

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### УРОВЕНЬ BDNF, miR-30a-5p И miR-122 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ДИНАМИКЕ СИНДРОМА ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

*Д.И. Перегуд<sup>1\*</sup>, А.И. Корольков<sup>1</sup>, В.Ю. Баронец<sup>1</sup>, А.С. Лобачева<sup>1</sup>,  
М.Л. Аркус<sup>1</sup>, С.А. Игумнов<sup>1</sup>, С.В. Пирожков<sup>2</sup>, Н.Н. Теребилина<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Национальный научный центр наркологии — филиал Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., 3; \* эл. почта: peregud\_d@yahoo.com

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Некоторые микроРНК, мишенью которых является мРНК нейротрофического фактора мозга (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), например, miR-30a-5p, могут быть связаны с феноменом зависимости от алкоголя. Однако динамика данного показателя в ходе синдрома отмены алкоголя (COA) не описана. Целью настоящей работы было определение концентрации BDNF и уровня miR-30a-5p в сыворотке крови лиц с синдромом зависимости от алкоголя в динамике COA, а также сопоставление полученных результатов с клинической картиной COA. Кроме того, исследовали уровень miR-122, связь которой с проявлениями употребления алкоголя известна, но BDNF не является её описанной мишенью. По мере редукции симптоматики COA отмечено достоверное повышение концентрации BDNF в сыворотке крови. Напротив, уровень miR-122, но не miR-30a-5p, снижался. В динамике COA выявлена отрицательная корреляция между уровнем miR-122 (но не miR-30a-5p) и концентрацией BDNF в сыворотке крови. На 8 день абстиненции отмечена обратная корреляция между уровнем miR-122 в сыворотке крови и уровнем депрессивности и личностной тревожности. При проведении множественного регрессионного анализа установлено, что степень выраженности влечения к алкоголю и нарушений когнитивных способностей могут являться предикторами концентрации BDNF в сыворотке крови на 21 день абстиненции. BDNF, в свою очередь, также может предсказывать изменения данных показателей. Таким образом, концентрация BDNF и уровень miR-122 в сыворотке крови взаимосвязаны с некоторыми клиническими проявлениями COA и могут являться звеньями патогенеза, определяющими тяжесть этого синдрома.

**Ключевые слова:** BDNF; miR-30a-5p; miR-122; сыворотка крови; синдром отмены алкоголя

**DOI:** 10.18097/PBMC20226803218

## ВВЕДЕНИЕ

Синдром отмены алкоголя (COA) — состояние, сопровождающееся вегетативными, двигательными и аффективными нарушениями, развивающимися после длительного непрерывного приема алкоголя у лиц с клинически оформленной физической зависимостью от алкоголя. Предполагается, что поиск и валидация биомаркеров течения COA позволит объективно дополнить клинический инструментарий при оценке тяжести состояния и эффективности применяемой терапевтической программы. В немногочисленных работах продемонстрирована перспективность исследования биомаркеров течения COA. Так, Girard и соавт. исследовали панель провоспалительных цитокинов и маркеров повреждения нервной ткани в течение 6 месяцев абстиненции и установили, что сывороточный уровень интерлейкина IL-1β и белка S-100β может выступать в качестве потенциального диагностического критерия течения абстиненции [1]. Соссини и соавт. исследовали ряд показателей, характеризующих окислительный стресс, воспаление, функцию печени и нейрохимические процессы в крови и моче пациентов в течение 4 недель абстиненции, в качестве биомаркеров влечения к алкоголю и клинического состояния [2]. В результате было продемонстрировано, что супероксиддисмутаза SOD1

связана с влечением к алкоголю и может выступать в качестве предиктора рецидива по завершении терапевтической программы [2].

Неконтролируемое хроническое употребление алкоголя и алкогольная зависимость вызывают атрофию ЦНС [3]. Данные, полученные на посмертных образцах лиц с алкогольной зависимостью, свидетельствуют о массивной нейродегенерации в коре больших полушарий, мозжечке и стволе мозга [4, 5]. При этом отмечается, что употребление алкоголя даже в умеренных дозах приводит к выраженной атрофии [6, 7]. Экспериментальные данные, полученные в модельных системах, свидетельствуют, что нейротрофический фактор мозга (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) может играть определяющую роль в нейропластических изменениях при состояниях, связанных с хронической интоксикацией алкоголем. Эти состояния, с одной стороны, могут определять собственно патологическое влечение, а с другой — запускать механизмы морфологических нарушений в ЦНС, приводящих к психоэмоциональным и когнитивным расстройствам [8, 9]. Анализ экспериментальных данных, полученных в клинике, показывает потенциальную значимость BDNF в качестве биомаркера течения и прогноза как собственно алкогольной зависимости, так и COA [10].

Одним из механизмов контроля уровня полипептидов является посттранскрипционная регуляция стабильности мРНК посредством малых некодирующих микроРНК. Оценка уровня в крови некоторых микроРНК позволяет выявлять лица с патологической зависимостью от алкоголя и не имеющих клинически оформленной зависимости [11]. В литературе описан ряд микроРНК, для которых мРНК BDNF является экспериментально подтвержденной мишенью [12]. В отношении механизмов формирования зависимости от алкоголя особое место занимает miR-30a-5p, которая напрямую способна регулировать уровень BDNF. Так, в экспериментах на грызунах, имеющих прерывистый доступ к алкоголю, было продемонстрировано снижение уровня BDNF в медиальной префронтальной коре, что сопровождалось повышением уровня ряда микроРНК, включая miR-30a-5p. При этом локальное повышение miR-30a-5p в медиальной префронтальной коре посредством аденовирусного вектора сопровождается снижением BDNF и повышением предпочтения алкоголя [13]. Концентрация BDNF в сыворотке крови крыс отрицательно коррелировала с потреблением алкоголя в модельной системе. При этом уровень потребления алкоголя коррелирует с уровнем ряда микроРНК, включая miR30a-5p [14]. Более того, было продемонстрировано, что уровень miR30a-5p в сыворотке крови значительно выше у больных с зависимостью от алкоголя по сравнению со здоровыми людьми [15]. В качестве биомаркеров заболеваний, связанных с употреблением алкоголя, могут также представлять интерес микроРНК, для которых BDNF не является мишенью. Так, miR-122 может выступать в роли потенциального биомаркера злоупотребления алкоголем или повреждения печени на фоне хронической интоксикации алкоголем [16]. Тем не менее, до настоящего времени связь микроРНК с СОА и его клиническими проявлениями не описана.

