

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Немец Всеволод Владимирович

**Изучение дофаминергического компонента стресс индуцированных
поведенческих адаптаций**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научная специальность 1.5.5. Физиология человека и животных

Научные руководители:

кандидат медицинских наук,

Гайнетдинов Рауль Радикович

кандидат медицинских наук,

Будыгин Евгений Александрович

Санкт-Петербург

2024

Оглавление:

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования.....	6
Теоретическая и практическая значимость данной работы	7
Степень разработанности темы исследования.....	8
Научная новизна	10
ЦЕЛЬ	11
ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
Основные научные результаты.....	12
Положения, выносимые на защиту	12
Личный вклад автора.....	13
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
Стресс	15
- История возникновения понятия «стресс».....	15
Стресс и поведенческие типы	19
- М. Фридман и введение понятия «поведенческие типы».....	19
- Линии животных, селектированные по признаку активности стратегии поведения	21
- Современные подходы для моделирования поведенческих типов	22
Нейрохимия стресса	23
- Основные изменения в эндокринной системе при стрессе.....	23
Стресс и депрессия	27
- Депрессия.....	27
- Виды депрессии	29
- Гормональная регуляция депрессии.....	31
- Вклад нейромедиаторных систем в регуляцию депрессии.....	31
- Моделирование депрессивного расстройства на животных	32
Посттравматическое стрессорное расстройство (ПТСР)	33
- История и этиология болезни	33
- Основные клинические проявления ПТСР	35
- Возможные нейрохимические механизмы развития ПТСР.....	35
- Критерии ПТСР	37
Основные животные модели ПТСР и депрессивно-подобного состояния	37
- Электрическое раздражение лап (foot shock)	37
- Подводная травма (underwater trauma).....	37
- Запах/ присутствие хищника	38

- Иммуобилизационный стресс.....	38
- Модель социального стресса и депрессии – «стресс социального поражения».....	39
Мотивационный компонент поведения.....	40
- Нейрохимические корреляты мотивации.....	40
Зависимое поведение.....	42
- Нейрохимические корреляты формирования зависимостей.....	42
- Стресс в механизмах формирования зависимостей.....	45
Метод вольтамметрии для регистрации ДА ответа.....	47
- История метода вольтамметрии.....	47
- Принцип метода вольтамметрии.....	47
- Различные варианты методики FSCV (на срезах, <i>in vivo</i> , свободноподвижные крысы).....	50
- Особенности вольтамметрии по сравнению с методом микродиализа.....	50
- Области применения метода вольтамметрии.....	51
- Использование вольтамметрии при изучении нейрохимических компонентов стрессорной реакции.....	53
Использование трансгенных животных для изучения механизмов стресса.....	54
- Использование TRH2 нокаутов для исследования механизмов алкогольного и стрессорного поведения.....	54
- ДАТ нокауты как модель повышенной гиперактивности и стереотипии.....	56
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	59
- Животные.....	59
Поведенческие методики.....	59
- Тест «открытое поле».....	59
- Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).....	60
- Установка длительной регистрации поведенческой активности крыс «Лаборас».....	61
- Тест предпочтения сладких растворов.....	61
- Тест «алкогольное спаивание».....	62
- Тест Порсолта.....	63
- Тест «предпочтение нового объекта».....	63
- Тест условного рефлекса активного избегания (УРАИ).....	64
- Тест «Конкуренция за воду».....	65
- Тест «отдергивание хвоста» (<i>tail flick</i>).....	66
Биохимические, гистологические и генетические тесты.....	67
- Биохимический анализ сыворотки крови.....	67
- Анализ кортикостерона в плазме крови.....	67
- Иммуногистохимический анализ (ИГХ) ДА рецепторов.....	67

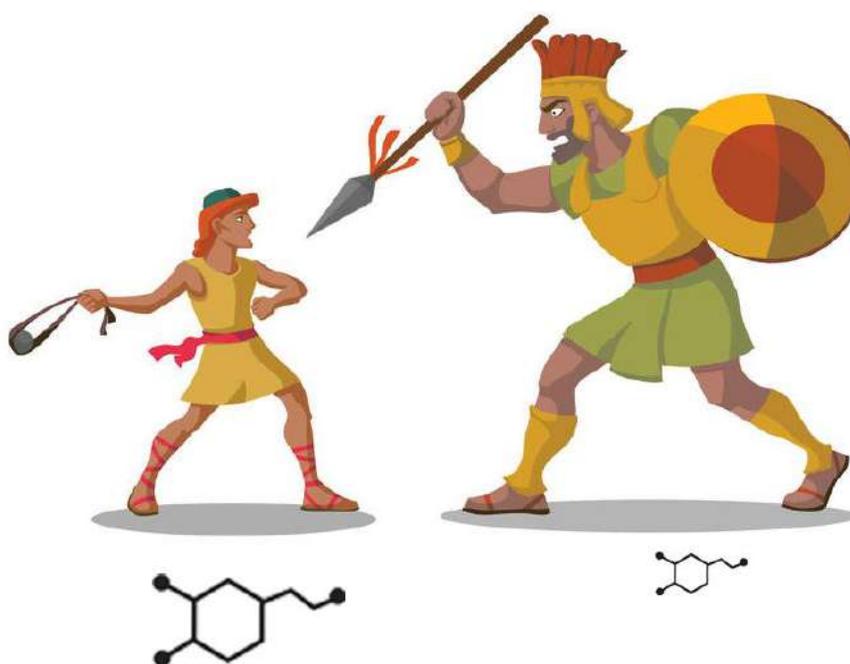
- Методика измерения стадий эстрального цикла крыс.....	69
- Методика генотипирования TRH2 нокаутов	70
Методика высокоскоростной циклической вольтамметрии (FSCV in vivo)	72
- Регистрация ДА ответа у анестезированных животных с помощью метода вольтамметрии.....	72
- Характеристики стимуляций и частотная зависимость сигнала	75
- Использование метода FSCV для изучения процессов истощение/синтеза ДА.....	75
- Использование метода вольтамметрии для изучения функциональности D2 ауторецепторов	76
- Гистологическая верификация позиции регистрирующего микроэлектрода	76
- Оборудование и электроды и для процедуры вольтамметрии	76
- Калибровка электродов in vitro	78
Процедуры стрессорных воздействий	80
- Острый кратковременный стресс	80
- Острый и субхронический иммобилизационный стресс	80
- Стресс повседневности (CMS)	81
- Процедура однократного стресса социального поражения (ССП)	81
- Социальный стресс при остром отравлении органофосфатами (ФОС).....	82
Статистические методы исследования	82
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	83
Глава 1. Исследование дофаминового ответа с помощью метода вольтамметрии	83
Зависимость ДА сигнала от глубины установки электродов в мозге крыс	83
Калибровка регистрирующих электродов (WE) in vitro	87
Зависимость формы ДА сигнала от параметров выброса\обратного захвата ДА.....	87
- ДАТ нокауты как модель стереотипного поведения	87
- Сравнение показателей ДА динамики у мышей и крыс в фоне и под влиянием различных фармакологических веществ с использованием метода вольтамметрии	89
Глава 2. Исследование нейрхимических основ алкогольного и агрессивного поведения.....	93
Исследование алкогольного потребления у крыс Вистар.....	93
Исследование потребление сладких растворов крысами нокаутами по гену TRH2.....	94
Исследование алкогольного потребления у животных нокаутов по гену TRH2 до и после стресса	96
Исследование ДА нейротрансмиссии у крыс TRH2 нокаутов.....	100
Особенности агрессивного поведения у крыс TRH2 нокаутов.....	101
Глава 3. Исследование последствий однократного стресса социального поражения с помощью метода вольтамметрии и поведенческих методик	106
Исследование последствий стресса социального поражения у самцов крыс	106

Влияние последствий ССП у самок крыс на ДА нейротрансмиттерную передачу и поведенческую активность ..	114
Глава 4. Исследование нейрохимических коррелятов стрессорного поведения у животных с различной стратегией поведения при действии хронических и субхронических стрессоров.....	125
Проведение корреляций поведенческих тестов для оптимального отбора крыс с активной и пассивной стратегиями поведения	125
Поведенческие и нейрохимические особенности животных с активной и пассивной стратегией поведения, выявленные до и после действия субхронического иммобилизационного стресса ..	127
Вклад ДА рецепторов в формирование депрессивно-подобного состояния у животных различной стратегии поведения после действия неконтролируемого субхронического иммобилизационного стресса.....	136
- Является ли наблюдаемая в группе АД реакция – посттравматическим стрессом?	137
- Вклад ДА рецепторов в формирование ПТСР у животных различной стратегии поведения после действия неконтролируемого субхронического иммобилизационного стресса	138
- Увеличение ДА нейротрансмиттерной передачи как адаптивный процесс, наблюдаемый вовремя и после травмирующего стрессорного события	138
Эффективность антидепрессанта бупропиона для купирования симптомов, вызванных хроническим неконтролируемым стрессом у животных с различной стратегией поведения	140
Глава 5. Поведенческие последствия эмоционального стресса, вызванного острым отравлением фосфорорганическими соединениями (новая модель ПТСР?).....	143
- В наших исследованиях показано, что даже бесконтактное эмоциональное воздействие может приводить к значительным и длительным изменениям в организме крысы	146
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	148
ВЫВОДЫ	151
Список используемых сокращений	153
Сведения об авторе диссертации	155
Награды и достижения	156
Список собственных публикаций	156
Иные публикации по теме диссертации	157
Список докладов на международных конференциях	157
Благодарности.....	159
Список литературы.....	160
Приложение 1	196
А - Биохимические показатели крыс после действия субхронического иммобилизационного стресса.....	196
В – Анализ к кортикостерона в плазме крови крыс до действия субхронического иммобилизационного стресса	196
С - Соотношение животных различного социального статуса в группах «активных» и «неактивных» животных в популяции крыс.....	197
Д - Соотношение животных различного социального статуса и стратегий поведения	197

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Тема адаптации к различным стрессорным воздействиям актуальна ввиду распространённости депрессивных и тревожных расстройств в современном мире, в котором человек вынужден ежедневно встречаться с неблагоприятными стрессорными воздействиями различного типа и длительности. Для эффективного приспособления к различным неблагоприятным условиям среды, служат так называемые копинг стратегии (стратегии поведения, направленные на непосредственное совладание со стрессорным воздействием). Актуализация определенной стратегии поведения (активной или пассивной) в определенных (стабильных или не стабильных) условиях обеспечивает эффективную адаптацию особи к стрессу, и, в конечном итоге, к выживанию. Таким образом, для эффективного подбора психологических или фармакологических методов борьбы со стрессом необходимо знать нейрохимические и поведенческие индикаторы стресса у людей с различным типом стрессорной реакции. В данной диссертации смоделированы различные типы стрессорных воздействий на животных, отражающих реальные стрессоры у человека (социальный стресс, неконтролируемый физический стресс, травматические психологические воздействия, легкий ежедневный стресс повседневности, стресс-индуцированный алкоголизм) и показаны поведенческие и нейрохимические корреляты стрессорной реакции. Основной упор сделан на изменениях активности дофаминергической нейромедиаторной системы.



Теоретическая и практическая значимость данной работы

Теоретическая значимость данной диссертации заключается в комплексном обосновании нейрохимических и поведенческих коррелятов стрессорных реакций животных с различной (активной и пассивной) стратегией поведения на стрессоры различного типа и длительности. В диссертации так же продемонстрированы поведенческие и нейрохимические последствия стресса социального поражения, показана не только индивидуальная, но и половая чувствительность к действию таких стрессоров. В данной работе затрагиваются не только известные гормональные механизмы регуляции стрессорной реакции, но и более ранние и утонченные нейромедиаторные механизмы. Показан совокупный вклад центральной серотонинергической и мезолимбической дофаминергической систем в агрессивное поведение и стресс-индуцированное алкогольное потребление. Также показано, что не только физическое, но и эмоциональное воздействие может приводить к длительным посттравматическим изменениям. При действии стрессоров происходит изменение в мотивационном поведении, таким образом, в данной диссертации основной упор сделан на вкладе мезолимбической дофаминергической системы в общую картину стрессорной реакции. Впервые показано, что данная система может служить возможным нейрохимическим индикатором адаптационных процессов, происходящих как в краткосрочных, так и в отдаленных сроках после окончания действия стрессора.

Показанные в данной диссертации поведенческие и нейрохимические механизмы адаптации к стрессорам различной природы и длительности могут в будущем стать фундаментом для разработки и подбора эффективных доз новых селективных антидепрессантов, разработанных с учетом половых и индивидуальных особенностей стрессорной реакции. Исследования нейрохимических основ посттравматического стрессорного расстройства и патологического злоупотребления алкоголем, поможет в будущем подобрать эффективную терапию для лечения данных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Тема эффективной адаптации к стрессорам недостаточно разработана до настоящего времени. Существуют работы, показывающие влияние стрессорных воздействий различной природы на дофаминергическую нейротрансмиссию у животных с различной стратегией поведения [1–3], однако данные работы несут либо обобщающий характер (обзоры), либо сфокусированы на отдельных компонентах стрессорной реакции. Таким образом, в данной диссертации отражены результаты серии экспериментов, включающих комплексный отбор животных, выполненный по различным известным методикам, изучение поведенческой активности, биохимический и нейробиохимический скрининг животных до и после стрессорного воздействия с привлечением самых современных методов, включая метод быстрой сканирующей вольтамметрии (FSCV *in vivo*).

В настоящее время достаточно разработанной является тема влияния длительных стрессоров на поведенческие и нейробиохимические показатели у человека и животных. Показаны временные отрезки появления депрессивно-подобного состояния после хронического [4–9] неконтролируемого стресса [10,11], влияние социального контекста на проявление депрессивно-подобного состояния [12], половых особенностей стрессорной реакции [13–15], наличие стрессоров в детском возрасте [16]. Ранее, было продемонстрировано, что во время стресса активируются гормональные системы симпатико-адреналовая (САС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГАС) [17], однако недавние работы показали, что во время и после стрессорного события происходят не только гормональные, но и нейромедиаторные изменения, в особенности происходят изменения в дофаминергической (ДА) нейротрансмиссии, что показано в работах проф. Мичека [5,18–21]. Влияние длительных стрессорных воздействий на ГГАС, ДА системы и поведение животных с различной стратегией поведения так же отражено в данной диссертации.

В диссертации делается акцент на постстрессорных изменениях в мезолимбической ДА системе. Из литературных данных известно, что данная система связана с эмоциональными и мотивационными процессами в мозге во время актуализации различных поведенческих программ [22]. Изменение ДА нейротрансмиссии у человека и животных обнаружено при применении наркотических препаратов и алкоголизме [23–25], так же при депрессии [26,27] и посттравматических расстройствах (ПТСР) [28–31]. Во время стрессорного агрессивного взаимодействия у крыс наблюдаются различные быстрые (активация САС, – увеличение ЧСС, давления, температуры тела и др.) и медленные (активация ГГАС – изменения тревожности, двигательной активности и др.) стрессорные поведенческие и нейроэндокринные реакции [4,32–34]. В работах Анстрома и проф. Будыгина Е.А. с помощью метода вольтамметрии *in vivo* показано, что во время агрессивного взаимодействия у крыс происходит синхронное изменение мезолимбической ДА нейротрансмиссии [19]. В данной диссертации мы

продолжаем эти основополагающие эксперименты и рассматриваем отдаленные эффекты стресса социального поражения на функционирование мезолимбической дофаминергической системы и поведение у животных.

