J. Prenatal programming of postnatal plasticity? // Development and Psychopathology. 2011. Vol. 23, № 1. P. 29–38.
103. Seckl J.R., Holmes M.C. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology //

Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism. 2007. Vol. 3, № 6. P. 479–488.

104. Ward A.J. Prenatal stress and childhood psychopathology // Child Psychiatry & Human Development. 1991. Vol. 22, № 2. P. 97–110.
105. Gutteling B.M. et al. The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers // European Child & Adolescent Psychiatry. 2005. Vol. 14, № 1. P. 41–51.
106. Gutteling B.M. et al. Does Maternal Prenatal Stress Adversely Affect the Child's Learning and Memory at Age Six? // Journal of Abnormal Child Psychology. 2006. Vol. 34, № 6. P. 787–796.
107. O'Donnell K., O'Connor T.G., Glover V. Prenatal Stress and Neurodevelopment of the Child: Focus on the HPA Axis and Role of the Placenta // Developmental Neuroscience. 2009. Vol. 31, № 4. P. 285–292.
108. Vallée M. et al. Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress-Induced Corticosterone Secretion // The Journal of Neuroscience. 1997. Vol. 17, № 7. P. 2626–2636.
109. Murmu M.S. et al. Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy // European Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 24, № 5. P. 1477–1487.
110. Estanislau C., Morato S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze // Behavioural Brain Research. 2005. Vol. 163, № 1. P. 70–77.
111. Alonso S.J., Damas C., Navarro E. Behavioral despair in mice after prenatal stress // Journal of Physiology and Biochemistry. 2000. Vol. 56, № 2. P. 77–82.

112. Hauser J., Feldon J., Pryce C.R. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats // Hormones and Behavior. 2009. Vol. 56, № 4. P. 364–375.
113. Razavinasab M. et al. Hyperexcitability of VTA dopaminergic neurons in male offspring exposed to physical or psychological prenatal stress // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2020. Vol. 101. P. 109923.
114. Pastor V., Pallarés M.E., Antonelli M.C. Prenatal stress increases adult vulnerability to cocaine reward without affecting pubertal anxiety or novelty response // Behavioural Brain Research. 2018. Vol. 339. P. 186–194.
115. Ganapathy V., Ramamoorthy S., Leibach F.H. Transport and metabolism of monoamines in the human placenta // Placenta. 1993. Vol. 14. P. 35–51.
116. Sarkar S. et al. Inhibition of placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by catecholamines via  $\alpha$ -adrenergic signaling // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2001. Vol. 281, № 6. P. R1966–R1974.
117. Meaney M.J., Szyf M., Seckl J.R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health // Trends in Molecular Medicine. 2007. Vol. 13, № 7. P. 269–277.
118. Benediktsson R. et al. Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure // Clinical Endocrinology. 1997. Vol. 46, № 2. P. 161–166.
119. Brown R.W. et al. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. // Endocrinology. 1996. Vol. 137, № 2. P. 794–797.

120. Tzschoppe A. et al. Dexamethasone stimulates the expression of leptin and 11 $\beta$ -HSD2 in primary human placental trophoblastic cells // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2011. Vol. 156, № 1. P. 50–55.
121. Horn S.R. et al. Neuroendocrine and immune pathways from pre- and perinatal stress to substance abuse // Neurobiology of Stress. 2018. Vol. 9. P. 140–150.
122. Merlot E., Couret D., Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity // Brain, Behavior, and Immunity. 2008. Vol. 22, № 1. P. 42–51.
123. Coussons-Read M.E., Okun M.L., Nettles C.D. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy // Brain, Behavior, and Immunity. 2007. Vol. 21, № 3. P. 343–350.
124. Vuillermot S. et al. A Longitudinal Examination of the Neurodevelopmental Impact of Prenatal Immune Activation in Mice Reveals Primary Defects in Dopaminergic Development Relevant to Schizophrenia // Journal of Neuroscience. 2010. Vol. 30, № 4. P. 1270–1287.
125. Schepanski S. et al. Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life // Frontiers in Immunology. 2018. Vol. 9.
126. Oitzl M.S. et al. Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2010. Vol. 34, № 6. P. 853–866.
127. Champagne D.L., Ronald de Kloet E., Joëls M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain // Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 2009. Vol. 14, № 3. P. 136–142.