Таким образом, данные литературы позволяют предположить, что уровень в крови микроРНК, связанных или не связанных с BDNF, может служить маркером тяжести СОА, а также сопутствующих аффективных и когнитивных нарушений. Целью настоящей работы было определение концентрации BDNF и относительного уровня miR-30a-5p в сыворотке крови лиц с синдромом зависимости от алкоголя в динамике СОА, а также сопоставление полученных результатов с клинической картиной СОА. Кроме того, мы исследовали уровень miR-122, связь которой с проявлениями употребления алкоголя известна, но BDNF не является её описанной мишенью.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

В ходе исследования была набрана выборка, состоящая из 26 пациентов европеоидной расы, злоупотребляющих алкоголем и проходивших стационарное лечение в клинике Национального научного центра наркологии — филиала Национального

медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского. В исследование были включены пациенты в возрасте до 55 лет с диагнозами согласно МКБ-10: F10.3 (синдром отмены) и F10.2 (синдром зависимости от алкоголя). Пациентов с синдромом зависимости от алкоголя, но без синдрома отмены в исследование не включали. Критериями исключения были: установленное наличие тяжёлых, декомпенсированных или нестабильных соматических заболеваний (любые заболевания или состояния, которые угрожают жизни пациента или ухудшают прогноз для пациента, а также делают невозможным проведение клинического исследования), черепно-мозговая травма, энцефалопатия, беременность, наличие ВИЧ инфекции или вирусных гепатитов, сопутствующие психические заболевания (согласно МКБ-10: шизофрения — F20-F29, расстройства настроения — F30-F39, эпилепсия — G40), психические расстройства и расстройства поведения, связанные с употреблением психоактивных веществ с шифром F10.1, F11.0-F19.0, наличие зависимости от других психоактивных веществ (за исключением никотина и кофеина), а также отсутствие готовности пациента к сотрудничеству. Лечение основного заболевания проводили с первого дня пребывания в клинике в рамках Приказа Минздрава России от 17 мая 2016 года № 302н “Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при синдроме зависимости, вызванном употреблением психоактивных веществ”. Сбор клинко-anamnestических сведений и психометрическое тестирование проведены после купирования острой абстинентной симптоматики, но не ранее 5 дней пребывания в клинике.

### Психометрическое тестирование

Для выявления расстройств, обусловленных употреблением алкоголя, проводили тест Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) [17], а также оценивали объём потребленного перед исследованием алкоголя, измеренный методом Timeline Follow Back (TLFB) [18]. Тяжесть синдрома отмены алкоголя, выраженность влечения, аффективной симптоматики и нарушения когнитивных способностей оценивали во время второго (8,0±0,4 день абстиненции) и третьего обследования (21,0±0,5 день абстиненции). Тяжесть СОА оценивали с помощью шкалы Clinical Institute Withdrawal Assessment-Alcohol, revised scale (CIWA-Ar) [19]. Для оценки выраженности влечения к алкоголю использовали Пенсильванскую шкалу влечения к алкоголю (Penn Alcohol Craving Scale, PACS) [20]. Для оценки выраженности аффективной симптоматики, сопровождающей СОА, использовали шкалу оценки депрессии Бека (Beck's Depression Inventory, BDI), шкалы Спилбергера-Ханина для оценки ситуативной и личностной тревожности (State-Trait Anxiety Inventory, STAI 1 и STAI 2 соответственно) [21] и шкалу оценки ангедонии Снайта-Гамильтона (Snaithe-Hamilton Pleasure Scale, SHAPS) [22]. Монреальскую когнитивную шкалу (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) использовали для оценки

нарушений когнитивных способностей [23]. Повторное психометрическое исследование проводили при тех же условиях и в то же время суток, что и первое.

#### *Подготовка биоматериала*

Динамику концентрации BDNF и относительного уровня miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови оценивали при первом ( $2,6 \pm 0,4$  день, далее — 3 день абстиненции), втором ( $8,0 \pm 0,4$  день, далее — 8 день абстиненции) и третьем обследовании ( $21,0 \pm 0,5$  день, далее — 21 день абстиненции). Забор крови проводили в утренние часы натощак в день проведения психометрических тестов. Сыворотку получали после сбора крови (~5 мл) в пробирки с активатором сгустка VACUETTE® TUBE 9 ml CAT Serum Separator Clot Activator (“Greiner Bio-One GmbH”, Австрия) и последующего центрифугирования при 1500 g и 4°C в течение 15 мин. Время от забора крови до получения сыворотки составляло 2-3 ч. Полученную сыворотку до исследования хранили при -70°C.

#### *Иммуноферментный анализ*

Концентрацию BDNF в сыворотке измеряли в двух технических повторах с помощью коммерческого набора реагентов для проведения ИФА (“EMD Millipore Corp.”, США). Сыворотку 50-кратно разводили буферным раствором 100 mM Tris-HCl, pH 8,1, содержащим 1% Triton X-100, 1% бычий сывороточный альбумин, 137 mM NaCl и коктейль ингибиторов протеаз (“Thermo Fisher Scientific”, США). ИФА проводили с использованием 100 мкл разведённой сыворотки в качестве тестируемого образца согласно рекомендациям производителя с использованием планшетного анализатора Stat Fax 2100 (“Awareness Technology Inc.”, США). Концентрацию BDNF рассчитывали с помощью калибровочной кривой с использованием рекомбинантного BDNF человека с пределом детектирования  $\leq 10$  пг/мл. Воспроизводимость оценивали внутри одного и того же эксперимента (intra-assay), а также от эксперимента к эксперименту (inter-assay). Значения коэффициента вариации не превышали 10%.