В данной диссертации изучены также связи дофаминергической (ДА) системы с процессами стресса, алкогольного воздействия и агрессии. В работах проф. Будыгина показано, что стресс может провоцировать алкогольное потребление и развитие алкогольной зависимости [35]. В данной диссертации мы продолжили эти исследования на крысах Вистар и на животных нокаутах по гену TRH2, у которых генетически отключена (на 80-100%) центральная СЕР нейротрансмиттерная система. В литературе показано, что такие животные, не только выживают, но и демонстрируют измененный широкий спектр поведенческой активности [36,37]. Помимо стресс-зависимого алкогольного потребления и агрессии у TRH2 нокаутов в диссертации изучена их ДА нейротрансмиттерная система с использованием нового метода вольтамметрии (FSCV *in vivo*). Так как дофаминергическая и серотонинергическая нейромедиаторные системы участвуют в мотивационном поведении у животных [26], то изучение данных характеристик представляется актуальным.

Известно, что существуют различные методики для моделирования посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) у животных [38,39]. В нейрофизиологии ПТСР большую роль играет лимбическая эмоциональная система мозга: миндалина, префронтальная кора, гиппокамп, и др. [40]. Дофаминергическая нейромедиаторная система (ДА) вовлечена в процессы стресса и развития депрессивно-подобных состояний [41]. Однако, вклад ее в развитие ПТСР остается мало изученным. В данной диссертации показано, что не только физические, но и эмоциональные стимулы могут провоцировать к развитию ПТСР с характерными длительными (до 2 месяцев) эмоциональными и когнитивными поведенческими отклонениями.

Научная новизна

В данной диссертации проведен комплексный анализ действия стрессоров различного типа и длительности на крыс с противоположными полом, социальным доминированием и стратегий поведения, а также предложены нейрохимические механизмы наблюдаемых поведенческих изменений. В работе изучено влияние различных видов стрессоров (однократный социальный, субхронический иммобилизационный, хронический умеренный) на соматические биохимические показатели (уровень кортикостерона в плазме крови и др.), на нейрохимические показатели в мозге (оценка функционирования мезолимбической ДА нейротрансмиттера) и поведенческую активность (оценка депрессивно-подобного компонента) у животных разного пола и типа социального и стрессорного поведения (копинг стратегии). Проведен комплексный поведенческий и биохимический анализ пассивных и активных в отношении стресса крыс, как до, так и после стрессорного воздействия. Наряду с комплексным подходом к отбору животных дан развернутый поведенческий, биохимический и нейрохимический анализ наблюдаемых стресс-индуцированных изменений, составлен корреляционный анализ, выдвинуты гипотезы.

В диссертации показана высокая эффективность метода быстрой сканирующей вольтамметрии (FSCV *in vivo*) для исследования мезолимбической дофаминергической (ДА) нейротрансмиттера, дан анализ влияния различных стрессоров на поведение и функционирование дофаминергической (ДА) системы и ее рецепторов. Исследован вклад не только ДА, но и СЕР системы на алкогольное потребление крыс, на мотивационный компонент поведения как алкогольного, так и агрессивного поведения. В работе по исследованию крыс TRH2 нокауты (у которых более, чем на 80% снижена СЕР нейротрансмиттера в мозге), показано, что стресс может провоцировать алкогольное потребление у всех крыс, в особенности у животных TRH2 нокауты.

В заключении, в данной работе предложена новая модель ПТСР, в основе которой лежит бесконтактное психоэмоциональное воздействие на животных, содержащихся в одной клетке с животными подвергнутыми однократному отравлению фосфорорганическими соединениями (ФОС). В результате, полученные психотравмирующие изменения сохраняются у крыс-соседей до 2 месяцев после однократного воздействия на «отравленных» крыс. Данная модель может быть применима для моделирования различных видов сильного эмоционального воздействия.

ЦЕЛЬ

Исследование адаптивных изменений в ответ на различные стрессоры у крыс с активной и пассивной стратегиями поведения.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Осуществить разделение животных по стратегиям поведения (активной и пассивной) и выявить возможные фоновые различия между группами по поведенческим, нейрохимическим и биохимическим параметрам.
2. Исследовать влияние последствий однократного стресса социального поражения (ССП) на поведение и ДА нейротрансмиттеры у самцов крыс.
3. Исследовать половые различия в поведении через 24 ч после ССП.
4. Показать различное влияние ССП на поведенческие и показатели ДА нейротрансмиттеры у самок крыс с активной и пассивной стратегиями поведения.
5. Исследовать воздействие кратковременного (тест неизбежного плавания) стрессорного воздействия на животных с активной и пассивной стратегиями поведения.
6. Исследовать воздействие субхронического иммобилизационного стресса на поведенческие, физиологические, биохимические и нейрохимические показатели у крыс.
7. Исследовать воздействие субхронического иммобилизационного стресса на развитие депрессивно-подобного состояния у животных с активной и пассивной стратегиями поведения.
8. Исследовать воздействие хронического неизбежного стресса на развитие депрессивно-подобного поведения животных с активной и пассивной стратегиями поведения.
9. Выявить влияние антидепрессанта бупропиона на коррекцию поведенческих последствий хронического неизбежного стресса.
10. Показать изменение ДА нейротрансмиттеры и поведения у крыс в процессах, связанных со стрессом, алкогольным потреблением и агрессией с помощью модели TRH2 КО.
11. Валидация новой модели ПТСР с использованием психоэмоционального стрессорного раздражителя.

Основные научные результаты

1. Стресс социального поражения вызывает депрессивно-подобное поведение и активацию мезолимбической ДА нейротрансмиттерной системы и у самцов [41], [387] и самок крыс [15], [388-389], а так же изменение поведения у самок крыс [15] через 24 ч после окончания стрессорного воздействия. Особенно данные изменения выражены у животных с пассивным типом стрессорной реакции [15].
2. Кратковременный и длительный неконтролируемый стресс по-разному влияет на животных с различными социальным рангом и стратегией поведения во время стресса [42-44].
3. Методика УРАИ может использоваться как для изучения динамики обучения лабораторных крыс, так и для выявления активной/пассивной поведенческих стратегий, выявляемых в условиях электрошокового стресса [45].
4. Установлено, что животные с активной стратегией поведения наиболее чувствительны к действию хронического неконтролируемого стресса [46].
5. Показана различная групповая (активная/пассивная стратегии поведения) чувствительность крыс к антидепрессанту бупропиону (блокатор обратного захвата ДА и НА) [47].
6. Мезолимбическая ДА система играют важную роль в процессах формирования алкогольной зависимости и стресс-зависимого алкогольного потребления [35].

Положения, выносимые на защиту

1. Однократный стресс социального поражения (ССП) вызывает значительные изменения в мезолимбической ДА нейротрансмиттерной системе, а также различные поведенческие реакции у самцов и самок крыс через 24 ч после стрессорного воздействия.
2. Субхронический иммобилизационный стресс приводит к депрессивно-подобным изменениям у всех стрессированных животных, что проявлялось в характерных изменениях поведенческой активности и физиологических показателей, а также к увеличению, а затем к дезадаптивному снижению концентрации кортикостерона и плотности дофаминовых рецепторов в коре головного мозга.
3. Возможность эффективно адаптироваться к действию стрессогенных факторов различной природы и длительности зависит от поведенческой стратегии крыс:
 - Животные с активной стратегией поведения показывают низкий уровень адаптации в ответ на действие хронических, но не однократных стрессоров.

- Животные с пассивной стратегией поведения показывают высокий уровень адаптации в ответ на действие хронических, но не однократных стрессоров.
4. Антидепрессант бупропион, регулирующий уровень мезолимбического ДА, эффективно устраняет депрессивно-подобные последствия хронического стресса, однако только у животных с активной стратегией поведения.
 5. У животных TRH2 КО изменения агрессивного и алкогольного поведения по сравнению с WT могут быть обусловлены дисрегуляцией мезолимбической ДА системы.
 6. Хронический психоэмоциональный стресс приводит к развитию выраженного посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) у крыс, которое сохраняется на протяжении не менее 60 дней.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех описанных методологических экспериментальных аспектах работы. Все описанные поведенческие методики выполнены им лично во всех экспериментах. Автор самостоятельно проводил генотипирование крыс, забор образцов мозга, определение стадии эстрального цикла у самок крыс, измерение физиологических показателей, отбор крыс по стратегиям поведения различными методиками, которые он освоил еще в бакалавриате и затем в магистратуре СПбГУ под руководством доц. Виноградовой Е.П. Совместно с Соболевым В. Е., Шмураком В.И. и Гарнюк В.В. автором был произведен иммуногистохимический анализ плотности дофаминовых рецепторов в мозге, гистологическая верификация регистрирующего микроэлектрода, так же общий биохимический анализ и анализ концентрации кортикостерона в плазме крови животных, написана статья. Подбор доз ФОС, как и введение ФОС, осуществлял проф. Гончаров Н.В., однако весь поведенческий мониторинг, как и анализ данных эксперимента осуществлял автор. Под руководством проф. Будыгина Е.А. при непосредственном участии проф. Гайнетдинова Р.Р. автор освоил и затем самостоятельно планировал, и проводил весь спектр вольтамметрических исследований от калибровки электродов до исследования параметров дофаминового ответа у мышей и крыс, автор провел собственные внутрилабораторные методологические исследования в данной области, изложенные в данной диссертации. Автор производил самостоятельную статистическую обработку всех получаемых данных, (разрабатывал протоколы, анализировал данные, строил все графики выступал на конференциях, организовывал экспериментальные исследования, разрабатывал концепции новых экспериментов). Совместно с профессорами Будыгиным Е.А., Гриневичем В.П., Гайнетдиновым Р.Р. и Виноградовой Е.П. автор производил написание

и публикацию статей. Данная диссертация написана самостоятельно, однако бесценные советы к ее улучшению были даны: проф. Будыгиным Е.А, проф. Гайнетдиновым Р.Р. и доц. Виноградовой Е.П.

По материалам диссертации было опубликовано 12 работ: 8 научных статей в журналах, индексирующихся в WoS и/или Scopus, 4 статьи в РИНЦ, 1 методологическая статья - в ВАК, в том числе 3 мини статьи (публикации на международных конференциях ECNP, 2 публикации из которых были удостоены премии ECNP Excellence Award 2020 и 2021, и Travel Award). Данные диссертационных исследований апробированы на 8-ми различных международных научных конференциях в виде устных и постерных докладов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Стресс

- История возникновения понятия «стресс»

Понятие «стресс» было введено канадским ученым Гансом Селье [48] в 1940-х. В своих экспериментах ученый подвергал животных различным физическим воздействиям, таким как: холод, жара, радиация, токсины и др. Селье показал, что у всех животных при разности внешнего воздействия наблюдались одни и те же физиологические изменения в организме, такие как: увеличение надпочечников (отвечающих за выработку стрессорных гормонов), деградация тимуса (иммунная реакция организма), язва желудка. Ученый сделал вывод о том, что существует некая неспецифическая реакция организма на внешние стимулы. Эти изменения, позже, ученый назвал «синдром адаптации». Селье выделял три стадии этого синдрома:

1) стадия тревоги, при которой животное встречается со стимулом в первый раз.

2) стадия адаптации или сопротивления организма новым условиям существования. В этой фазе животное или человек пытается противостоять условиям внешней среды путем выработки соответствующих стрессорных гормонов, повышению иммунитета, изменении в слизистой оболочке желудка. Если организм не справляется со стрессором, то наступает следующая фаза.

3) стадия истощения наступает, если стимулы действуют долгое время. Организм выработал весь свой потенциал и не в силах больше противостоять условиям окружающей среды. Изменения в надпочечниках, тимусе и слизистой носят фатальный характер. Чаще всего эта стадия заканчивается смертью животного [48].

Селье охарактеризовал синдром адаптации как неспецифическую, системную реакцию всего организма, на длительное воздействие стимула. Данные стимулы Селье назвал «стрессоры». А саму реакцию – «стресс». Современное определение стресса звучит так. Стресс – это неспецифическая системная, адаптивная реакция организма на отклонение условий существования от привычных (Жуков 2004).

А) Неспецифичность заключается в том, что не существует никакой связи между природой воздействия и характером реакции организма [48]. Любой фактор внешней среды, воздействующий на организм, вызывает специфическую реакцию, однако, одновременно, он вызывает активацию нескольких функций, направленных на восстановление нормального состояния. То есть, неспецифичность стресса заключается в том, что любые раздражения вызывают одинаковую реакцию организма. Стрессорная реакция не зависит от модальности

стимула. При мышечной работе, жаре, громком звуке, внезапном известии в организме запускается определенный комплекс реакций, приводящий к увеличению частоты сердечных сокращений, учащению дыхания и проч. (Жуков 2004). Также важной особенностью стрессорной реакции является выброс стрессорных гормонов, таких как адреналин [49] и глюкокортикоиды [48]. В данной диссертации показано, что кроме гормональных в организме происходят так же изменения в активности нейромедиаторных [19,41].

В подтверждении концепции неспецифичности Мэсон в 1970-х провел эксперимент, в котором на животных воздействовали тепловым и холодным стрессом, при этом были зафиксированы разные специфические реакции, однако неспецифический компонент, такой как подъем основных стрессорных гормонов, был одинаковый [50]. Данные реакции мы можем наблюдать и у человека (Жуков 2004).

Б) Системность. Стрессор вызывает реакцию во всем организме, и эта его способность обуславливает еще одну особенность стресса – системность. Т.е. при действии стрессора все системы организма оказываются задействованы для борьбы с раздражающим агентом.

Выделяют такие компоненты стрессорного ответа как:

- поведенческий,
- эндокринный,
- физиологический
- иммунный.
- *нейромедиаторный (объект нашего исследования)*

Все изменения при стрессе направлены на экстренное приспособление организма к изменившимся условиям окружающей среды. Стрессорная реакция формировалась в течение многих миллионов лет, когда основными стрессорными стимулами были ситуации, представляющие непосредственную угрозу существования животного (хищники, конкуренты за самку, еду, территорию и др.). Пилоэрекция (поднятие волос на теле), например, создает иллюзию увеличения размеров тела, что служит для отпугивания противника [51]. Также, к физиологическим изменениям можно отнести: расширение бронхов, увеличение частоты и глубины дыхания, увеличение частоты сердечных сокращений и т.д. Все эти реакции обусловлены действием специфических стрессорных гормонов (см.: основные изменения в эндокринной системе при стрессе). Селье в своих экспериментах обнаружил [48] образование язв на слизистой желудка, т.е. нарушение функции пищеварения как следствия нарушения функционирования иммунной системы. Очевидно влияние стресса на подавление пищеварительной активности. В экстренной ситуации, например, во время бега от хищника,

расточительно тратить энергию организма на функции, не направленные на непосредственное спасение жизни, т.е. на сохранение организма в целом. Поэтому при стрессе подавляется пищеварительная функция: тормозится секреторная активности желудочно-кишечного тракта, так же тормозится моторика кишечника. Однако, вследствие частых стрессов, развивается нарушение пищеварительной функции, которые могут переходить и в болезнь [52]. Существуют экспериментальные данные о развитие язвы желудка у крыс под воздействием сильных стрессоров, таких как иммобилизация. [53]. В этих экспериментах показано, что уже после 3-х дней иммобилизации более чем у 20% крыс появляются язвы желудка [54]. У людей после сильного стресса тоже образуются язвы желудка, это было показано в клинике на разных группах пациентов [55]. У пациентов переживших пост-операционный, посттравматический стресс и др. развивалась язва желудка, причем у одних в течение 24 часов после стресса, у других в течение 3-6 дней [56]. Известно, что после длительного голодания человек обязан принимать пищу маленькими порциями. Это обусловлено тем, что вследствие стресса, вызванного голоданием, секреторная и моторные функции желудочно-кишечного тракта – заторможены и большая пищевая нагрузка в этих условиях может вызвать смерть [57].