128. Golan H., Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models // *Developmental Science*. 2006. Vol. 9, № 4.
129. Omelchenko N., Sesack S.R. Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources // *Neuroscience*. 2007. Vol. 146, № 3. P. 1259–1274.
130. GROENEWEGEN H.J. et al. Convergence and Segregation of Ventral Striatal Inputs and Outputs // *Ann N Y Acad Sci*. 1999. Vol. 877, № 1. P. 49–63.
131. Bast T. Toward an Integrative Perspective on Hippocampal Function: From the Rapid Encoding of Experience to Adaptive Behavior // *Reviews in the Neurosciences*. 2007. Vol. 18, № 3–4.
132. Groenewegen H.J. et al. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin // *Neuroscience*. 1987. Vol. 23, № 1. P. 103–120.
133. Kelley A.E., Domesick V.B. The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: An anterograde and retrograde-horseradish peroxidase study // *Neuroscience*. 1982. Vol. 7, № 10. P. 2321–2335.
134. Strange B.A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis // *Nature Reviews Neuroscience*. 2014. Vol. 15, № 10. P. 655–669.
135. Fanselow M.S., Dong H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? // *Neuron*. 2010. Vol. 65, № 1. P. 7–19.
136. Loureiro M. et al. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory // *Brain Structure and Function*. 2012. Vol. 217, № 1. P. 93–106.

137. Floresco S.B., Todd C.L., Grace A.A. Glutamatergic Afferents from the Hippocampus to the Nucleus Accumbens Regulate Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons // *The Journal of Neuroscience*. 2001. Vol. 21, № 13.
138. Blaha C.D. et al. Stimulation of the Ventral Subiculum of the Hippocampus Evokes Glutamate Receptor-mediated Changes in Dopamine Efflux in the Rat Nucleus Accumbens // *European Journal of Neuroscience*. 1997. Vol. 9, № 5. P. 902–911.
139. Floresco S.B. The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action // *Annual Review of Psychology*. 2015. Vol. 66, № 1. P. 25–52.
140. Sesack S.R., Pickel V.M. In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other // *Brain Research*. 1990. Vol. 527, № 2. P. 266–279.
141. Strange B.A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis // *Nature Reviews Neuroscience*. 2014. Vol. 15, № 10. P. 655–669.
142. Pennartz C.M.A. et al. The hippocampal–striatal axis in learning, prediction and goal-directed behavior // *Trends in Neurosciences*. 2011. Vol. 34, № 10. P. 548–559.
143. Ito R. et al. Functional Interaction between the Hippocampus and Nucleus Accumbens Shell Is Necessary for the Acquisition of Appetitive Spatial Context Conditioning // *Journal of Neuroscience*. 2008. Vol. 28, № 27. P. 6950–6959.
144. Valenti O., Lodge D.J., Grace A.A. Aversive Stimuli Alter Ventral Tegmental Area Dopamine Neuron Activity via a Common Action in the Ventral Hippocampus // *Journal of Neuroscience*. 2011. Vol. 31, № 11. P. 4280–4289.

145. Barr J.L., Bray B., Forster G.L. The Hippocampus as a Neural Link between Negative Affect and Vulnerability for Psychostimulant Relapse // The Hippocampus - Plasticity and Functions. InTech, 2018.
146. Sikora M. et al. NMDA Receptors on Dopaminoceptive Neurons Are Essential for Drug-Induced Conditioned Place Preference // *eneuro*. 2016. Vol. 3, № 3. P. ENEURO.0084-15.2016.
147. Pascoli V. et al. Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse // *Nature*. 2014. Vol. 509, № 7501. P. 459–464.
148. Taepavarapruk P., Butts K.A., Phillips A.G. Dopamine and Glutamate Interaction Mediates Reinstatement of Drug-Seeking Behavior by Stimulation of the Ventral Subiculum // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2015. Vol. 18, № 1.
149. Takano Y. et al. Hippocampal theta rhythm and drug-related reward-seeking behavior: An analysis of cocaine-induced conditioned place preference in rats // *Brain Research*. 2010. Vol. 1342. P. 94–103.
150. Tan S.-E. Roles of hippocampal NMDA receptors and nucleus accumbens D1 receptors in the amphetamine-produced conditioned place preference in rats // *Brain Research Bulletin*. 2008. Vol. 77, № 6. P. 412–419.
151. Vorel S.R. et al. Relapse to Cocaine-Seeking After Hippocampal Theta Burst Stimulation // *Science (1979)*. 2001. Vol. 292, № 5519. P. 1175–1178.
152. Lasseter H.C. et al. Sub-region specific contribution of the ventral hippocampus to drug context-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats // *Neuroscience*. 2010. Vol. 171, № 3. P. 830–839.
153. Atkins A.L., Mashhoon Y., Kantak K.M. Hippocampal regulation of contextual cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2008. Vol. 90, № 3. P. 481–491.