#### *Полимеразная цепная реакция*

Тотальную РНК экстрагировали из 200 мкл сыворотки с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Чистоту и концентрацию тотальной РНК оценивали, измеряя оптическую плотность при 260 нм и 280 нм с использованием фотометра NanoDrop Lite (“Thermo Fisher Scientific”). Уровень miR-30a-5p, miR-122 и miR-93 в сыворотке крови определяли с использованием набора реактивов TaqMan™ MicroRNA Assay (“Thermo Fisher Scientific”), который включает индивидуальные таргетные праймеры для обратной транскрипции, а также праймеры и зонды для ПЦР. Обратную транскрипцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 100 нг тотальной РНК с помощью набора реактивов TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”). ПЦР проводили в двух параллельных образцах

при помощи термоциклера CFX96 (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) с использованием мастер-микса с ДНК-полимеразой TaqMan™ Universal Master Mix II (“Thermo Fisher Scientific”) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 20-кратно разведённую кДНК. Количество miR-30a-5p и miR-122 оценивали относительно уровня miR-93 по методу  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Согласно данным литературы, использование уровня miR-93 в качестве микроРНК сравнения при анализе циркуляторного уровня микроРНК у человека валидировано для ряда патологических состояний [24]. В настоящем исследовании уровень miR-93 надёжно детектировался в динамическом диапазоне со значениями порогового цикла  $< 32$  и не различался в динамике СОА, что подтверждает обоснованность выбора miR-93 в качестве микроРНК сравнения.

#### *Статистический анализ*

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 и Prism 8.0. Критерий Шапиро-Уилка использовали для тестирования соответствия распределения значений переменных в исследованных выборках нормальному. Для сравнения количественных значений в двух связанных выборках достоверность различий оценивалась с помощью критерия Вилкоксона. Ранговый дисперсионный анализ Фридмана применяли для оценки достоверности различий между тремя зависимыми выборками. Корреляционный анализ проведён посредством расчёта рангового коэффициента корреляции Спирмана ( $r$ ). Множественную регрессию проводили методом наименьших квадратов, рассчитывая коэффициент детерминации ( $R^2$ ), F-критерий, коэффициент регрессии  $\beta$  и t-критерий. Количественные переменные представлены в виде арифметического среднего  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SE$ ), медианы с указанием нижнего и верхнего квартиля — Med (Q25; Q75) — либо медианы с указанием межквартильного размаха — Med (IQR). Различия считали статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования были 26 пациентов с СОА, прошедших полный курс лечения. Основные клинико-демографические показатели обследованных, а также детали медикаментозной терапии представлены в таблице 1.

Согласно критерию Вилкоксона для связанных выборок в результате проведенных терапевтических мероприятий показатели всех примененных психометрических шкал продемонстрировали позитивную динамику (табл. 2). В частности, величины баллов шкал, характеризующих тяжесть СОА (CIWA-Ar) и выраженность влечения к алкоголю (PACS), на 21 день были значительно выше значений, полученных на 8 день абстиненции. Величины баллов шкал, характеризующих аффективную симптоматику, сопровождающую СОА, выраженность депрессивности (BDI), ситуативной и

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики пациентов

Показатель	Значение
Пол, женский/мужской	10/16
Возраст, годы	42,8±1,4
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	24,9±0,7
Образование, высшее/специальное/среднее	9/15/2
Занятость, работает/безработный	15/11
Курение, да/нет	22/4
AUDIT, баллы	24,2±1,1
Потребление алкоголя, годы	15,7±1,3
TLFB, мл абсолютного алкоголя за последние 3 месяца	7520 (6500; 10800)
Медикаментозное лечение, да/нет	
Ноотропы	
глицин	6/20
гопантеновая кислота	9/15
никотиноил гамма-аминомасляная кислота	14/12
аминофенилмасляная кислота	1/25
пирацетам	26/0
Нейролептики	
тиаприд	1/25
Антидепрессанты	
клопирамин	9/17
Транквилизаторы	
гидроксизин	9/17
тофизопам	18/8
диазепам	26/0
зопиклон	13/13
Антиконвульсанты	
карбамазепин	8/14
Прочие группы препаратов	
мексидол	26/0
метадоксин	2/24
тиоктовая кислота	17/9
капельные вливания (соли, витамины)	26/0

Примечание: количественные данные представлены в виде  $M \pm SE$  или Med (Q25; Q75).

Таблица 2. Динамика тяжести синдрома отмены алкоголя, выраженности влечения, аффективной симптоматики и когнитивных способностей во время абстиненции

Шкала	2	3	Значение $p$ (тест Вилкоксона)
Длительность абстиненции, дни	8,0±0,4	21,0±0,5	—
CIWA-Ar, баллы	7,0 (3,0; 8,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,00003
PACS, баллы	5,0 (1,0; 12,0)	0,00 (0,00; 1,00)	0,00029
BDI, баллы	12,5 (8,0; 20,0)	8,0 (5,0; 11,0)	0,00083
STAI 1, баллы	46,0 (34,0; 53,0)	36,0 (32,0; 43,0)	0,00194
STAI 2, баллы	50,0 (40,0; 54,0)	45,0 (38,0; 52,0)	0,02299
SHAPS, баллы	1,5 (0,0; 3,0)	0,00 (0,00; 1,00)	0,00120
MoCA, баллы	23,5 (21,0; 26,0)	27,00 (26,00; 28,00)	0,00014

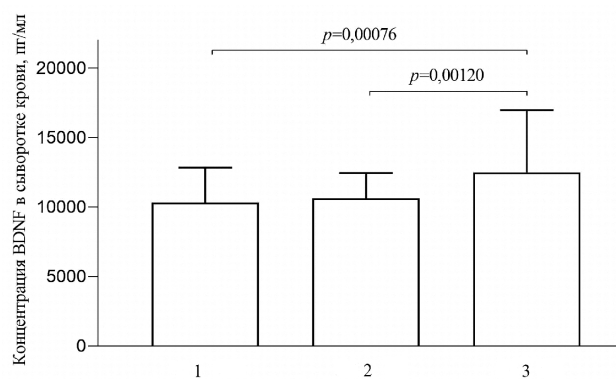
Примечание. 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней (n=26). Данные представлены в виде  $M \pm SE$  или Med (Q25; Q75).