В экспериментах на животных было показано, что кратковременный стресс вызывает активацию памяти и иммунной функции организма, однако длительные стрессы приводят к подавлению иммунитета, синтеза Т-клеток, и к снижению когнитивных способностей, в случае посттравматического стресса к гибели нейронов гиппокампа [44], так же подавление репродуктивной функции (функции размножения) и процессов роста [58].

Достаточно давно показано, что во время стресса активируются гормональные системы САС (симпато-адреналовая) и ГГАС (гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая) [17], однако недавние работы показали, что во время и после стрессорного события происходят не только гормональные, но и нейромедиаторные изменения [5,18–21]. Показано, что увеличение ДА нейротрансмиссии происходит как во время социального [19] или иммобилизационного стресса [18], кроме того в наших исследованиях было показано, что через 24 ч после стресса социального поражения (ССП) происходит так же увеличение ДА нейротрансмиссии у крыс [41]. В различных работах излагается точка зрения, что данные изменения могут быть показателями увеличения «мотивации к избеганию» у таких крыс, или это показатель адаптационных процессов в организме [18].

В зависимости от стратегии поведения, все животные реагируют на острое стрессорное воздействие активацией определенной (активной или пассивной) стратегией поведения. В англоязычной литературе используется термин «копинг» (coping style). Таким образом, животное

или бежит/дерется (активная стратегия) или затаивается (пассивная стратегия) [44]. Примечательно, что в различной ситуации эффективна либо одна, либо другая стратегия, то есть иногда животному эффективнее прогнать хищника, а иногда и затаиться, если опасность слишком высокая. Во время активации данных стратегий поведения у животных происходит выработка стрессорных гормонов, идет выброс нейромедиаторов в определенных структурах мозга, однако с различным нейрохимическим паттерном [44,59,60].

В) «Адаптивность» - означает, что биологическое значение стресса состоит в сохранении организма как целого. Стрессорная реакция возникла в эволюции, закрепилась и постоянно совершенствуется благодаря тому, что с ее помощью организм животных и человека приспособлялся к изменениям в окружающей среде, то есть адаптировался. Ущерб здоровью наносит не стресс, а неблагоприятные изменения условий существования, избежать которых животному или человеку не удалось к тому времени, когда защитные ресурсы организма оказались исчерпаны. Умеренные по силе стрессы необходимы для развития и существования организма [61]. Если стресс приводит к болезни, это означает, что воздействие явилось слишком длительным или чрезмерно сильным [62].

Происходящие при стрессе изменения поведения всегда начинаются с увеличения тревожности (anxiety) (подробнее в разделе «депрессия и тревожность») или настороженности (vigilance). Животное настораживается, почуяв незнакомый запах или услышав хрустнувшую ветку. Человек внутренне напрягается, оказавшись в непривычной обстановке. Возрастает не только чувствительность зрения, слуха и др., но и усиливается внимание. Идет сбор информации о стрессорном стимуле и те детали, на которые человек раньше не обращал внимания, теперь оказываются задействованы. Собранная информация сопоставляется с хранящимися в памяти сведениями о схожих ситуациях. Если у животного или человека наблюдается нехватка информации о стимуле, или объект представляет потенциальную опасность для него, то тогда высоко тревожное состояние сохраняется и принимается решение, а затем запускается поведенческий ответ, избегания этого стимула [63].

Г) «Новизна». Принципиальным отличием современного определения стресса от определения Селье является указание на то, что для развития стресса необходима новизна изменений в окружающей среде. Отклонение условий существования от привычных – обязательное условие для того, чтобы считать реакцию организма стрессом. Даже сильные воздействия, если они происходят регулярно, не приводят к развитию системной реакции. Только новизна является фактором, необходимым для возникновения стресса. Также, следует заметить, что уровень стресса никогда не бывает нулевым, так как в любой ситуации присутствует элемент

новизны. Таким образом, стимулы, вызывающие активацию организма, должны содержать элемент новизны и непредсказуемости [64]. Однако длительное воздействие неконтролируемого стресса приводит к формированию депрессивно-подобного состояния и других болезней [42].

Стресс и поведенческие типы

Попытки классифицировать популяцию человека производились в истории неоднократно. На это были разные причины, и понять особенности человеческой психики и создать систему более эффективного управления народными массами, так как у разных людей существуют разные потребности и стереотипы поведения [65].

В античный период философ Феофраст в книге «Характеры» [66] описал 30 человеческих характеров, более детально к вопросу о классификации черт человеческого характера подошли Юнг, Айзенк, Леонгард, [67] Фрейд [68] и др.

Карл Юнг в 1921 году выпустил книгу «Психологические типы» в которой выделил два принципиально разных типа личности человека: экстраверты (направленность мотиваций человека во внешний мир) и интроверты (направленность мотиваций человека во внутренний мир воображения и размышлений). Ганс Айзенк заимствовал у Юнга понятие экстраверсии и интроверсии и соотнес этим психологическим типам соответствующие параметры личности [67].

Классификацию психосоматических типов человека составил Эрнст Кречмер и позднее дополнил Уильям Шелдон. В этой классификации описаны три типа телосложения: атлетический, пикнитический, астенический. Каждому из типов телосложения, по данной классификации, соответствует определенный склад психики [69]. Однако достоверность данной теории в настоящее время обсуждается.

- М. Фридман и введение понятия «поведенческие типы»

Значимая научная классификация поведенческих типов была разработана кардиологами М. Фридманом и Р. Розенманом в 1959 г. В клинике ими было обнаружено, что у людей с активным типом реакции на стрессорное воздействие риск заболевания ишемической болезнью сердца выше, чем у людей с пассивным. Люди с активным и пассивным типом реакции на стрессорное воздействие были обозначены как «А» и «В» тип соответственно. Следует заметить, что описанные поведенческие типы являются полярными или «ядерными» типами и большинство людей занимают промежуточное положение между соответствующими типами [70].

Для выявления преимущественной принадлежности к тому или иному поведенческому типу людей используется опросник из 19-25 вопросов после многофакторного анализа которых возможно сделать вывод об возможной принадлежности человека к А или В типу стрессорной реакции. Было показано, что на результаты ответов не оказывает влияние ни пол, ни страна проживания [71,72].

Для людей со стратегией поведения «А» (в англоязычной аббревиатуре TABP - type «A» behavior pattern) [73,74] характерной реакцией на стрессорное воздействие будет борьба с неблагоприятными условиями или попытка убежать от них, избавиться. Однако в неконтролируемой ситуации люди с данной реакцией проявляют растерянность и подавленность. Эта реакция является причиной дисбаланса медиаторных систем в организме (см. гуморальную регуляцию). Для многих людей этого типа характерна стереотипность поведения, такие люди действуют не согласно изменяющимся условиям окружающей среды, а согласно плану. В стрессовой ситуации эта стереотипность или поведенческая ригидность будет проявляться в полной мере. Если в неконтролируемой ситуации есть возможность воспринять данную ситуацию как контролируемую, такие люди будут, не оглядываясь назад, проявлять всю свою волю и упорство чтобы справиться с данной ситуацией [75–79].

Люди с поведенческой стратегией «В» (TBVP - type «B» behavior pattern) при действии стрессорного агента не будут проявлять активных действий, чтобы избавиться от него, а будут стараться дождаться окончания воздействия. В ситуации неконтролируемого воздействия у таких людей не будет наблюдаться сильного негативного изменения в психических процессах, т.е. качественного изменения в медиаторном балансе. В обыденной жизни у таких людей нет определенного единого плана действий, их план действий составляется согласно сложившимся условиям на настоящий момент. Однако, при контролируемой стрессорной ситуации такие люди теряются из-за специфической реакции гуморальной системы (см. следующую главу) и из-за неспособности выбрать нужную подходящую в данной ситуации программу поведения [74,77,80–87].

В 1996 году были проведены эксперименты, которые показывали относительный характер влияния поведенческого типа на поведение матери с новорожденным младенцем. Было показано, что независимо от поведенческого типа более 81 % матерей при общении с новорожденным проявляло поведение типа «А» [88]. Также, некоторые исследователи подчеркивают большой вклад фактора родительского воспитания в формировании стратегии поведения [89].

- Линии животных, селектированные по признаку активности стратегии поведения

В литературе существует много данных о разной скорости выработки активного избегания у грызунов в тесте УРАИ, причем эта скорость варьирует как между животными разных видов (крысами и мышами), так и между животными одного вида и даже одной линии [90–92]. В настоящее время принято считать, что поведение большинства видов животных является результатом проявления генетически заложенных признаков организма, однако большую роль играет и среда, в которой этот организм развивался [93].

У генетиков поведения широко распространены исследования стрессорной реакции генетически селектированных животных, отобранных по поведенческому признаку. В настоящее время получено несколько пар линий, селектированных по противоположной (высокой и низкой) скорости выработки активного избегания (avoidance) в тесте УРАИ. Это: колтушанские линии (Koltushi Low avoidance - KLA и Koltushi High avoidance – KHA), римские линии (RHA, RLA), сиракузские (SHA/Bru, SLA/Bru), австралийские (AHA, ALA), японские (THA) [93]. Остановимся на некоторых из них.

Впервые успешная селекция по разнонаправленной скорости выработки активного избегания была выполнена в Италии [94]. Полученные линии теперь известны как Roman High avoidance – KHA и Roman Low avoidance – RLA. Исходным материалом послужили крысы Вистар. По результатам теста УРАИ после 2-х дней выработки уже в пятом поколении процент реакций избегания составил 73% и 14% для крыс RHA и RLA, соответственно. Латентный период избегания и избавления достоверно ниже у крыс RHA, чем у RLA [94]. У крыс RLA в отличие от крыс RHA присутствует реакция затаивания в установке. Двигательная активность у RHA выше, чем у RLA как в домашней клетке, так и во время межсигнальных интервалов [95]. Высокий уровень стереотипного поведения демонстрируют крысы RHA, а крысы RLA меньше стереотипного движения вперед, в тесте открытого поля демонстрируют большее количество поворотов. Эти данные интерпретируются как больший уровень исследовательской активности у этих крыс. Также крысы RHA часто возвращаются в уже исследованные камеры, что трактуется авторами не как стереотипное поведение, а как худшая по сравнению с крысами RLA краткосрочная память. Потребление алкоголя у крыс RHA выше, чем у крыс RLA [95]. Базальный уровень кортикостерона, одного из главных стрессорных гормонов, выше у RHA, чем у RLA, этим объясняется разная реакция на стрессорное воздействие у животных этих линий [93]. Принимая во внимания поведенческие (исследовательская активность/замирание) и гуморальные (различная активность ГГАС (HPA) системы у животных данных линий) различия, с

определенной долей приближения некоторые авторы поведение линий RHA, как модель «проактивного» типа поведения, а RLA как модель «пассивного» типа поведения [96].

Крысы линий Koltushi Low avoidance - KLA и Koltushi High avoidance – КНА были селектированы в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по высокой (КНА) и низкой (KLA) скорости выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ). У крыс КНА наблюдалась высокая двигательная активность в ответ неизбежное действие электрического тока, у крыс KLA наблюдалась реакция затаивания. Потребление сахарозы при действии избегаемого стресса (удары тока) после 4-х недель стрессирования упало у крыс KLA в отличие от КНА, то есть мы можем говорить, что у крыс KLA развилась ангедония – главный признак депрессивно-подобного состояния [97]. Тревожность у крыс КНА в отличие от KLA в ответ на действие неконтролируемого стресса дезадаптивно, как полагают авторы, снижается (Zhukov 1993). И именно у этих крыс (КНА) происходит, в отличие от KLA, развитие выученной беспомощности. Базальный уровень кортикостерона у крыс линий KLA и КНА одинаков [99]. Таким образом, если крысы не подвергаются стрессу, уровень кортикостерона будет одинаков у крыс с разной способностью к выработке активного избегания. Однако, при стрессе механизм действия ГГАС и САС системы разный у крыс KLA и КНА, что, в свою очередь приводит к реализации разных поведенческих программ (Жуков 1977).

- Современные подходы для моделирования поведенческих типов

Попытку классифицировать людей согласно «активности их нейромедиаторов», таких как дофамин, серотонин, окситоцин и тестостерон предприняла антрополог Хелен Фишер, разделив людей на 4 психосоматотипа с выраженными особенностями характера (дофамин - исследователь, тестостерон – директор, серотонин – строитель, окситоцин и эстрогены – переговорщик) соответствующих функциям нейромедиаторов, однако данная классификация не является научной и носит чисто умозрительный характер, однако идеи, высказанные Хелен Фишер применимы для научного исследования [100].

Несмотря на длительную историю попыток классификации поведенческих типов, в литературе нет окончательной классификации, которая бы раз и навсегда систематизировала бы все поведенческие и нейрохимические знания о поведенческих типах, однако большая работа все же была сделана в данной статье [101], где авторы выделили животных по агрессивности в парадигме социального поражения, далее дали комплексную поведенческую оценку активных и пассивных животных и на основе данных литературы - провели и нейрохимическую оценку и выдвинули гипотезу о различном профиле функционирования отделов (префронтальная кора и VTA-NAc) мезолимбической DA системы у этих животных [101]. По их гипотезе, так как

префронтальная кора (ПФК) отвечает за контроль агрессии и импульсивности, через СЕР и ДА иннервацию. Это доказывают эксперименты об удалении ПФК и повышении агрессии у крыс [102]. Удаление или инактивация ПФК также вызывают эскалацию агрессивности, однако, избирательная активация нейронов м ПФК подавляет агрессивное поведение у мышей [103]. Таким образом, авторы считают, что у агрессивных животных, в отличие от не агрессивных, снижен когнитивный контроль агрессии и уровень СЕР. Авторы говорят, что ПФК играет роль в поведенческой гибкости и когнитивном контроле. Относительно мезолимбического ДА авторы утверждают, что у агрессивных животных, вероятно повышен ДА в НАс, что доказывают работы на RHA и RLA, где показано увеличение ДА у RHA [104] и увеличение агрессивности при онтогенетической стимуляции VTA [105].