154. Tyul'kova E.I. et al. Effect of Prenatal Hypobaric Hypoxia on Glutamatergic Signal Transduction in Rat Brain // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011. Vol. 151, № 3. P. 275–277.
155. Tyul'kova E.I. et al. Prenatal hypoxia modifies working memory and the activity of hippocampal polyphosphoinositide system in rats // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2015. Vol. 51, № 2. P. 131–138.
156. Geisler S. et al. Glutamatergic Afferents of the Ventral Tegmental Area in the Rat // Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 27, № 21.
157. Fremeau R.T. et al. The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse // Neuron. 2001. Vol. 31, № 2.
158. Geisler S., Wise R.A. Functional Implications of Glutamatergic Projections to the Ventral Tegmental Area // Reviews in the Neurosciences. 2008. Vol. 19, № 4–5.
159. Malin D.H. et al. The nicotinic antagonist mecamylamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat // Psychopharmacology (Berl). 1994. Vol. 115, № 1–2. P. 180–184.
160. Hemmings H.C. et al. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1 // Nature. 1984. Vol. 310, № 5977.
161. Nishi A. et al. Role of Calcineurin and Protein Phosphatase-2A in the Regulation of DARPP-32 Dephosphorylation in Neostriatal Neurons // Journal of Neurochemistry. 2008. Vol. 72, № 5. P. 2015–2021.
162. Morsink M.C. et al. Acute Activation of Hippocampal Glucocorticoid Receptors Results in Different Waves of Gene Expression Throughout Time // Journal of Neuroendocrinology. 2006. Vol. 18, № 4. P. 239–252.

163. Mineur Y.S., Picciotto M.R. Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction // Biochemical Pharmacology. 2008. Vol. 75, № 1. P. 323–333.
164. Picciotto M., Zoli M., Changeux J.-P. Use of knock-out mice to determine the molecular basis for the actions of nicotine // Nicotine & Tobacco Research. 1999. Vol. 1, № 1. P. 121–125.
165. Carrasco-Serrano C., Criado M. Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1 // FEBS Letters. 2004. Vol. 566, № 1–3.
166. Hunter R.G. et al. Regulation of the nicotinic receptor alpha7 subunit by chronic stress and corticosteroids // Brain Research. 2010. Vol. 1325. P. 141–146.
167. Tepper J.M., Bolam J.P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons // Current Opinion in Neurobiology. 2004. Vol. 14, № 6. P. 685–692.
168. Leyrer-Jackson J.M. et al. Accumbens Cholinergic Interneurons Mediate Cue-Induced Nicotine Seeking and Associated Glutamatergic Plasticity // eneuro. 2021. Vol. 8, № 1. P. ENEURO.0276-20.2020.
169. Newman M.B. et al. Anxiolytic effects of mecamylamine in two animal models of anxiety. // Experimental and Clinical Psychopharmacology. 2002. Vol. 10, № 1.
170. Dalley J.W. et al. Time-limited modulation of appetitive Pavlovian memory by D1 and NMDA receptors in the nucleus accumbens // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. Vol. 102, № 17.

171. Kupchik Y.M. et al. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections // Nature Neuroscience. 2015. Vol. 18, № 9.
172. Al-Hasani R. et al. Distinct Subpopulations of Nucleus Accumbens Dynorphin Neurons Drive Aversion and Reward // Neuron. 2015. Vol. 87, № 5.
173. Nishi A. et al. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. Vol. 102, № 4.
174. Britt J.P. et al. Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens // Neuron. 2012. Vol. 76, № 4.
175. Strange B.A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis // Nature Reviews Neuroscience. 2014. Vol. 15, № 10.
176. Legault M., Rompré P.-P., Wise R.A. Chemical Stimulation of the Ventral Hippocampus Elevates Nucleus Accumbens Dopamine by Activating Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area // The Journal of Neuroscience. 2000. Vol. 20, № 4.
177. Culverhouse R.C. et al. Multiple distinct CHRN3-CHRNA6 variants are genetic risk factors for nicotine dependence in African Americans and European Americans // Addiction. 2014. Vol. 109, № 5. P. 814–822.
178. Seckl J.R., Holmes M.C. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology // Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism. 2007. Vol. 3, № 6.