личностной тревоги (STAI 1 и STAI 2 соответственно) а также ангедонии (SHAPS) снижались с течением абстиненции. Как показали результаты проведения тестирования посредством шкалы MoCA, выраженность когнитивных нарушений на 21 день абстиненции были значительно ниже по сравнению с 8 днём.

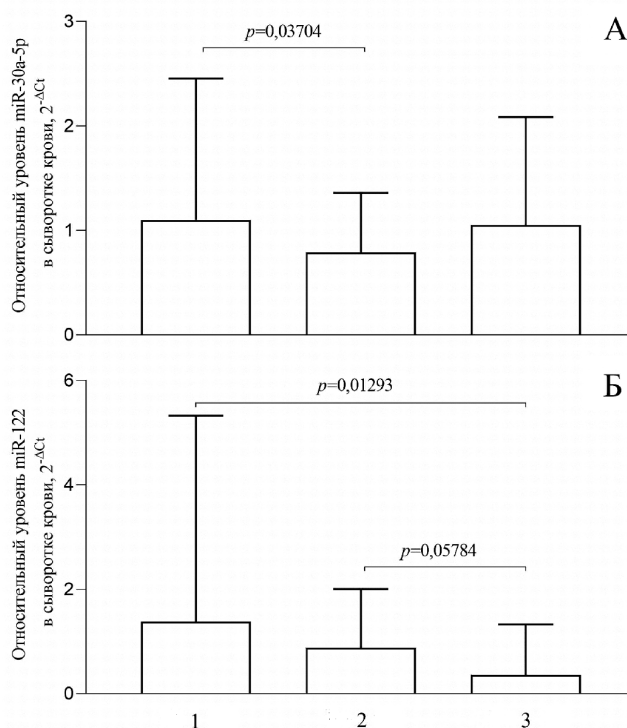
Согласно результатам рангового дисперсионного анализа Фридмана для связанных переменных ( $\chi^2(2, 26) = 10,231$ ;  $p = 0,006$ ) концентрация BDNF в сыворотке крови различалась между тремя временными точками (3, 8 и 21 день абстиненции). Последующий анализ с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок показал, что концентрация BDNF в сыворотке крови значительно повышалась в процессе лечения. Так, значения концентрации BDNF на 21 день абстиненции были значительно выше величин показателей на 8 и 3 день абстиненции (рис. 1). Полученные результаты полностью соответствуют данным литературы, свидетельствующим о том, что уровень BDNF в сыворотке больных с алкогольной зависимостью повышается в процессе терапии [25].

На следующем этапе оценивали относительный уровень miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови в динамике COA. При сравнении относительного уровня miR-30a-5p и miR-122 на разных этапах COA посредством рангового дисперсионного анализа Фридмана для связанных выборок было установлено, что уровень miR-122 ( $\chi^2(2, 26) = 6,083$ ;  $p = 0,048$ ), но не miR-30a-5p ( $\chi^2(2, 26) = 3,920$ ;  $p = 0,141$ ), достоверно изменяется в динамике COA. Попарное сравнение временных точек при помощи критерия Вилкоксона для связанных выборок показало, что уровень miR-122 на 21 день абстиненции снижался по сравнению с 3 днём абстиненции (рис. 2Б). Несмотря на то, что ANOVA Фридмана не показала различий уровня miR-30a-5p в динамике абстиненции, согласно критерию Вилкоксона, уровень miR-30a-5p на 3 день абстиненции снижался относительно 8 дня абстиненции (рис. 2А).

Далее рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмана с целью выявить взаимосвязь уровня miR-30a-5p и miR-122 и концентрации BDNF в сыворотке крови в динамике COA. Было установлено, что уровень miR-122, но не miR-30a-5p, обратно коррелировал с концентрацией BDNF на 3 день абстиненции и 8 день абстиненции, но не 21 день абстиненции (табл. 3). На протяжении всего периода наблюдений выявлена выраженная прямая корреляция между уровнями miR-30a-5p и miR-122 (табл. 3). В доступной литературе нет указаний на то, что мРНК BDNF является экспериментально подтверждённой мишенью для miR-122. Тем не менее, результаты поискового запроса в базе данных miRWalk [<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/human/gene/627/>] свидетельствуют, что согласно биоинформатическим алгоритмам, мРНК BDNF имеет потенциальные комплементарные участки связывания для miR-122. Кроме того, miR-122 может опосредованно регулировать концентрацию BDNF. Так установлено, что miR-122 снижает содержание транскрипционного



**Рисунок 1.** Концентрация BDNF в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя. 1, 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 2,6±0,4 дней, 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней. Значения  $p$  указаны для критерия Вилкоксона для связанных выборок. Данные представлены в виде Med (IQR).



**Рисунок 2.** Относительный уровень miR-30a-5p (А) и miR-122 (Б) в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя. 1, 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 2,6±0,4 дней, 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней. Значения  $p$  указаны для критерия Вилкоксона для связанных выборок. Данные представлены в виде Med (IQR).

фактора CREB (cAMP-response element binding protein), который является хорошо известным фактором транскрипции BDNF [26].