В другой важной работе так же показана роль ДА в формировании поведенческого активного и пассивного профайлинга [106]. В данной работе автор выдвигает гипотезу о разном уровне ДА в ПФК и НАС у пассивных и активных животных во время стресса. Основной идеей статьи является когнитивное осмысление стрессорной ситуации как контролируемой (активный копинг) или не контролируемой (пассивный копинг), по гипотезе, выдвинутой С. Кабин, от этого зависит не только поведение, но и уровень ДА в соответствующих лимбических структурах. Обзор нейрoхимии и поведения животных различного поведенческого профиля был сделан и автором [44].

В нашей работе дано экспериментальное подтверждение выдвинутых гипотез, проведен комплексный поведенческий и нейрoхимический анализ пассивных и активных крыс, наряду с комплексным подходом к отбору животных, который не применялся ни в одном исследовании ранее.

Нейрохимия стресса

- Основные изменения в эндокринной системе при стрессе

В настоящее время установлено, что, когда животное подвергается стрессорному воздействию, активируются многие пути в ЦНС и выделяются стрессорные гормоны: кортиколиберин (КРГ), АКТГ, глюкокортикоиды – кортизол (у человека), кортикостерон (у крыс), и адреналин. Глюкокортикоиды и адреналин являются основными стрессорными гормонами.

Секретируемый в гипоталамусе кортиколиберин (КРГ) является первичным стрессорным гормоном, поскольку нейроны, в которых он синтезируется, получают не гуморальный, а нервные сигналы от внегипоталамических структур головного мозга. Будучи первичным звеном

в ГГАС (гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система), КРГ стимулирует синтез и секрецию АКТГ и обеспечивает начальный этап стрессорной реакции – состояние тревоги – Alarm-реакцию. Соответственно, КРГ, вызывая состояние тревоги, усиливает двигательные проявления этого состояния. Кроме того, он увеличивает чувствительность сенсорных систем и подавляет альфа-активность ЭЭГ, типичную для состояния покоя. Считается, что КРГ принадлежит основная роль при формировании мотивации, поскольку именно повышение тревоги (КРГ влияет на активацию норадреналиновых нейронов, особенно у самок крыс [107]), усиление беспокойства заставляет животное или человека формировать программу действия для удовлетворения актуальной потребности [108]. В пользу этого факта говорят исследования на срезах мозга грызунов, которые показали, что КРГ увеличивает ДА ответ в прилежащем ядре [109–111], так как известно, что именно мезолимбическая ДА, посредством КРГ, обеспечивает мотивационный компонент поведения во время стресса [112].

Под влиянием кортиколиберина усиливается синтез и секреция АКТГ (аденокортикотропный гормон) в переднем гипофизе [113]. АКТГ активирует синтез и секрецию глюкокортикоидов в корковом слое надпочечников [114,115]. Кроме того, АКТГ обладает выраженными психотропными эффектами, такими как: усиление внимания, улучшение памяти, обучения [116].

Главная функция глюкокортикоидов, синтезирующихся в корковом слое надпочечников, – усиление сопротивляемости организма при длительном действии стрессора (данный гормон повышает уровень глюкозы в организме и обладает противовоспалительным и противоаллергическим эффектом), также перераспределение адаптивного потенциала организма. Таким образом, глюкокортикоиды отвечают за «адаптацию» организма к стрессу. Однако избыточная концентрация глюкокортикоидов в крови может нанести вред организму. Повышенный уровень глюкокортикоидов может вызвать сердечно-сосудистые, почечные ревматические и психические заболевания. Эта группа болезней получила название болезней адаптации [117].

В последние годы появились экспериментальные доказательства того, что основная функция глюкокортикоидов заключается не только в увеличении резистентности к повреждающему воздействию, а и в торможении других компонентов стрессорного ответа, в частности, в торможении активности стрессорных медиаторных систем ЦНС. Следовательно, глюкокортикоиды участвуют в торможении стрессорного ответа по принципу отрицательной обратной связи [118].

Гормон адреналин, синтезирующийся в мозговом слое надпочечников, входит в состав симпато-адреналовой (активирующей) системы и обладает различными эффектами в организме такими как: увеличение частоты сердечных сокращений, систолического выброса, повышает возбудимость и проводимость сердечной мышцы, расширяет бронхиолы, тормозит пищеварительные функции – и секреторную и двигательную, расширяет зрачок, расслабляет мышцы мочевого пузыря. То есть вторично усиливает чувство тревоги по механизму условного рефлекса, т.е. при увеличении частоты сердечных сокращений происходит стрессорная реакция, даже если изначальный стимул ее вызывающий не был стрессорным [17].

При попадании в кровяное русло адреналина происходит расширение дыхательных путей, усиление сердцебиения за счет повышенного поступления к клеткам кислорода, также адреналин стимулирует образование глюкозы из запасных веществ.

Важной функцией в организме кортизола и адреналина является увеличение содержания глюкозы в крови, также эти гормоны отвечают и за ее распад. Кортизол отвечает за транспорт глюкозы в ЦНС (как и в скелетные мышцы) тормозя ее поступление в периферические ткани [119]. Повышение уровня глюкозы может сигнализировать о наличии стрессорной реакции, компонентами которой являются перечисленные гормоны. Это показал еще Кэнон, регистрируя увеличения содержания глюкозы в моче при стрессорном воздействии [120], и позднее Hall, Gold в 1990г. [121], показав, что после стресса происходит увеличение содержания глюкозы в крови. Соответственно, при стрессе можно мерить не содержание соответствующих гормонов, а уровень глюкозы.

Все основные стрессорные гормоны, к которым принято относить гормоны оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники (ГГАС), непосредственно влияют на поведение, т.е. обладают психотропным эффектом. Прямое влияние на психические процессы гормонов доказано в экспериментах, в которых возможность опосредованного влияния, т.е. путем активации других эндокринных систем, сведена к минимуму – например, при введении гормонов непосредственно в мозг. Однако, на уровне целого организма, выделить изолированный эффект отдельного гормона чрезвычайно сложно, поскольку ГГАС (как и системы других желез, как и вся эндокринная система в целом) интегрирована многочисленными прямыми и обратными связями [122].

Основной психотропной функцией глюкокортикоидов является обеспечение реакции «затаивания». То есть при стрессорной ситуации животное не бежит или дерется, а сидит неподвижно – затаивается [44]. В лаборатории было показано, что при удалении коры надпочечников у животного, которое постоянно находится в движении, исчезает реакция

затаивания – одна из двух основных форм стрессорной реакции. При введении глюкокортикоидов в компенсирующей дозе, реакция затаивания восстанавливается. Поскольку увеличение дозы вводимого гормона не ведет к увеличению времени, которое животное проводит в неподвижности, то можно заключить, что глюкокортикоиды не регулируют, а обеспечивают реакцию затаивания [17].

Также замечено, что при лечении большими дозами глюкокортикоидов у большинства больных отмечается эйфория (беспричинно повышенное настроение), доходящая порой до психоза. Это так называемые «кортизоловые психозы» [17].

В отличие от глюкокортикоидов, которые обеспечивают реакцию «затаивания», адреналин стимулирует активные формы стрессорного поведения. При увеличении дозы введенного гормона время и интенсивность реакции увеличивается.

Через активацию всех физиологических механизмов адреналин стимулирует реакцию на стресс, такую как «борьба или бегство», то есть животное не затаивается, как при введении глюкокортикоидов, а бежит или вступает в борьбу, если стрессорная ситуация является сознательно контролируемой. Если же ситуация сознательно не контролируется животным, то развивается выученная беспомощность, то есть состояние нежелания избавляться от неконтролируемого неприятного стрессорного воздействия [123].

При секреции адреналина происходит усиление частоты сердечных сокращений, это приводит к субъективному чувству тревоги, хотя сам адреналин на чувство тревоги не влияет. Ощущение субъективного чувства беспокойства и тревоги появляется из-за сформировавшегося у человека условного рефлекса, что увеличение частоты сердечных сокращений должно быть вызвано непременно стрессорными стимулами [17].

Помимо гормонального стрессорного ответа, в организме так же запускается процессы, связанные с изменением активности различных нейромедиаторных систем, таких как дофаминергическая (ДА), серотонинергическая (СЕР) и др. В функции данных нейромедиаторов входит обеспечение как моторного и когнитивного, так и мотивационного компонентов стрессорной реакции [30,124], так же активации копинг-зависимых программ поведения в стрессорной ситуации в зависимости от субъективного восприятия ситуации как контролируемой или неконтролируемой [1]. В экспериментах на животных [1] и человеке [30] показано, что уровень ДА в мезолимбических отделах мозга коррелирует с этой субъективной оценкой стресса. Именно субъективная оценка стрессорного раздражителя играет большую роль в возникновении депрессии или других травматических изменений.

Стресс и депрессия

- Депрессия

Депрессия – самый распространенный из, так называемых, больших психозов (два других – шизофрения и эпилепсия) – МКБ-10 и входит в 5-е издание диагностического и статистического руководства психических расстройств (DSM-5) [125]. Представление о депрессии, как о самостоятельной болезни ввел психиатр Эмиль Крепелин. В 1899 г. Он выдвинул концепцию, согласно которой периодически возникающие депрессия и мания являются проявлением одного и того же заболевания. [126]. Крепелин описал триаду симптомов депрессивного состояния:

1. Сниженное настроение,
2. Когнитивные нарушения,
3. Торможение двигательной активности

Иначе говоря, депрессия характеризуется угнетением эмоциональных, когнитивных и моторных функций личности длящимся от 2-х недель, так же проявление других форм поведения, таких как суицидальные наклонности, изменение сна или активности (например, психомоторные нарушения), возбуждение или заторможенность [125]. Для мании, состояния противоположного депрессии, указанная триада инвертируется: жизнерадостное настроение, умственно-речевое и двигательное возбуждение.

Склонность к проявлению данных состояний (мания/депрессия) может наследоваться [127]. Однако, как и любой признак, депрессия возникает под влиянием сочетания генетических и средовых факторов [127]. Основным фактор среды, который влияет на формирование депрессии – стрессоры [128].

Однако не каждый стресс может вызывать депрессивное состояние. Наибольший вред организму животного или человека наносит так называемый неконтролируемый стресс, то есть стресс, при котором животное или человек не может активно или пассивно воздействовать на окружающую среду. То есть когда невозможно предсказать неблагоприятное воздействие, избежать или избавиться от него [46].

Изучение неконтролируемого стресса было начато в работах Селигмана и Овермира [129], которые ввели понятие «выученной беспомощности». Они раздражали электрическим током кожу собак таким образом, что животное не могло ни избежать этого воздействия, ни предсказать – в какой момент будет нанесено раздражение. Также, у истоков теории неконтролируемого стресса стояла сотрудница лаборатории И.П. Павлова, Н.Р. Шенгер-Крестовникова, которая

обучала собаку отличать круг от эллипса, постепенно изменяя форму эллипса так, чтобы он больше всего походил на круг. Правильное решение подкреплялось пищей – не правильное – не подкреплялось. Когда соотношение осей эллипса достигло 8:9, собака стала ошибаться и не смогла научиться различать фигуры даже за три недели, а затем у нее пропала способность отличать даже вытянутый эллипс от круга. Более того, пропали и все другие условные рефлексy, которые были выработаны прежде. Кроме того, собака, ранее спокойно стоявшая в станке, теперь была постоянно в движении и повизгивала [130].

Следует обратить внимание на то, что в результате неконтролируемой ситуации произошли изменения во всех трех сферах личности экспериментального объекта. У собаки развились:

- Когнитивный дефицит – собака утратила ранее выработанные навыки
- Моторные нарушения – собака была постоянно в движении
- Эмоциональные расстройства – собака постоянно повизгивала.

Данный эксперимент ценен тем, что в нем не были использованы авersive стимулы, то есть те, которые животное старается избежать. Собака не испытывала боли, ее не пугали, ей не предъявляли одновременно множество стимулов и т.д. Единственным фактором, травмирующим психику животного, оказалось невозможность установить контроль над ситуацией [131].

В дальнейшем, при исследовании эффектов неконтролируемого воздействия, стали применять удары электрического тока [132]. В эксперименте участвовали два животных. Стимуляция производилась одновременно. Оба испытуемых получали удары электрического тока, одинаковые по частоте, длительности и регулярности. Единственное отличие между ситуациями состояло в том, что один испытуемый мог контролировать ситуацию, а другой – нет. Оказалось, что только у тех животных, которые подверглись неконтролируемому воздействию, развиваются многочисленные расстройства, в отличие от тех, кто испытал такой же стресс, но в контролируемой ситуации. [133].

Подвергнутые неконтролируемому воздействию животные утрачивают способность к приобретению новых навыков, у них хуже выполняют действия, которым научились раньше, у них меняется структура сна [134], ослабляется иммунитет, а на слизистой желудка и кишечника образуются язвы. Самый же драматичный эффект неконтролируемого стресса – формирование выученной беспомощности [135–137].

Выученная беспомощность может появляться по многим причинам. Ее могут вызвать длительные отклонения окружающих условий от привычных. Это мы видим в экспериментах на собаке Н.Р. Шенгер-Крестовниковой. Три недели собака пыталась уловить закономерность появления пищи, прежде чем у нее развилась выученная беспомощность. Иммобилизация, то есть потеря способности самостоятельно двигаться – является сильнейшим стрессом у животных. Крыс помещают в пластмассовые стаканчики, обезьян пристегивают ремнями к креслу и, несмотря на удобную позу и даже на небольшую возможность изменять ее, за несколько часов приводит у животных развиваются все дезадаптивные синдромы в ярко выраженной форме [138–142]. Постоянное социальное давление тоже может привести к развитию выученной беспомощности. Две незнакомые крысы или мыши, встретившись дерутся. Проигравшая поединок особь испытывает стресс, однако, все физиологические и биохимические параметры возвращаются в норму через несколько часов. Если животное постоянно терпит поражения в социальных контактах, то, несмотря на минимальный уровень новизны с каждым новым контактом, у него вырабатывается стойкое сохраняющееся неделями, расстройство функций, характерное для выученной беспомощности [135,143].

- Виды депрессии

Депрессия, как заболевание, у человека может принимать следующие формы. По причине возникновения различают:

- Реактивную депрессию (если причину возможно установить). Данная болезнь является реакцией на сильное внешнее воздействие (потрясения, катастрофы и т.д.) [144]. Есть данные, что у некоторых больных реактивной депрессией после травмирующих воздействий может развиваться медленно прогрессирующая шизофрения с фазами ремиссии и спада [145]. Исследование сна реабилитированных больных после потрясения показало, что при этом виде депрессии был нанесен непоправимый вред психике человека. Во снах больные все чаще возвращались к дню травмы, у них был повышенный уровень насилия и мазохизма и враждебности к окружающему миру. Кроме этого, нарушения затронули структуру сна. [146].
- Эндогенную депрессию (внешнюю причину невозможно установить) [147]. Имеет некую внутреннюю причину. Причиной чаще всего бывает действие хронического стресса [148].

Депрессии могут сопровождаться соматическими расстройствами. Пациенты приходят с жалобами боли в различных частях тела, однако серьезных физиологических нарушений, которые могли бы стать причиной болей, врачу не удается установить. Таким образом, во

врачебной практике удалось выделить: психогенную отдышку, психогенную головную боль и т.д. По данным различных исследователей от трети до половины пациентов, впервые обращающиеся к врачу, нуждаются в коррекции эмоционального состояния [149].

У тяжелых депрессивных расстройств существует две стороны, как показал Крепелин в своих работах [126]. Маниакальная фаза, когда у больного повышенное психоэмоциональное возбуждение, повышенное настроение, речевое возбуждение т.д. сменяется депрессивной фазой, в которой у пациента присутствуют все характерные черты депрессии.

По соотношению этих фаз различают:

- Монополярную депрессию, при которой светлые промежутки сменяются депрессивными эпизодами [150].
 - Биполярную депрессию – при которой светлые промежутки сменяются депрессивными и маниакальными эпизодами (как правило, эта форма болезни протекает тяжело)[151].
- Различают различные степени тяжести болезни. Невроз – состояние, при котором больной является полноценным членом общества, однако находится в эмоционально подавленном состоянии. При психозе больной выключается из социальной жизни и нуждается в госпитализации [152].

Существуют несколько методов лечения депрессии. В клинической и повседневной практике используется метод лишения сна. При котором в течении 14 дней несколько раз в неделю человека лишают ночного сна. В клинике показаны достоверные результаты, в отличие от пациентов не подвергавшихся этой процедуре [153–155]. В основе метода депривации сна лежит изменении синтеза и секреции соматотропина [154].

Также, одним из методов лечения эндогенной депрессии является фототерапия. Из повседневной практики известно, что в солнечную погоду настроение человека улучшается и не наблюдается депрессивных расстройств, в отличие от осеннее-зимнего периода. Именно в этот период врачи рекомендуют фототерапию – воздействие светом спектрально схожим с солнечным. Во врачебной практике были показаны достоверные результаты лечения этим методом [155,156]. Также, эффективным методом лечения легкой депрессии являются физические нагрузки, которые всегда являются некоторым стрессором для организма и приводят к выработке эндорфинов – гормонов удовольствия. При фототерапии происходит снижение концентрации мелатонина и как следствие увеличение содержание гонадолиберина, который обладает антидепрессивным эффектом [157].

- Гормональная регуляция депрессии

С начала 20-го века велись работы по поиску гормона депрессии. У улиток или крыс с выученной беспомощностью брали анализ тканевой жидкости и вводили ее здоровым животным. У здоровых животных развивалась выученная беспомощность. Следовательно, ученые делали вывод, что существует некий гуморальный компонент депрессии [17]. Существовали версии что этот гормон - кортизол, однако анализ похожих болезней, при которых происходит повышенная секреция этого гормона, а именно Иценко-Кушинга, показал неправдоподобность этой версии.

Современные данные показали, что у больных депрессией происходит нарушение обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе (ГГАС). Кроме этого, наблюдается снижение рецепторов к глюкокортикоидам в гипофизе и в головном мозге [17].

Также у больных депрессией наблюдается пониженная выработка АКТГ, гормона роста, гонадолиберина, нарушения в регуляции щитовидной железы, нарушен суточный ритм тиреотропина (поэтому у больных депрессией повышенная температура ночью) и наблюдается повышенное содержание мелатонина [17].

- Вклад нейромедиаторных систем в регуляцию депрессии

Не только гормоны, но и нейромедиаторы вовлечены в процессы формирования депрессивного состояния. Так показано, что при депрессии у больных наблюдается сниженная активность дофаминергической (ДА) и серотонинергической (СЕР) и норадренергической (НА) нейромедиаторной систем [125,158]. У пациентов с депрессией и ангедонией показано значительно более низкий уровень связывания ДАТ по сравнению со здоровыми людьми, высокий уровень D2 ауторецепторов в стриатуме [125]. Эксперименты с использованием животных моделей депрессии (хронический умеренный стресс, выученная беспомощность) так же показали снижение мезолимбического ДА при депрессии [125]. Мезолимбическая ДА система, как показали исследования на животных, является мишенью для депрессии, удаление VTA приводит к депрессивно-подобному состоянию у крыс [159]. Показано также, что у специальной линии крыс (Flinders), генетическая модель депрессии на животных (Overstreet, 1993), наблюдается снижение активности VTA ДА системы [160]. Современное (2023 г.) сравнение более 12-ти мета-анализов не показало, что депрессия формируется НЕ из-за сниженного содержания СЕР в мозге [161], таким образом современные исследования развенчали серотониновую гипотезу депрессии, которая более 50-ти лет являлось основной [162], однако следует учитывать наличие СЕР нарушений у депрессивных больных и воспринимать данный механизм как дополнительный. Но авторы [161,162] не рекомендуют бесконтрольно

использовать СЕР препараты, так как именно они могут, при хроническом применении компенсаторно снижать уровень эндогенного СЕР и тем самым усугублять течение болезни.

Исследователи выдвинули концепцию, что увеличение концентрации основных нейромедиаторов депрессии (ДА/СЕР/НА) снижает симптомы ангедонии [163], кроме того, коррективка психологического состояния больного возможна при помощи комбинированной фармакологической коррекции ДА/СЕР/НА систем в зависимости от типа депрессии [163]. Во время фазы эмоциональной и мотивационной подавленности (потеря позитивного настроения) – следует принимать препараты увеличивающие содержание мезолимбического ДА и НА. Во время негативных эффектов у больного, таких как тревожность, страх, раздражимость, вина – противотревожные препараты, так же препараты повышающие содержание СЕР, в медицинской практике этот метод называется симптом-специфическая антидепрессивная терапия [163].

Так же для лечения депрессии может использоваться ТМС-терапия. Магнитная стимуляция модулирует активность различных областей мозга, активируя или ингибируя их активность. Многие рандомизированные клинические исследования показали, что ежедневная транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС) левой префронтальной коры (активация левой части префронтальной коры связана с положительными эмоциональными стимулами [164]) эффективна при лечении симптомов депрессивного настроения с частотой ремиссии от 30% до 40% случаев. Подобно антидепрессантам, ТМС приводила к устойчивому улучшению симптомов ангедонии, но с меньшим количеством побочных эффектов [165]. Нейробиологические явления, лежащие в основе эффективности ТМС как антидепрессанта, недостаточно изучены, однако данный метод является перспективным для дальнейшего изучения.

- Моделирование депрессивного расстройства на животных

При моделировании депрессивно-подобного состояния на животных, следует учитывать основные критерии депрессии, такие как моторный, эмоциональный и когнитивный дефицит. В остальном данные тесты отчасти повторяют тесты, моделирующие ПТСР (см. главу ниже), однако есть некоторые традиционные модели. Разберем одну из них: хронический умеренный неконтролируемый стресс (Chronic mild stress).

Постоянное, т.е. хроническое, даже слабое, воздействие, может вызвать депрессивное расстройство, если организму не удалось приспособиться к этому воздействию, или избавиться от него. Например, если животное постоянно бьют электрическим током, у него происходит усиленная работа ГГАС системы, постоянная выработка стрессорных гормонов, и как результат, соответствующие депрессивные расстройства [166–168].

Не только сильные или хронические воздействия могут привести к депрессивным расстройствам. Следует заметить, что даже незначительные на первый взгляд воздействия, каждое из которых не может серьезно повредить психологическому состоянию человека, в сумме могут вызвать у человека или животного депрессию в том случае если человек или животное не может активно или пассивно повлиять на ситуацию. Такой стресс принято называть хроническим умеренным неконтролируемым.

Хронический умеренный неконтролируемый стресс считается наиболее адекватной моделью стресса повседневности, который человек испытывает в условиях современного мегаполиса, когда он ежедневно подвергается неблагоприятным воздействиям, но тип этих воздействий и вероятность их возникновения непредсказуемы. В результате у человека формируется депрессия [10,169].

Для моделирования стресса повседневности по Вилнеру [170] крысы или мыши подвергаются различным, ежедневно сменяющимся воздействиям в течение 4-х недель. В результате у таких крыс развивается депрессия которая, однако корректируется с применением различных антидепрессантов [171]. Данная модель будет использоваться и в этой диссертации. К недостаткам модели следует отнести слабую воспроизводимость возможно из-за большой вариабельности экспериментальных протоколов и индивидуальной устойчивости к стрессу у крыс.

Другие виды стрессорного раздражителей, такие как хронический/острый стресс социального поражения и иммобилизационный стресс подробно описаны в следующей главе (ПТСР) и могут применяться как для моделировании депрессивно-подобного поведения, так и при моделировании ПТСР, так как границы между ПТСР и депрессией, по данным литературы [172] размыты и допустимо использование одних и тех же тестов для моделирования обоих этих моделей заболеваний, однако для ПТСР принципиальным фактором будет являться время развития симптомов (1 месяц и далее).

Посттравматическое стрессорное расстройство (ПТСР)

- История и этиология болезни

Термин ПТСР определился в 90-х годах 20-го века, однако клинические проявления были замечены намного раньше. Первые наблюдения характерных симптомов были сделаны в ходе гражданской войны в США, а в России - после первой и второй мировых войн. Все авторы выделяли органические нарушения в центральной нервной системе, которые были вызваны как физическими, так и психологическими факторами [173]. После первой мировой войны причиной

данного «травматического нервоза», как считалось, является «контузия» или плохая дисциплина. Позже удалось отделить физические и психологические проявления травмы. Исследователи того времени, подчеркивали схожесть военного нервоза и истерии, отдавая главенствующую роль в проявлении клинических симптомов эмоциональному фактору, проведя ряд исследований авторы дали такое определение данного синдрома как «тревожное сердце». [174]. Было замечено, что ветераны, с наличием такого синдрома, были не способны к выполнению своих должностных обязанностей, так как демонстрировали повышенную ЧСС при предъявлении громкого стимула. Позже был дан термин «физионевроз», «флэшбэки» и «комплекс эпилептических симптомов» (epileptic symptom complex) [173,174]. Гринкер и Шпигель в 1945 году отмечали у военных, которые пережили т.н. «военный нервоз» проблемы с памятью, агрессию, высокую утомляемость, низкую концентрацию внимания, депрессию, алкоголизм и гиперактивацию симпатической системы. Позднее в 1952 году (DSM-1) и 1968 году (DSM-2) были выпущены рекомендации «диагностическое и статическое руководство психических расстройств» в которых данные симптомы указаны как адаптивная реакция на стрессорное воздействие, однако это заболевание рассматривалось как стрессорная реакция, а не как отдельный синдром. В 1978 году после вьетнамской войны, в которой у участников боевых действий наблюдались те же описанные ранее симптомы [174]. Кормос в (1978) в книге «The nature of combat stress» сгруппировал описанные симптомы и дал им название острых военных реакций. В исследованиях того времени говорилось, что ввиду индивидуальной чувствительности к стрессу от 10-40% ветеранов имели симптомы ПТСР, которые сохранялись до 10 лет после окончания войны, а у некоторых ветеранов (10%) в течение 40 лет, те же данные были получены и у людей переживших афганскую войну [40]. В 80-х годах симптомы ПТСР были описаны и у людей, переживших не только военные действия, но и другие травмирующие события (насилие, крушение поездов, терроризм и т.д.). В 1994 году в обновленном сборнике «диагностическое и статическое руководство психических расстройств» (DSM-IV) всем описанным симптомам было дано название посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР). Только в этой поздней редакции дано четкое разграничение между острой реакцией на травмирующие стимулы (сейчас это называется «острое тревожное расстройство» ОТР), выраженной в увеличение тревожности, паники и др., данная реакция купируется антидепрессантами и пропадает через несколько дней/недель после окончания действия стимула [175] и длительного посттравматического расстройства (ПТСР) выраженного в целом комплексе психических проявлений, которые могут давать о себе знать в течение нескольких месяцев/лет после окончания действия травмирующего агента [40,173,174].

- Основные клинические проявления ПТСР

Еще в 3-м издании DSM-III были отмечены такие проявления как: постоянное повторное переживание травмирующих событий, социальная изоляция, наличие нескольких клинических симптомов (расстройства сна, чувство вины, нарушение в когнитивных процессов и памяти, снижение любых внешних и внутренних (мысли) активностей, которые могут напомнить о травмирующем событии). В 4-м издании было сделано дополнение, что ПТСР может развиваться не только у людей, непосредственно переживших травмирующее событие, но и у тех, кто стал его свидетелем. Так же сделаны дополнения о длительности всех перечисленных симптомов – от 3 месяцев и далее. Травмирующее событие - воздействие исключительных кратковременных или продолжительных психических или физических стрессоров. События ПТСР, включают военные боевые действия, сексуальное или другое насилие с применением насилия, человеческие или стихийные бедствия, а также серьезные несчастные случаи. [173]. Однако, следует еще раз подчеркнуть, что ПТСР развивается лишь у части людей, более вероятно развитие острого тревожного расстройства ОТР или других отдельных травматических проявлений, пропадающих через несколько дней-недель после травмирующего события [175]. В вероятность развития ПТСР вносят вклад: субъективная «сила» (восприятие) стрессора, в не зависимости от реальной длительности или физической травматичности, половые культурные и индивидуальные особенности организма [40,175–177]. Именно индивидуальная чувствительность к травматическим событиям будет показана в данной диссертации, так как на степень восстановления большую роль оказывает осмысление стрессорного событие, так как негативное осмысление приводит к «вторичной травматизации» больного [175].

- Возможные нейрохимические механизмы развития ПТСР

Так в исследованиях того времени на крысах и по современным данным показана длительная активация адренергических нейронов в среднем мозге, коре и гипоталамусе в ответ на психотравмирующее воздействие [40]. Данные результаты объясняются исследователями как эмоционально-вегетативные реакции, вызванные возбуждением лимбических и стволовых структур от коры мозга, вероятно в процессе осознания психотравмирующего воздействия. При исчезновении травмирующего фактора, по истечении некоторого времени, под влиянием компенсаторных реакций центральной нервной системы эти нарушения постепенно нивелируются. Однако, как утверждают исследователи, в зависимости от силы психической травмы, длительности ее действия, индивидуальных особенностей нейрохимических и нейрофизиологических механизмов и предшествующего функционального состояния мозга, возможны и другие исходы реакции на психическую травму [174].

В нейрофизиологии ПТСР большую роль играет лимбическая эмоциональная система мозга: миндалина, префронтальная кора и гиппокамп, и др. [40]. Многие эксперименты на животных [178] и отдельные исследования на больных эпилепсией [179] показывают возникновение субъективного условно-рефлекторного чувства страха (за счет увеличения ЧСС и ЧД) при активации миндалины. Префронтальная кора (ПФК) во время стресса отвечает за осмысление стрессорной информации, причем осмысление стресса как «контролируемого» и «неконтролируемого» ведет к различной активности ПФК/прилежащего ядра мозга [1]. В исследованиях показано, что активация именно данных отделов мозга с определенным паттерном приводит к возникновению ПТСР [40]. Однако, примечательно, что у людей с разным типом стрессорной реакции она может происходить разнонаправлено [40]. ПТСР так же оказывает влияние и на гиппокамп [40]. В экспериментах на животных показано гибель нейронов гиппокампа при хроническом травмирующем воздействии, такая гибель нейронов обусловлена токсичным действием глюкокортикоидов на нейроны гиппокампа [40,180,181]. В исследованиях людей перенесших ПТСР показано снижение объема гиппокампа у людей по сравнению с контролем [182]. В результате у больных ПТСР часто наблюдается потеря памяти о травмирующих событиях, что так же может быть адаптивной реакцией организма [40].