На следующем этапе проводили корреляционный анализ между концентрацией BDNF, относительным уровнем miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови и клиническими проявлениями COA в динамике. Согласно ранговому коэффициенту корреляции Спирмана относительный уровень miR-122

Таблица 3. Корреляции концентрации BDNF и относительного содержания miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя

		BDNF			miR-30a-5p			miR-122	
		1	2	3	1	2	3	1	2
BDNF	2	0,784***							
	3	0,467*	0,520**						
miR-30a-5p	1	-0,039	-0,009	0,165					
	2	-0,248	-0,260	-0,226	0,466*				
	3	-0,042	-0,056	-0,182	0,573**	0,704***			
miR-122	1	-0,425*	-0,326	0,043	0,688***	0,457*	0,419*		
	2	-0,327	-0,398*	-0,324	0,428*	0,665***	0,315	0,501*	
	3	-0,033	-0,001	-0,169	0,268	0,260	0,657***	0,190	0,140

Примечание. 1, 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 2,6±0,4 дней, 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней (n=26); \* – достоверность коэффициента корреляции Спирмана при  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,005$ , \*\*\* –  $p<0,0005$ .

Таблица 4. Значения коэффициентов корреляции между концентрацией BDNF, относительным содержанием miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови, а также тяжестью синдрома отмены алкоголя, выраженностью влечения, аффективной симптоматикой и когнитивными способностями во время абстиненции

Длительность абстиненции	Показатель	CIWA-Ar	PACS	BDI	STAI 1	STAI 2	SHAPS
2	BDNF	0,156	-0,028	0,262	0,060	0,340	0,068
	miR-30a-5p	0,254	0,022	-0,280	-0,167	-0,073	0,130
	miR-122	-0,117	-0,141	-0,453*	-0,440*	-0,245	-0,262
	CIWA-Ar						
	PACS	0,154					
	BDI	0,324	0,485*				
	STAI 1	0,232	0,378	0,643***			
	STAI 2	0,077	0,392*	0,568**	0,363		
	SHAPS	0,519*	0,455*	0,335	0,362	0,340	
	MoCA	-0,416*	-0,225	-0,365	-0,339	0,027	-0,244
3	BDNF	-0,313	-0,068	0,179	0,013	0,143	0,040
	miR-30a-5p	0,263	0,156	-0,147	-0,123	-0,257	0,046
	miR-122	-0,007	0,041	0,011	-0,274	-0,329	0,037
	CIWA-Ar						
	PACS	0,127					
	BDI	0,075	0,218				
	STAI 1	0,240	0,293	0,254			
	STAI 2	0,030	0,413*	0,324	0,275		
	SHAPS	0,218	0,037	0,073	0,339	0,044	
	MoCA	-0,119	0,041	-0,307	-0,425*	-0,188	-0,365

Примечание. 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней (n=26); \* – достоверность коэффициента корреляции Спирмана при  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,005$ , \*\*\* –  $p<0,0005$ .

в сыворотке крови обратно коррелировал с суммой баллов по шкале BDI (депрессивность) и STAI 1 (личностная тревожность) на 8 день абстиненции, но не на 21 день абстиненции (табл. 4). Ни концентрация BDNF, ни относительный уровень miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови не взаимосвязаны с тяжестью синдрома отмены алкоголя, выраженностью влечения, аффективной

симптоматикой и когнитивными способностями во время абстиненции (табл. 4). Ранее было показано, что концентрация BDNF в сыворотке крови обратно коррелировала с выраженностью синдрома отмены по шкале CIWA-Ar [27, 28]. Согласно настоящему исследованию, концентрация BDNF не образует корреляции с выраженностью синдрома отмены по шкале CIWA-Ar. Однако увеличение

## BDNF И miR-122 СВЯЗАНЫ С СИНДРОМОМ ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

концентрации BDNF связано с облегчением абстиненции, что в целом свидетельствует о валидности применённого в настоящем исследовании экспериментального подхода. Корреляционных отношений между концентрацией BDNF в сыворотке крови и аффективными или когнитивными нарушениями, сопровождающими COA, выявлено не было. Полученный результат соответствует данным Joe и соавт., согласно которым концентрация BDNF не коррелирует с уровнем тревожности или депрессивности [29]. Тем не менее, выявлена обратная корреляция между концентрацией BDNF и уровнем личностной тревожности [30] и ангедонии [31]. В отличие от miR-122 для miR-30a описана взаимосвязь с тревожно- и депрессивноподобными состояниями. Так, в экспериментах на грызунах miR-30a вовлечена в реализацию тревожноподобного состояния в результате “социального” стресса [32]. Кроме того, уровень miR-30a повышен у пациентов с депрессией на фоне травмы, перенесённой в детстве, по сравнению со здоровыми людьми. В эксперименте на грызунах введение нейролептика луразидона в раннем онтогенезе предотвращает повышение miR-30a и нормализует экспрессию его мишеней в условиях пренатального стресса [33].

На заключительном этапе посредством проведения множественного регрессионного анализа была последовательно оценена предиктивная способность

исследованных показателей в отношении каждой из переменных в динамике COA. Согласно модели каждую из исследованных переменных последовательно принимали за зависимую, тогда как все остальные переменные за независимые (то есть предикторы). Модель в целом достигала статистической значимости только на 8 день абстиненции, когда в качестве зависимой переменной выступали miR-122 или сумма баллов по шкале BDI (табл. 5). Кроме того, было установлено, что индивидуальные независимые переменные могут предсказать поведение некоторых зависимых переменных. В частности, на 8 день абстиненции выявлена способность miR-30a-5p и miR-122 предсказать поведение друг друга (табл. 5). Кроме того, на 21 день абстиненции концентрация BDNF в сыворотке крови может быть предопределена суммой баллов по шкале PACS и шкале MoCA. В свою очередь, концентрация BDNF также может определять поведение данных шкал (табл. 5). Полученный результат отчасти подтверждает предыдущие данные, полученные на корейской популяции зависимых от алкоголя лиц. Они свидетельствуют о взаимосвязи между нейрокогнитивными способностями пациентов с зависимостью от алкоголя по шкале CERAD и концентрацией BDNF в плазме крови [34]. Следует упомянуть, что, согласно предыдущим работам, четыре фактора, включающие