Дофаминергическая нейромедиаторная система (ДА) вовлечена в процессы стресса и развития депрессивно-подобных состояний [41]. Однако, вклад ее в развитие ПТСР остается мало изученным. В исследованиях на людях, перенесших ПТСР [28] и на животных с использованием различных моделей ПТСР [183] показана роль ДА системы в процессе диагностики ПТСР. Так при депрессивном состоянии наблюдается снижение ДА нейротрансмиссии ввиду ингибирования VTA [184], электрическая стимуляция VTA или прилежащего ядра снижает депрессивное состояние [185]. В клинических исследованиях показано увеличение ДА транспортера DAT у пациентов с повышенным содержанием ДА [186,187], однако у пациентов с низким уровнем ДА наблюдается сниженное количество DAT, в то время как состояние ангедонии наблюдается в обеих группах (депрессивных и ПТСР пациентов) [188]. У больных ПТСР так же наблюдается снижение SER транспортера в миндалине, так же рецепторов к глюкокортикоидам и анандамиду [40], что оказывает негативное действие на эмоциональное состояние больных, у которых может наблюдаться гипер/гипо возбуждение в зависимости от активации ПФК/миндалины [40].

При лечении ПТСР основным фактором будет являться социальная поддержка, проведение не связанной с травмой психотерапии и назначение возможных SER антидепрессантов, эффективность которых однако при данном заболевании обсуждается [40,177].

У пациентов с ПТСР, в отличие от депрессивных больных, наблюдается более низкий уровень кортизола, чем у контрольной группы [189], однако в других исследованиях показано увеличение уровня кортизола через 3 дня после ПТСР [190]. Wichmann и коллеги [191] утверждают о том, что высоких кортизол характерен исключительно для депрессивных больных.

Такая неоднозначность имеющихся нейрхимических данных может быть объяснена неоднозначностью поставленного диагноза ПТСР, так как в настоящее время существует трудность в различии диагноза ПТСР от депрессивного расстройства [192]. Для точной постановки диагноза ПТСР необходимо наличие некоторых критериев [193].

- Критерии ПТСР

- Наличие реальной угрозы жизни
- Повторные переживания травмирующих событий
- Избегание травмы
- Изменения в показателях настроения, ангедония
- Когнитивные нарушения, нарушения памяти
- Нарушения процессов возбуждения/торможения ЦНС
- Длительность 1 мес и более

Часть этих критерий можно использовать для при моделировании ПТСР с использование животных моделей. Ниже представлены основные такие тесты [193].

Основные животные модели ПТСР и депрессивно-подобного состояния

- Электрическое раздражение лап (*foot shock*)

Данный тест направлен на моделирование депрессивного состояния и ПТСР. В основе теста лежит электрическая стимуляция разной длительности (2-20 с) и силы тока (1-3 мА). Варьирование силы тока и длительности может создать различные стрессогенные ситуации для грызунов, в которых они могут либо проявлять активную или пассивную реакцию на стресс, либо демонстрировать выученную беспомощность.

- Подводная травма (*underwater trauma*)

Подводная травма или стресс при погружении, включает в себя 1 минуту принудительного плавания, за которым следует 30 секунд принудительного погружения в резервуар с водой. Крысы, подвергшиеся такому воздействию, демонстрируют немедленное и стойкое (7-30 дней после стресса) повышенное возбуждение при акустической реакции испуга и тревожное

поведение в тестах приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) по сравнению с контрольными крысами, которые плавали без погружения [193], так же когнитивный дефицит через три недели после травмы. Таким образом, такое кратковременное воздействие приводит к стойким посттравматическим изменениям у крыс.

- Запах/ присутствие хищника

В основе данного теста лежат экологические взаимоотношения хищник/жертва. В многочисленных экспериментах грызунам показано, что 23% грызунов, подвергшиеся в течение 5-60 мин запаху лисы/взаимоотношению с хищником (кошка, хорек) демонстрируют выраженные ПТСР симптомы (избегание травмы, когнитивные и эмоциональные нарушения), так же у крыс наблюдаются все нейрохимические изменения, характерные для ПТСР. Данные поведенческие и нейрохимические изменения у подверженных ПТСР крыс сохраняются от 1-4 мес. после однократного воздействия травмирующего агента. В зависимости от планируемого типа ПТСР экспериментатор может подобрать силу и тип стрессорного воздействия. В литературе присутствует вариант с комбинацией иммобилизационного стресса и присутствия хищника, для снижения адаптационного потенциала «жертвы», в адаптационный период после стресса возможно дополнительное воздействие хроническим умеренным непредсказуемым стрессом по Вилнеру [169] для моделирования отсутствия социальной поддержки после травмирующего стресса [193].

- Иммобилизационный стресс

В основе данного стрессорного теста лежит воздействие на мотивационную сферу животного, то есть именно неконтролируемость ситуации вызывает депрессивно-подобное состояние и возможно ПТСР. В процессе тестирования (1-4 ч) животное помещается в пластиковый пенал, в котором животное не имеет возможности двигаться, в различных протоколах демонстрируют различный уровень иммобилизации животного. В экспериментах показано, что после однократного стресса крысы демонстрируют депрессивно-подобные и посттравматические (ангедония, социальное избегание) поведенческие и нейрохимические (изменение в плотности шипиков и миндаляне, изменение количества D₂ дофаминовых рецепторов и интенсивности ДА ответа в зоне VTA) [194]. Некоторые нейрохимические изменения наблюдаются даже через 1-10 дней после стрессирования [18,193,195]. К недостаткам данного теста можно отнести невозможность контролировать величину стресса ввиду индивидуальной стрессорной реакции животного. Использование данной модели может привести к гибели грызунов от чрезмерно сильного эмоционального воздействия, другие же

животные могут быть менее восприимчивы к такому стрессору. Индивидуальные особенности восприятия данного неконтролируемого воздействия крысами изложены в данной диссертации.

- Модель социального стресса и депрессии – «стресс социального поражения»

Стресс социального поражения (ССП) используется при моделировании условий социального стресса и депрессии у человека [196], так же при моделировании депрессивно-подобных и посттравматических состояний при применении как острого, так и хронического стресса у животных [38,39]. В основе животных моделей ССП лежит территориальная агрессия самцов крыс [197]. В реализации данного теста на крысах и мышках используется модель «резидент»-«интродер» в которой менее агрессивный интродер (опытное животное) подсаживается к агрессивному «резиденту». В процессе конфронтации эти животные часто демонстрируют агрессивные (атаки, агрессивные стойки, укусы, преследование) и защитные позы (защитные стойки, убежание,), стрессорная активность - замирание, смещенная активность – груминг, копание, исследовательская активность – стойки и обнюхивание пространства и «партнера» [197]. Так же, во время агрессивной конфронтации и у животных-«резидентов» и у «интродеров» наблюдается увеличение ДА ответов в зоне вентральной области покрышки (VTA) [198] и прилежащего ядра [19]. Воздействие однократного ССП оказывает влияние на нейрохимические процессы в синапсе, вызывая процессы нейроадаптации в ДА клетках в зоне VTA [5]. После действия такого стрессора у животных наблюдаются неоднозначные нейрохимические и реже выраженные поведенческие изменения. Чаще исследователи выделяют подверженных и резистентных к действию такого стрессора животных. У «подверженных» животных наблюдаются изменения в уровне кортикостерона через 39 дней после воздействия, однако являются ли эти изменения посттравматическими или депрессивно-подобными – сказать сложно из-за разрозненности научных данных и разной субъективной силы стрессора [172]. В работе, отраженной в данной диссертации показано, что эти адаптационные изменения в ДА нейротрансмиттерной передаче можно наблюдать у крыс-«интродеров» даже через 24 ч после однократного воздействия ССП [41].

Однако, следует учитывать, что у данной экспериментальной работы есть свои ограничения. Как в природе, так и в лабораторной практике только 10-40% самцов резидентов демонстрируют территориальную агрессию [197], ССП на самках практически не проводят из-за очень низкой их агрессивности. В данной диссертации в некоторых опытах в качестве «резидентов» используют специальных ТРН 2 нокауты. И самцы и самки, которых демонстрируют повышенные уровни агрессии в тесте ССП.

Существуют и другие модели ПТСР (социальная нестабильность, стресс в раннем возрасте и т. д.), однако следует помнить, что все используемые в лаборатории новые тесты должны соответствовать хотя бы некоторым критериям описанными выше, кроме того, быть воспроизводимы, то есть валидированы.

Мотивационный компонент поведения

Поведенческий акт по П.В. Симонову [199] это движение, которое возникает у организма с целью удовлетворения различных потребностей при внешнем или внутреннем изменении окружающей среды, которое направлено на возвращение параметров среды к исходным значениям (активная стратегия поведения) либо приспособление к новым условиям среды (пассивная стратегия поведения). Предвосхищает этого движение – мотивация, которая заставляет организм совершить это движение путем увеличения тревожности, сбора информации о внешней среде и выработки адекватной программы поведения (активация когнитивных процессов) [17]. Лишь когда организм готов к активному действию – осуществляется само движение и в зависимости от эффективности удовлетворения текущей потребности (положительная или отрицательная эмоция) происходит либо записывание всей этой эффективной цепочки в память, либо осмысление и изменение программы поведения.

Таким образом, мотивация является необходимым рычагом для осуществления текущей потребности как в своих трудах о «доминанте» писал А.А. Ухтомский – главным рычагом, модулирующим активность различных мозговых систем для актуализации ведущей потребности [200]. Актуальность теории Ухтомского, который говорил о господствующем, доминирующем очаге возбуждения в головном мозге доказывают современные представления о функционировании лимбической системы, о действии наркотических веществ (НВ) и о поведении зависимых людей, которое направлено исключительно на поиск и удовлетворение текущей потребности (прием НВ) в ущерб другим основным потребностям (еда, секс, социальное поведение). У мотивационного поведения есть свои нейрохимические корреляты, главным из которых является дофамин (ДА), как основной нейромедиатор «системы вознаграждения» в мозге.

- Нейрохимические корреляты мотивации

Мезолимбическая ДА система принимает участие в мотивационных компонентах поведенческого акта в качестве «вознаграждающего агента».

Электрофизиологические опыты на обезьянах еще в 1990-х показали, что нейроны мезолимбической ДА системы действуют по принципу «предсказания вознаграждения», то есть

существуют группы нейронов, которые активируются еще до получения «награды» - это так называемые «нейроны ожидания» [201,202]. Данный механизм лежит в основе как мотивационного поведения в процессе выработки инструментального условного рефлекса у животных и человека [203], однако тот же механизм может быть задействован и в процессе формирования наркотической и других видов зависимостей.

Для иллюстрации дофаминзависимого механизма инструментального обучения можно привести такой пример. Если животному, приученному получать «награду» (сладкий раствор) за нажатие на педаль затем давать «награду» в неограниченном количестве, то ценность такого «подкрепления» пропадает, и животное с не измененными наркотическими веществами ЦНС, естественно перестает нажимать на педаль вообще (модель «обесценивание выбора»). Такого же результата можно добиться применяя тест «угасания инструментального условного рефлекса (УР)», в котором инструментальное действие (нажатие на педаль) не приводило бы к положительному подкреплению вообще [204]. Таким образом ДА звено необходимо для формирования УР. Примечательно, что животные, хронически употреблявшие агонист D_{1,2} рецепторов продолжали нажимать на педаль, даже не получая за это «награду» [204].

Показано, что ДА нейроны кодируют весь спектр мотивационной информации в мозге, однако не без помощи других нейромедиаторных систем. Один тип ДА нейронов отвечает за мотивационную ценность стимула, активируясь при «желаемых» стимулах, ингибируясь при аверсивных; другой – активируется на оба эти стимула, третий – активируется при сигналах опасности [203]. Однако, не только ДА, но и связанная с ними ГАМК система вовлечена в процессы обработки мотивационной информации в лимбических отделах мозга, именно эти нейроны активируются в вентральной области покрышки (VTA) в процессе «ожидания» подкрепления. В результате, полученный нейрональный ответ выражен в большей степени в процессе ожидания награды, в меньшей степени во время получения самой награды, только если это не «неожиданная положительно эмоционально окрашенная награда», на которую ДА нейроны так же активно реагируют [202].

В экспериментах на животных и исследованиях на людях показано, что не только ДА, но и СЕР система участвует в мотивационных процессах при получении как положительного, так и отрицательного подкрепления, показано, что именно совместное действие обеих систем обеспечивает мотивационную ценность «подкрепления» [124]. Однако, роль СЕР нейронов в механизмах мотивационного обучения на стадии исследований. Тем не менее, некоторые разрозненные данные могут дать возможность выдвинуть некоторые гипотезы. По одним данным СЕР играют роль в поведенческом ингибировании ДА ответа посредством действия СЕР

на пФК, эту гипотезу доказывают эксперименты с тормозным действием селективных ингибиторов обратного захвата серотонина [158], так как множественные эксперименты на животных и исследования на человеке, показывающие, что низкий СЕР вызывает высокую импульсивность в принятии решений. В исследованиях на животных было показано, что активация ДА ответа, (за счет действия Д2 антагониста) и торможение СЕР нейротрансмиттера (5-НТ_{1А} агонист) приводит к повышенной импульсивности у крыс и большому количеству рискованных ответов [205]. Более поздние работы выявили роль таких отделов как миндалина, орбитофронтальная и вентромедиальная префронтальная кора [206]. По другим гипотезам, СЕР играет роль в формировании терпения к «отсроченному подкреплению» [124]. Как показали субъективные оценки людей, мгновенное увеличение уровня ДА или СЕР не ощущается как приятное, однако, совместное увеличение ДА+СЕР воспринимается как «очень приятное» [124], исследования на животных-нокауты так же показало необходимость участия ДА+СЕР систем для формирования наркотической зависимости [207]. Таким образом, только совместное действие СЕР и ДА нейромедиаторных систем обеспечивает формирование УР при мотивационном инструментальном обучении.

Зависимое поведение

- Нейрохимические корреляты формирования зависимостей

Основной мишенью действия НВ при формировании зависимости является ДА система, в которой происходит активация ДА нейронов, причем не только во время приема НВ или другой актуализации потребности, но и между событиями, что было доказано в исследованиях как на животных, так и на человеке [208]. Более того, если НВ принимались с интервалами, то эмоциональный ответ на последующий прием НВ становится намного больше первого, даже при меньшей дозировке НВ. Вероятность передозировки НВ может происходить ввиду данного эффекта, наряду с эффектом толерантности. Этот эффект сенсibilизации (drug sensitization) [209] был доказан исследованиями на животных с использованием вольтамметрии *in vivo*. В экспериментах было показано, что повторное (через 2 ч) введение кокаина вызывало намного больший подъем уровня ДА в прилежащем ядре чем первое [210].