*Таблица 5.* Множественная регрессия концентрации BDNF, относительного содержания miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови, а также тяжести синдрома отмены алкоголя, выраженности влечения, аффективной симптоматики и когнитивных способностей во время абстиненции

Длительность абстиненции	Зависимая переменная	R <sup>2</sup>	ANOVA F (9, 14); p	Независимая переменная как достоверный предиктор <i>Переменная (β; t; p)</i>
2	BDNF	0,328	0,761; 0,653	-
	miR-30a-5p	0,604	2,374; 0,071	miR-122 (0,282; 2,746; 0,016)
	miR-122	0,679	3,297; 0,023	miR-30a-5p (1,240; 2,746; 0,016)
	CIWA-Ar	0,523	1,706; 0,179	SHAPS (1,005; 2,156; 0,049)
	PACS	0,521	1,691; 0,183	-
	BDI	0,705	3,720; 0,014	STAI 2 (0,339; 2,300; 0,037)
	STAI 1	0,534	1,782; 0,160	-
	STAI 2	0,532	1,767; 0,164	BDI (0,808; 2,300; 0,037)
	SHAPS	0,492	1,508; 0,237	CIWA-Ar (0,248; 2,156; 0,049)
	MoCA	0,420	1,127; 0,406	-
3	BDNF	0,528	1,492; 0,255	PACS (-1231; 2,202; 0,048); MoCA (1309; 2,418; 0,032)
	miR-30a-5p	0,506	1,364; 0,302	-
	miR-122	0,457	1,122; 0,417	-
	CIWA-Ar	0,530	1,501; 0,252	-
	PACS	0,437	1,037; 0,466	BDNF (-2,337×10 <sup>-4</sup> ; 2,202; 0,048)
	BDI	0,389	0,848; 0,590	-
	STAI 1	0,307	0,591; 0,782	-
	STAI 2	0,355	0,735; 0,673	-
	SHAPS	0,608	2,070; 0,120	MoCA (-0,276; 2,411; 0,033)
	MoCA	0,634	2,314; 0,088	BDNF (2,503×10 <sup>-4</sup> ; 2,418; 0,032); SHAPS (-1,181; 2,411; 0,033)

Примечание. 2 и 3 соответствуют длительности абстиненции 8,0±0,4 дней и 21,0±0,5 дней (n=26).

уровень  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, носительство Met аллеля полиморфизма rs6265 в гене BDNF, количество предыдущих детоксикаций и уровень депрессивности [35], а также выраженность СОА согласно шкале CIWA-Ar [27], могут предсказать концентрацию BDNF.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование показало, что в процессе терапии СОА сывороточная концентрация BDNF повышается, тогда как уровень miR-122, напротив, снижается. Кроме того установлено, что на разных этапах СОА уровень miR-122 в сыворотке крови взаимосвязан с уровнем депрессивности и личностной тревожности. При этом концентрация BDNF в сыворотке крови, выраженность влечения к алкоголю и нарушений когнитивных способностей могут являться предикторами друг друга. Предполагается, что при условии дополнительных исследований оценка данных показателей в динамике СОА позволит объективно оценить клиническое состояние больного, предсказать исход терапевтической программы, а также, в случае необходимости, скорректировать терапию в индивидуальном порядке.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме “Изучение патогенетических механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ с использованием генетических, биохимических, иммунологических, нейрофизиологических и нейрокогнитивных подходов” (рег. № 121041300174-8).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования соответствовал Хельсинкской Декларации и был одобрен локальным этическим комитетом (протокол от 06.12.2021 № 36/9). Все пациенты письменно подтвердили информированное согласие на участие в исследовании.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- Girard M., Malauzat D., Nubukpo P. (2019) Serum inflammatory molecules and markers of neuronal damage in alcohol-dependent subjects after withdrawal. *World J. Biol. Psychiatry*, **20**(1), 76-90. DOI: 10.1080/15622975.2017.1349338
- Coccini T., Ottonello M., Spigno P., Malovini A., Fiabane E., Roda E., Signorini C., Pistarini C. (2021) Biomarkers for alcohol abuse/withdrawal and their association with clinical scales and temptation to drink. A prospective pilot study during 4-week residential rehabilitation. *Alcohol*, **94**, 43-56. DOI: 10.1016/j.alcohol.2021.04.004
- Harper C., Kril J. (1985) Brain atrophy in chronic alcoholic patients: A quantitative pathological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **48**(3), 211-217. DOI: 10.1136/jnnp.48.3.211
- Fein G., di Sclafani V., Cardenas V.A., Goldmann H., Tolou-Shams M., Meyerhoff D.J. (2002) Cortical gray matter loss in treatment-naïve alcohol dependent individuals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **26**(4), 558-564.
- Pfefferbaum A., Rosenbloom M., Rohlfing T., Sullivan E.V. (2009) Degradation of association and projection white matter systems in alcoholism detected with quantitative fiber tracking. *Biol. Psychiatry*, **65**(8), 680-690. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.10.039
- Альтшулер В.Б., Серова Л.А., Кравченко С.Л., Корольков А.И., Зарицкая В.А., Ходыкина Л.А. (2013) Атрофические изменения церебральных структур у больных алкоголизмом, различающихся объёмами потребляемого алкоголя. *Вопр. Наркол.*, **6**, 176-191. [Altshuler V.B., Serova L.A., Kravchenko S.L., Korolkov A.I., Zaritskaya V.A., Khodikina L.A. (2013) Atrophic changes of cerebral structures of alcoholic patients who differ by alcohol consumption quantities. *J. Addict. Problems (Vopr. Narkol.)*, **6**, 176-191.]
- Topiwala A., Allan C.L., Valkanova V., Zsoldos E., Filippini N., Sexton C., Mahmood A., Fooks P., Singh-Manoux A., Mackay C.E., Kivimäki M., Ebmeier K.P. (2017) Moderate alcohol consumption as risk factor for adverse brain outcomes and cognitive decline: longitudinal cohort study. *BMJ*, **357**, j2353. DOI: 10.1136/bmj.j2353
- Ron D., Berger A. (2018) Targeting the intracellular signaling “STOP” and “GO” pathways for the treatment of alcohol use disorders. *Psychopharmacology (Berlin)*, **235**(6), 1727-1743. DOI: 10.1007/s00213-018-4882-z
- Liran M., Rahamim N., Ron D., Barak S. (2020) Growth factors and alcohol use disorder. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **10**(12), a039271. DOI:10.1101/cshperspect.a039271
- Kethawath S.M., Jain R., Dhawan A., Sarkar S. (2020) A review of peripheral brain-derived neurotrophic factor levels in alcohol-dependent patients: Current understanding. *Indian J. Psychiatry*, **62**(1), 15-20. DOI: 10.4103/psychiatry.IndianJPsychiatry\_134\_19
- Mach A., Gromadzka G. (2020) MicroRNAs as biomarkers in alcohol use disorder: from diagnostics to therapy. Review of literature. *Alcohol Drug. Addict.*, **33**(4), 313-340. DOI: 10.5114/ain.2020.104815
- Varendi K., Mätlik K., Andressoo J.O. (2015) From microRNA target validation to therapy: Lessons learned from studies on BDNF. *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**(9), 1779-1794. DOI: 10.1007/s00018-015-1836-z
- Darcq E., Warnault V., Phamluong K., Besserer G.M., Liu F., Ron D. (2015) MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. *Mol. Psychiatry*, **20**(10), 1219-1231. DOI: 10.1038/mp.2014.120
- Ehinger Y., Phamluong K., Darevesky D., Welman M., Moffat J.J., Sakhal S.A., Whiteley E.L., Berger A.L., Laguesse S., Farokhnia M., Leggio L., Lordkipanidze M., Ron D. (2021) Differential correlation of serum BDNF and microRNA content in rats with rapid or late onset of heavy alcohol use. *Addict. Biol.*, **26**(2), e12890. DOI: 10.1111/adb.12890
- Ignacio C., Hicks S.D., Burke P., Lewis L., Szombathyne-Meszaros Z., Middleton F.A. (2015) Alterations in serum microRNA in humans with alcohol use disorders impact cell proliferation and cell death pathways and predict structural and functional changes in brain. *BMC Neurosci.*, **16**, 55. DOI: 10.1186/s12868-015-0195-x



16. Torres J.L., Novo-Veleiro I., Manzanedo L., Alvela-Suárez L., Macías R., Laso F.J., Marcos M. (2018) Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, **24**(36), 4104-4118. DOI: 10.3748/wjg.v24.i36.4104
17. Neufeld M., Bunova A., Ferreira-Borges C., Bryun E., Fadeeva E., Gil A., Gormyi B., Khaltourina D., Koshkina E., Nadezhdin A., Tetenova E., Vujnovic M., Vyshinsky K., Yurasova E., Rehm J. (2021) The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) in the Russian language — a systematic review of validation efforts and application challenges. *Subst. Abuse Treat. Prev. Policy*, **16**(1), 76. DOI: 10.1186/s13011-021-00404-8
18. Sobell L.C., Sobell M.B. (1992) Timeline follow-back: A technique for assessing self-reported alcohol consumption. In: *Measuring Alcohol Consumption: Psychosocial and Biological Methods* (Litten R.Z., Allen J.P., eds.). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 41-72.
19. Pittman B., Gueorguieva R., Krupitsky E., Rudenko A.A., Flannery B.A., Krystal J.H. (2007) Multidimensionality of the alcohol withdrawal symptom checklist: A factor analysis of the alcohol withdrawal symptom checklist and CIWA-Ar. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **31**(4), 612-618. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00345.x
20. Flannery B.A., Volpicelli J.R., Pettinati H.M. (1999) Psychometric properties of the Penn alcohol craving scale. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **23**(8), 1289-1295.
21. Иванец Н.Н., Кинкулькина М.А., Авдеева Т.И., Сысоева В.П. (2016) Изучение возможности применения стандартизированных шкал самооценки тревоги и депрессии при обследовании больных пожилого возраста: шкалы-опросники тревоги. *Журн. Неврол. Психиатр им. С.С. Корсакова*, **116**(6), 31-41. [Ivanets N.N., Kinkulkina M.A., Avdeeva T.I., Sysoeva V.P. (2016) The possibility of using standardized self-report anxiety and depression scales in elderly patients: Anxiety scales/questionnaires. *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova*, **116**(6), 31-41.]
22. Махортова И.С., Ширяев О.Ю. (2017) Динамика выраженности аффективных нарушений у больных депрессией с избыточной массой тела и расстройствами пищевого поведения в процессе фармакотерапии. *Журн. Неврол. Психиатр им. С.С. Корсакова*, **117**(11), 64-68. [Makhortova I.S., Shiryayev O.Yu. (2017) A comparative analysis of the dynamics of affective symptoms in overweight patients with depression and eating disorders during treatment process. *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova*, **117**(11), 64-68.]
23. Freud T., Vostrikov A., Dwolatzky T., Punchik B., Press Y. (2020) Validation of the russian version of the MoCA test as a cognitive screening instrument in cognitively asymptomatic older individuals and those with mild cognitive impairment. *Front. Med. (Lausanne)*, **7**, 447. DOI: 10.3389/fmed.2020.00447
24. Donati S., Ciuffi S., Brandi M.L. (2019) Human circulating miRNAs real-time qRT-PCR-based analysis: An overview of endogenous reference genes used for data normalization. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(18), 4353. DOI: 10.3390/ijms20184353
25. Wu S.Y., Chen C.Y., Huang T.L., Tsai M.C. (2020) Brain-derived neurotrophic factor and glutathione peroxidase as state biomarkers in alcohol use disorder patients undergoing detoxification. *Medicine (Baltimore)*, **99**(17), e19938. DOI: 10.1097/MD.00000000000019938
26. Guo L., Yin M., Wang Y. (2018) CREB1, a direct target of miR-122, promotes cell proliferation and invasion in bladder cancer. *Oncol. Lett.*, **16**(3), 3842-3848. DOI: 10.3892/ol.2018.9118
27. Heberlein A., Muschler M., Wilhelm J., Frieling H., Lenz B., Gröschl M., Kornhuber J., Bleich S., Hillemacher T. (2010) BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **34**(6), 1060-1064. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.025
28. Huang M.C., Chen C.H., Chen C.H., Liu S.C., Ho C.J., Shen W.W., Leu S.J. (2008) Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol.*, **43**(3), 241-245. DOI: 10.1093/alcalc/agn172
29. Joe K.H., Kim Y.K., Kim T.S., Roh S.W., Choi S.W., Kim Y.B., Lee H.J., Kim D.J. (2007) Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **31**(11), 1833-1838. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00507.x
30. Portelli J., Farokhnia M., Deschaine S.L., Battista J.T., Lee M.R., Li X., Ron D., Leggio L. (2020) Investigating the link between serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor and behavioral measures in anxious alcohol-dependent individuals. *Alcohol*, **89**, 75-83. DOI: 10.1016/j.alcohol.2020.07.009
31. Levchuk L.A., Meeder E.M.G., Roschina O.V., Loonen A.J.M., Boiko A.S., Michalitskaya E.V., Epimakhova E.V., Losenkov I.S., Simutkin G.G., Bokhan N.A., Schellekens A.F.A., Ivanova S.A. (2020) Exploring brain derived neurotrophic factor and cell adhesion molecules as biomarkers for the transdiagnostic symptom anhedonia in alcohol use disorder and comorbid depression. *Front. Psychiatry*, **11**, 296. DOI: 10.3389/fpsy.2020.00296
32. Miao Z., Zhang J., Li Y., Li X., Song W., Sun Z.S., Wang Y. (2019) Presence of the pregnant partner regulates microRNA-30a and BDNF levels and protects male mice from social defeat-induced abnormal behaviors. *Neuropharmacology*, **159**, 107589. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.032
33. Cattaneo A., Suderman M., Cattaneo N., Mazzelli M., Begni V., Maj C., D'Aprile I., Pariente C.M., Luoni A., Berry A., Wurst K., Hommers L., Domschke K., Cirulli F., Szyf M., Menke A., Riva M.A. (2020) Long-term effects of stress early in life on microRNA-30a and its network: Preventive effects of lurasidone and potential implications for depression vulnerability. *Neurobiol. Stress*, **13**, 100271. DOI: 10.1016/j.ynstr.2020.100271
34. Han C., Bae H., Won S.D., Roh S., Kim D.J. (2015) The relationship between brain-derived neurotrophic factor and cognitive functions in alcohol-dependent patients: A preliminary study. *Ann. Gen. Psychiatry*, **14**, 30. DOI: 10.1186/s12991-015-0065-z
35. Nubukpo P., Ramoz N., Girard M., Malauzat D., Gorwood P. (2017) Determinants of blood brain-derived neurotrophic factor blood levels in patients with alcohol use disorder. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **41**(7), 1280-1287. DOI: 10.1111/acer.13414