Как было указано ранее, в зависимости от длительности приема НВ у человека развиваются совершенно различные нейрональные ответы (рисунок 1) [211]. Если при однократном приеме НВ у человека наблюдается искусственная активация мезолимбической ДА системы, отвечающей за мотивационное поведение, и наблюдается искусственно вызванное состояние «удовлетворения и радости», то хронический прием НВ вызывает стойкое угнетение мезолимбической ДА системы в результате физиологических процессов адаптации нейронов к

длительному действию НВ [211]. Данная нейрональная адаптация является главной причиной развития синдрома отмены и последующих рецидивов [212]. Несмотря на то, что мишенью различных НВ являются их природные рецепторы, такие как опиоидные, никотиновые, каннабиноидные, все они, так или иначе, активируют мезолимбическую ДА систему [211]. Благодаря этой системе и формируется зависимость. Любая психологическая зависимость проходит следующие стадии: стадия интереса, потребления, привычки и абстиненции и затем зависимости. На животных моделях показано, что кортикальные отделы и гиппокамп отвечают за появления чувства «интереса», VTA ДА система отвечает за чувство удовлетворения в процессе формирования привычки, при употреблении НВ и для продолжения приема НВ несмотря на его аверсивное действие в процессе «запоя» и интоксикации [211].

Серотонинергическая нейромедиаторная система (СЕР) так же, как и ДА система, вовлечена в различные аспекты формирования зависимостей. Во время однократного введения практически всех видов НВ наблюдается увеличение внеклеточного СЕР в районе лимбических структур мозга, однако, как и в случае с ДА, при хроническом введении, наблюдается адаптация СЕР рецепторов, приводящая к снижению СЕР нейротрансмиссии и возникновение синдрома «отмены» разной выраженности и продолжительности [213], депрессии, патологической агрессивности и самоубийствам [214].

Показано, что при низкой активности СЕР системы и люди и животные демонстрируют высокую импульсивность [215]. Высокая импульсивность может быть неблагоприятным фактором при возникновении различных форм зависимостей, так как может спровоцировать человека к первому приему НВ. Однако не только СЕР, но и ДА система вовлечена в контроль импульсивности [216]. Показано, что удаление прилежащего ядра у крыс приводит к увеличению импульсивности [217]. Одной из причин такой высокой импульсивности могло являться снижение активности 5-HT_{2B} рецепторов, контролируемые и СЕР и ДА выброс в области прилежащего ядра [215]. СЕР нейромедиаторная система, наряду с ДА системой также вовлечена в когнитивный контроль импульсивности в процессе формирования зависимости. В исследованиях показано, что префронтальные области коры, наряду с другими лимбическими отделами мозга, действуя согласованно, обеспечивают оптимальный уровень принятия решений [216,218] и СЕР система играет важную роль в поведенческом ингибировании и когнитивном контроле мотиваций [216] (рисунок 1).

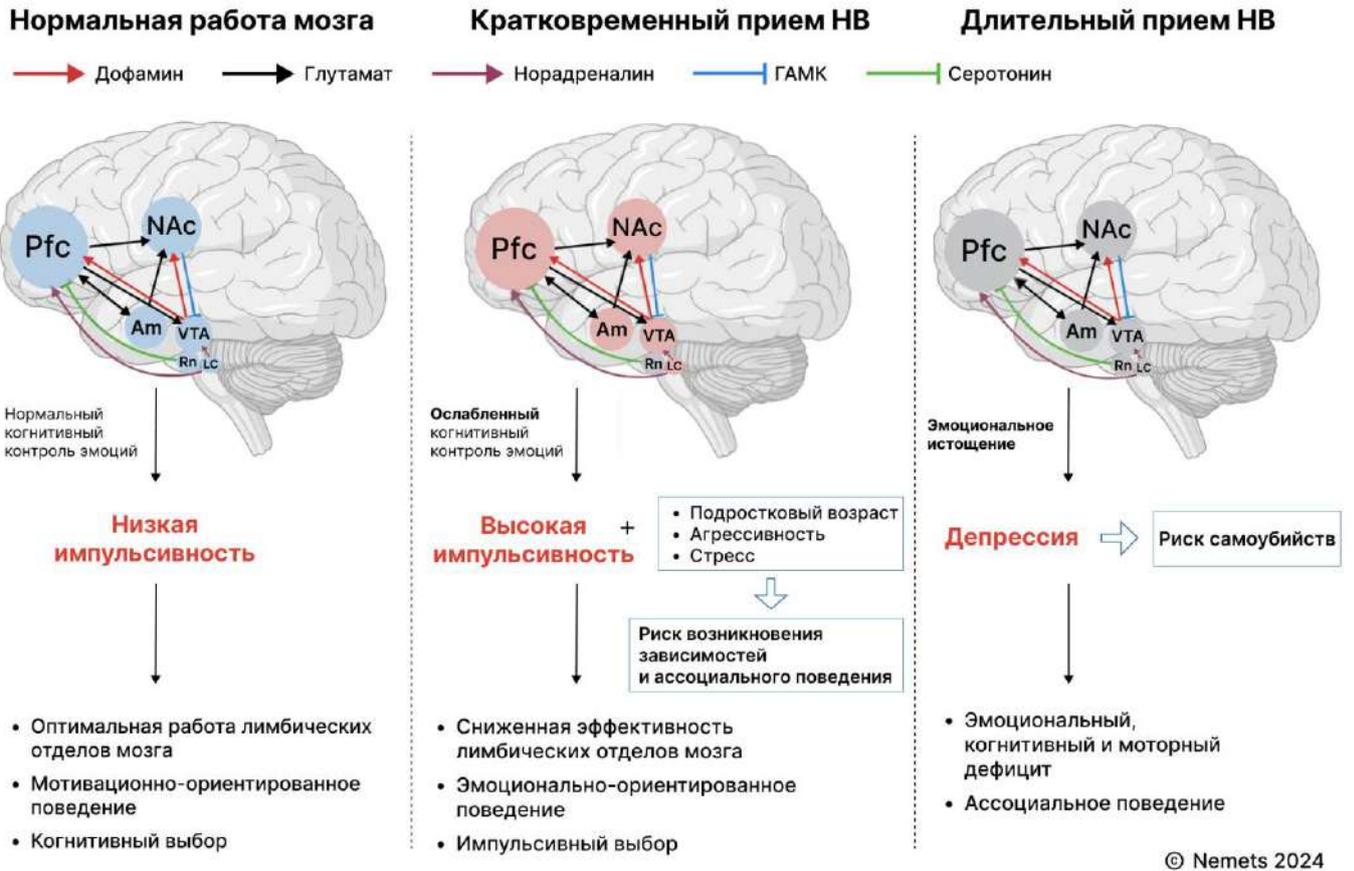


Рисунок 1. Схематичное изображение действия наркотических веществ (НВ) на функционирование различных отделов головного мозга человека. На рисунке изображена схема взаимодействия различных отделов головного мозга человека в норме, при кратковременном приеме НВ и во время длительного приема, так же указаны основные поведенческие проявления и возможные последствия приема НВ. В основе взаимодействия различных участков мозга лежит нейромедиаторная нейротрансдукция, которая оказывает активирующее (ДА, ГЛУ, НА) и тормозное (ГАМК, СЕР) действие на различные участки головного мозга. На рисунке указаны лимбические отделы мозга (Pfc – префронтальная кора, NAc – прилежащее ядро, Am – миндалина, VTA – вентральная область покрышки), так же Rn – ядра шва (источник СЕР), LC – голубое пятно (источник НА).

На рисунке 1 показан мозг человека в нормальном состоянии, при кратковременном и длительном употреблении НВ. В литературе показано, что когнитивный контроль, который осуществляется за счет сбалансированности работы ПФК и базальных ядер мозга, необходим для нормального мотивационно-ориентированного поведения [219]. Кратковременный прием НВ приводит к повышенной активности ГЛУ, ДА систем в лимбических отделах мозга, обеспечивая эмоциональные эффекты от приема НВ, СЕР система с одной стороны отвечает за когнитивный контроль эмоций [219], с другой – за возникновение НВ совместно с мезолимбической ДА

системой [207]. Было показано, что люди с пониженным содержанием СЕР, демонстрируют большую импульсивность, эмоциональный эффект от НВ и вероятность появления зависимости, чем люди с нормальным уровнем СЕР [220]. Стресс может являться дополнительным триггером к приему НВ [35,221]. Длительный прием НВ, как и другое длительное истощающее воздействие на «систему вознаграждения» приводит к угнетению лимбических отделов мозга и как следствие депрессии, которая, наряду с другими неблагоприятными симптомами от синдрома «отмены» может приводить к самоубийствам, особенно среди молодежи [222].

Хотелось бы отдельно остановиться на особенностях формирования зависимостей у подростков. В подростковом возрасте ввиду недоразвитости фронтальных отделов мозга, так же и естественной дисрегуляции СЕР и ДА систем [223], наблюдается снижение когнитивного контроля и увеличение импульсивности во время принятий решений [223,224]. Поведение подростков часто эмоционально-ориентировано [219], кроме того само потребление НВ у подростков вызывает сильные изменения мозговой нейрхимии, еще более сдвигая баланс между основными лимбическими отделами мозга в сторону гиперактивности (рисунок 1). Таким образом, из-за недоразвитости центральной нервной системы в целом, подростки чаще взрослых становятся мишенью действия НВ, различных мошеннических схем, требующих немедленного вознаграждения так же психологических зависимостей, кроме того они и сложнее, чем взрослые, поддаются дальнейшей фармакологической и когнитивно-психологической терапии [225].

- Стресс в механизмах формирования зависимостей

Физиологически ДА система разделена на нигростриарную (двигательный контроль), мезолимбическую (эмоциональный контроль) и мезокортикальную системы (когнитивный контроль). Однако, функции мезолимбической ДА системы не ограничиваются только «положительным подкреплением», по недавним данным, полученным на животных с использованием метода вольтамметрии [19,41] и микродиализа [5], показано, что ДА нейроны активируются так же под влиянием авersive событий и стресса. Именно стресс может запускать различные формы как мотивационного, так и патологического поведения, связанного с употреблением наркотических веществ. Таким образом, стресс наряду с другими факторами (интерес, социальная идентификация внутри группы и т. д.) может спровоцировать первичный прием НВ, а затем способствовать развитию и усугублению зависимости [211,226]. В стресс-зависимый прием НВ могут быть вовлечены стрессорные гормоны [226], нейромедиаторы, в особенности ДА [35,41]. Причиной употребления НВ во время стресса может стать смещенной активностью, то есть субъективная возможность «избавиться» от неблагоприятного стрессорного события путем приема НВ. Кроме стресса НВ могут использоваться для изменения ощущений от

других форм поведения, таких как социальное и сексуальное поведение [213]. Эти патологические формы поведения закрепляется у человека в привычку и перерастают затем в зависимость [17,225].

Механизмом данного состояния, по-другому называемому «bad trip», может послужить влияние стрессорных гормонов, а именно кортиколиберина норадреналина (НА) на полосатое тело и ДА нейротрансмиттер [23,227,228]. В исследованиях на животных показано, что кортиколиберин непосредственно влияет на мезолимбическую ДА систему, модулируя мотивационные процессы во время стрессорной реакции [112].

Таким образом, стресс может влиять и на непосредственный эффект от приема НВ, например, алкоголя и, как было показано в недавних исследованиях на животных, может являться триггером как к самому алкогольному потреблению [35], так и к агрессивным проявлениям, часто наблюдаемым у людей после приема алкоголя. По статистическим данным от 16-50 % мужчин, страдающих алкогольной зависимостью, демонстрируют агрессивное поведение. Среди них, преступников, алкоголиков, совершивших насильственное преступление в 5 раз выше, чем людей, не употреблявших алкоголь [229]. В том числе из-за состояния немотивированной алкогольной агрессии алкоголь обладает высоким рейтингом риска асоциальных действий после его приема [230]. Однако, не только стресс, но и индивидуальные генетические особенности, такие как повышенная импульсивность ввиду мутации в гене СЕР транспортера или возраст (повышенная агрессия у подростков) могут быть причиной немотивированной агрессии после острого или хронического приема алкоголя [229]. Таким образом, низкий уровень СЕР и высокий – стрессорных гормонов может спровоцировать людей на асоциальные действия. Моделирование стресс зависимого алкогольного потребления на TRH2 нокаутах и участие в этом процессе СЕР и ДА систем показано в данной диссертации.

Стресс может сопровождать не только острый прием НВ, но и наблюдаться при хроническом приеме НВ. Во время длительного приема происходит истощение всех нейромедиаторных систем, в особенности системы «вознаграждения», далее у человека развивается апатия, депрессия, сопровождаемая, однако, повышенным уровнем стрессорных гормонов, таких как НА [231]. При низком уровне СЕР, наряду с пониженной активностью всех лимбических структур мозга (рисунок 1), так же возможны суицидальные попытки [214]. Таким образом, при лечении больных с расстройством психики, вызванного хроническим употреблением НВ особое внимание следует уделить купированию симптомов депрессии и затем хотя бы частичному восстановлению сбалансированной работы всех лимбических отделов мозга и нейромедиаторных систем, осуществляющих когнитивный контроль эмоций [216].

Метод вольтамметрии для регистрации ДА ответа

- История метода вольтамметрии

Когда в 1950 году А. Карлссон открыл дофамин (ДА) в качестве нейромедиатора в мозге, появилась необходимость его количественного измерения. Основными направлениями применения таких методов стало изучение нейродегенеративных болезней, связанных с деградацией дофаминергической системы (болезнь Паркинсона, синдром Альцгеймера и др.). Методики того времени позволяли проводить гистологические, электрофизиологические, но не нейрохимические исследования количества и динамики ДА нейротрансмиссии, такие методики были высоко инвазивными (повреждали окружающие ткани) и тем самым слабо информативными.

В 1960-х Кларк и Адамс начали изучать процессы окисления катехоламинов, и пришли к необходимости использования специальных микроэлектродов из углеродного волокна в качестве регистрирующих электродов и в 1970-х смогли успешно зарегистрировать катехоламиновый ответ у анестезированной крысы. Для этого эксперимента исследователи использовали «твердые электроды» из графита, смешанного с маслом, упакованного в тефлон в виде трубки диаметром 0,5 мм. После достижения необходимого уровня, электроды цементировались, далее запись ДА ответа производилась в течение нескольких дней. Таким образом, данные исследования дали начало современному методу вольтамметрии *in vivo* [232].

Позже, Марк Уайтман и команда усовершенствовали регистрирующую и аппаратную часть метода, назвав полученный метод быстрой сканирующей циклической вольтамметрией - Fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) [233]. Регистрирующий электрод, используемый в методике FSCV, выполнен из углеродного волокна, обладающего химической нейтральностью, высокой электропроводностью (практически нулевое электросопротивление) и прочностью. Микроскопические размеры современного углеволокна ($d = 6\mu$, $L = 70-100\mu$) позволяют регистрировать ДА сигнал практически без травмирования окружающих тканей [234,235]. Оборудование быстрой сканирующей вольтамметрии оснащено современными сенсорами и программным обеспечением (HDCV – High Definition Cyclic Voltammetry). Таким образом, современный метод быстрой сканирующей вольтамметрии позволяет производить замеры ДА с миллисекундным временным разрешением, регистрируя различные параметры ДА ответа (выброс, обратный захват) на протяжении всего времени эксперимента (8 часов и более).