Поступила в редакцию: 29. 03. 2022.  
После доработки: 18. 04. 2022.  
Принята к печати: 19. 04. 2022.

**CONTENTS OF BDNF, miR-30a-5p AND miR-122 DURING ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME**

***D.I. Peregud<sup>1\*</sup>, A.I. Korolkov<sup>1</sup>, V.Y. Baronets<sup>1</sup>, A.S. Lobacheva<sup>1</sup>,  
M.L. Arkus<sup>1</sup>, S.A. Igumnov<sup>1</sup>, S.V. Pirozhkov<sup>2</sup>, N.N. Terebilina<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Drug Addiction,  
3 Mal. Mogiltsevsky Ln., Moscow, 119002 Russia; \* e-mail: peregud\_d@yahoo.com

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),  
8 Trubetskaya str., bldg. 2, Moscow, 119991 Russia

Some BDNF (brain-derived neurotrophic factor)-targeted microRNAs such as miR-30a-5p associate with alcohol dependence phenomenon however their relationship with AWS is not described. We aimed to measure serum BDNF concentration and relative content of miR-30a-5p over the course of alcohol abstinence and compare obtained results with clinics of AWS. Additionally, we studied relative serum content of miR-30a-5p, a microRNA which does not target BDNF but relates to alcohol use disorder. Serum BDNF concentration increased over the course of alcohol abstinence, contrary relative content of miR-122 but not miR-30a-5p decreased. Moreover, during AWS miR-122 but miR-30a-5p negatively correlated with serum BDNF concentrations. Relative content of miR-122 negatively correlated with depression and state anxiety levels on 8<sup>th</sup> day of abstinence. According to multiple regressions on 21<sup>st</sup> day of abstinence alcohol craving and cognitive disturbances may be predictors of serum BDNF concentration, and vice versa. Thus, serum BDNF concentration and relative content of miR-122 associate with some aspects of AWS clinics and may dynamically reflect AWS severity.

**Key words:** BDNF; miR-30a-5p; miR-122; serum; alcohol withdrawal syndrome

**Funding.** Study was performed according to the state order “Investigation of pathogenesis of addictions on psychoactive drugs by means of genetic, biochemical, immunological, neurophysiology and neurocognitive approaches” (No. 121041300174-8).

Received: 29.03.2022; revised: 18.04.2022; accepted: 19.04.2022.