- Принцип метода вольтамметрии

Метод быстрой сканирующей вольтамметрии (FSCV) является современным электрохимическим методом нейробиологии. В основе метода лежат процессы

окисления/восстановления веществ на электроде при приложении потенциала определенных электрических параметров. Данный подход позволяет исследовать электрохимические свойства изучаемых веществ, происходящие на карбоновом микроэлектроде. График зависимости тока от применяемого потенциала называется вольтаммограммой (CV – cyclic voltammogram). С помощью CV возможно произвести идентификацию и количественное определение изучаемых веществ (катехоламинов) в пробе или нервной ткани. Форма вольтаммограммы определяет соотношение процессов окисления/восстановления на поверхности рабочего электрода (WE). Положение пиков на вольтаммограмме служит качественным идентификатором катехоламинов и их метаболитов, а амплитуда сигнала указывает на изменение концентрации вещества на поверхности электрода (рисунок 2).

Для разных катехоламинов и их метаболитов применяются различные характеристики подаваемого потенциала (рисунок 3). Для определения ДА раньше применяли потенциал треугольной формы с характеристиками $-0,2 +1,2$ В или от 0 до 1 В скоростью сканирования 150 мВ\с. В такой модификации прибора требовалось до 13 с чтобы зарегистрировать вольтаммограмму [236]. Сейчас с увеличением чувствительности процедуры используют такой же потенциал треугольной формы, но с характеристиками $-0,4 +1,3 -0,4$ В и скоростью сканирования 400 В\с. Однако, с увеличением скорости сканирования – возростали и поверхностные токи, таким образом, зарегистрировать нужные нам фарадеевские токи (получаемые в случае ДА от окисления ДА до ДА ОК и обратно) – стало намного сложнее, однако данную проблему удалось решить с помощью аппаратного удаления данных поверхностных токов, которые могут достигать до 1000 нА (рисунок 12). Такое удаление фоновых токов значительно снизило чувствительность данной методики, таким образом, с помощью нее стало невозможно зарегистрировать базальные значения концентрации нейромедиаторов в мозге, измеряемые в нМ, однако был изобретен подход с помощью которого производилась электрическая стимуляция областей мозга, далеких от области регистрации электрода. Такая стимуляция значительно увеличивала выброс нейромедиатора в синаптическое пространство и давала возможность исследователю зарегистрировать соответствующий ответ нейрона в реальном времени с большой временной и пространственной точностью [232], так же используемые в современной вольтамметрии, стеклянные изолированные микроэлектроды из углеродного волокна диаметром 6-10μ позволяют (в отличие от микродиализа) наименее инвазивно регистрировать ДА ответ в мозге, кроме того, как было сказано ранее, углеводородные микроэлектроды обладают малой химической поверхностной активностью (в отличие от металлических) и более подходят для длительных электрохимических экспериментов.

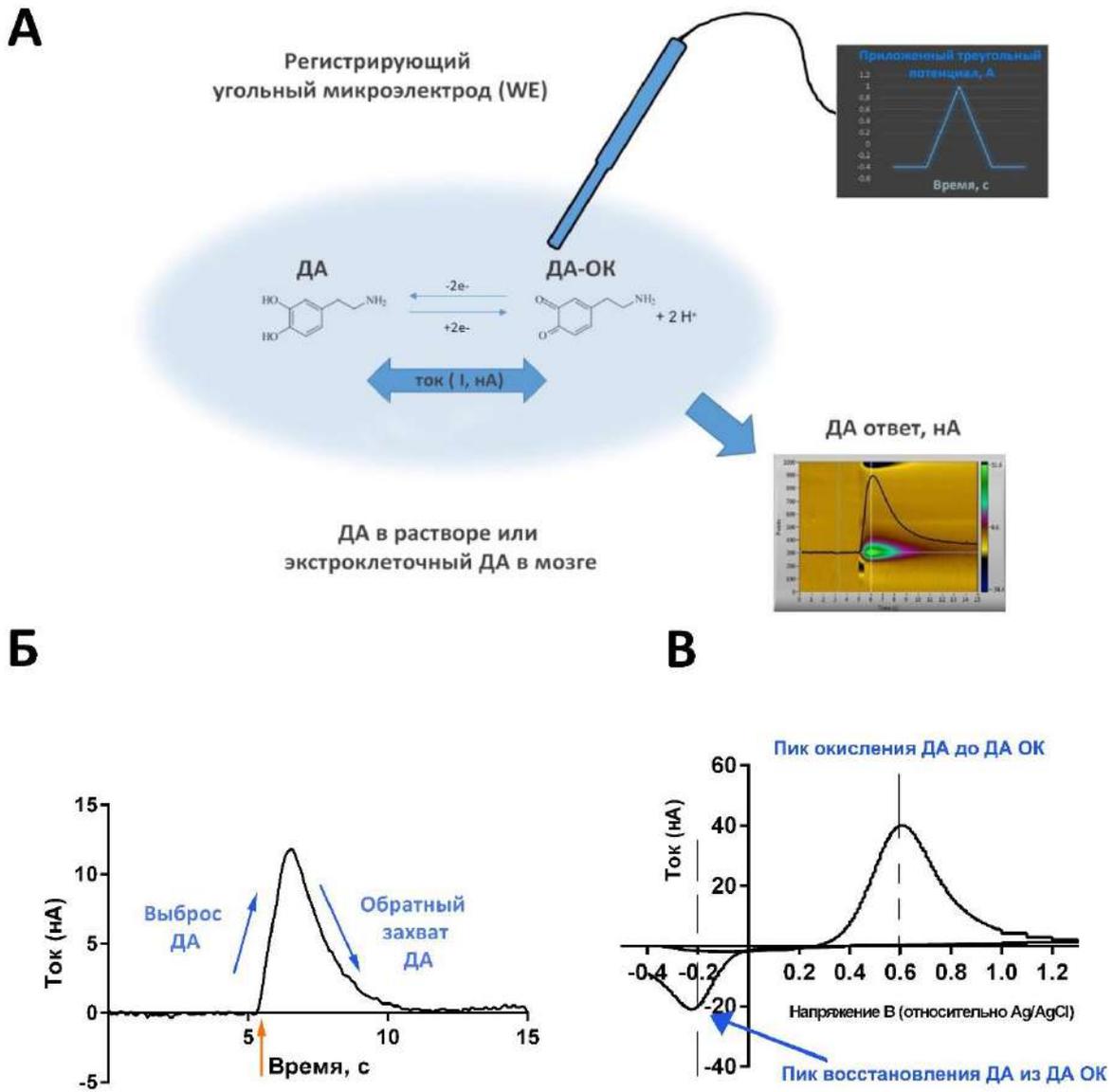


Рисунок 2. Схематическая иллюстрация принципов ДА детекции с помощью метода быстрой сканирующей вольтамметрии. А – электрохимические процессы окисления/восстановления ДА на поверхности регистрирующего угольного микроэлектрода, так же изображен прикладываемый треугольный потенциал (по сравнению с Ag/Ag Cl) с параметрами -0.4 +1.3 - 0,4 В, ниже изображен ДА ответ в nA, nA. Б – ДА ответ в nA, nA после стимуляции зоны VTA, nA. В – циклическая вольтаммограмма (CV) ДА с характерными пиками окисления ДА 0,6 В и восстановления из ДА ОК -0,2 В. Оранжевая стрелочка – электрическая стимуляция 330 мкА, 60 Гц, 60 Импульсов.

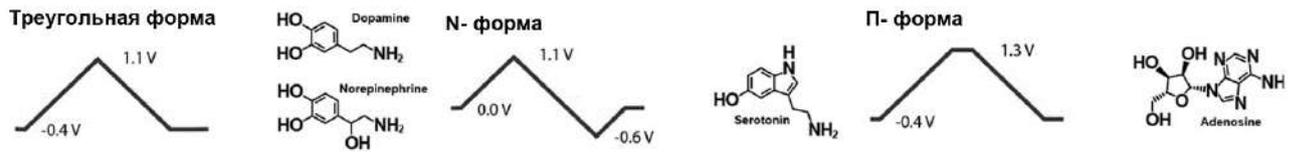


Рисунок 3. Формы потенциалов, прикладываемые к регистрирующему микроэлектроду, необходимые для вольтамметрической регистрации различных соединений.

- Различные варианты методики FSCV (на срезах, *in vivo*, свободноподвижные крысы)

Существуют различные методы регистрации нейромедиаторов с помощью метода вольтамметрии у грызунов. Многими исследователями используют идентификацию ДА ответа на срезах мозга [237–241]. Такой подход наиболее прост с технической точки зрения (постановка электродов, стабильности данных) и эффективен для выявления закономерностей работы определенных тканей (головной и спинной мозг, надпочечники и т.д.), а так же белков, влияющих на динамику нейромедиаторов [232]. Метод с использованием анестезированных животных – более сложен, так как необходимо подобрать анестезирующий агент, который будет подходить для длительных операций и минимально затронет функционирование нервной системы, кроме того необходимо обеспечить стабильность сигнала и точность получаемых с разных животных данных, но явным преимуществом является исследование нейромедиаторной системы на целостном мозге с сохраненными нервными путями [41,234]. Самым сложным является исследование нейромедиаторного ответа у свободноподвижных животных, у которых источником нейромедиаторного выброса служит естественное поведение животного [19,242].

В нашей лаборатории и в представленных здесь работах мы используем метод вольтамметрии *in vivo* на анестезированных крысах/мышьях, так как такой подход сочетает в себе достоинства методов *in vivo* (целостные функционирующие нервные пути) и работы на срезах (возможно исследовать динамику препаратов влияющих на ДА ответы, работу нейронов и рецепторов), данный метод не является простым в использовании, но данные полученные с помощью вольтамметрии *in vivo* точны, и сопоставимы с данными, полученными внутри лаборатории и другими научными группами, работающими на грызунах.

- Особенности вольтамметрии по сравнению с методом микродиализа

Так же, как и метод микродиализа, вольтамметрия регистрирует внеклеточный ДА. Традиционный метод микродиализа, осуществляемый в совокупности с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), регистрирует непосредственную ДА концентрацию в заданной области. Метод вольтамметрии обладает более низкой разрешающей

способностью по сравнению с традиционным методом микродиализа. В области прилежащего ядра регистрируют ДА пик: примерно до 5 нМ методом FSCV [243], против 0,4 нМ, зарегистрированного с помощью метода микродиализа + ВЭЖХ [5,244].

В отличие от микродиализа, с помощью вольтамметрии возможно осуществить анализ ДА ответа с высоким временным (400 В\с) и пространственным разрешением. Таким образом, метод вольтамметрии позволяет осуществлять мгновенный анализ ДА ответа, в то время как на сбор микродиализной пробы требуются десятки минут. Данное обстоятельство является явным преимуществом метода вольтамметрии в то время когда необходимо исследование мгновенных нейрохимических изменений в мозге, например, во время (или после) агрессивного поведения [19]. При использовании вольтамметрии *in vivo* в процессе исследования динамики ДА нейротрансмиссии после фармакологической инъекции исследователь получает возможность регистрировать длительную динамику ДА ответа с интервалами в 10 мин (данный интервал обеспечивает полное восстановление ДА нейротрансмиссии в нейронах [41,240,245,246] после электрической стимуляции) или менее (в зависимости от задачи) в течение многих часов (до 8-ми часов и более). Специальное программное обеспечение (HDCV) позволяет задать все временные интервалы стимуляции, что позволяет получить точную фармакодинамическую картину действия препарата в течение долгого времени в том числе в полуавтоматическом режиме. Кроме того, при использовании вольтамметрии *in vivo*, помимо величины ДА концентрации исследователи получают информацию о: типе регистрируемого соединения, величине его выброса и величине обратного захвата. Данная информация необходима для выявления особенности фармакологического действия препаратов. Особенно данная информация полезна для исследования веществ, влияющих на параметры обратного захвата дофамина (например GBR) [246] + (см. в данной диссертации), сходные нарушения могут проследиваться так же у ДАТ нокаутных животных (см. в данной диссертации).

Таким образом, методы микродиализа и вольтамметрии эффективно применяются в лабораториях для регистрации ДА нейротрансмиссии, как было показано проф. Будыгиным и проф. Мичеком данные полученные данными методами являются сопоставимыми и взаимодополняющими [19,247].

- Области применения метода вольтамметрии

Метод вольтамметрии успешно находит свое применение в исследованиях таких нервно-психических расстройств как: наркотическая, алкогольная зависимости, болезнь Паркинсона и шизофрения. Данный метод используют для регистрации внеклеточного ДА ответа у модельных животных, что необходимо для выявления механизмов развития данных заболеваний [26].

Исследования кокаиновой зависимости, выполненные на модельных животных в парадигме самопотребления кокаина и метода вольтамметрии выявили основной механизм действия данного НВ, то есть ингибирование обратного захвата ДА в процессе самопотребления кокаина [248]. В эксперименте с помощью метода вольтамметрии был впервые показан мгновенный выброс ДА в зоне NAc еще до процедуры самовведения кокаина (нажатия на рычаг), примечательно, что данное повышение ДА уровня совпадало с началом поведения, связанного с поиском кокаина [249], так же и алкоголя [26]. Таким образом, исследования с применением метода вольтамметрии, доказали связь повышенного уровня мезолимбического ДА (процесс ожидания НВ) с appetentной фазой поведения, связанного с поиском НВ [249]. Для выявления механизмов и подходов к лечению алкогольной зависимости в экспериментах проф. Е. А. Будыгина использовалась комбинация методов вольтамметрии и оптогенетической стимуляции. Впервые было показано, что фазическая электрическая стимуляция VTA-NAc запускает поведение поиска алкоголя, в то время как тоническая стимуляция подавляет это поведение [221]. В работах, выполненных с использованием ДАТ нокаутных животных, была показана роль ДАТ в механизмах развития наркотической зависимости и толерантности [26,250]. Крысы и мыши ДАТ нокауты в различных экспериментах используются как животная модель гипердофаминергических состояний и шизофрении. В исследованиях с использованием метода вольтамметрии другими исследователями [26] и в данной диссертации показано, что у животных ДАТ КО в отличие от WT, наблюдается значительное снижение обратного захвата ДА.

При исследовании агонисты TAAR1, было показано, что такие вещества эффективно ингибируют гиперактивность животных ДАТ нокаутов [251,252]. В клинических исследованиях первый испытанный агонист TAAR1 с агонистической активностью 5-HT1A «улотаронт» показал значительную эффективность при лечении больных шизофренией как по положительным, так и по отрицательным симптомам, не вызывая побочных эффектов, наблюдаемых у существующих антипсихотиков [253]. С помощью вольтамметрии и использования TAAR-1 нокаутов было показано, увеличение ДА ответа в прилежащем ядре у TAAR-1 нокаутов по сравнению с диким типом, так же не было показано изменение в функциях ДАТ, таким образом было показано, что улотаронт не влияет напрямую на функции D2 рецепторов [254], однако существует их функциональная связь. Такое опосредованное (через TAAR-1) действие на D2 рецепторы обеспечивает наиболее эффективное лечение шизофрении с меньшим количеством побочных симптомов, чем прямое воздействие на D2 через агонисты [26].

Таким образом, метод вольтамметрии широко применяется в исследовании нейрохимических механизмов различных нейропсихических заболеваний. Основным преимуществом данного метода является возможность производить исследования выброса и

обратного захвата ДА в ответ на введение фармакологических препаратов в режиме реального времени и в комбинации с другими (например, поведенческими) методиками вольтамметрии эффективно позволяет детально исследовать тонкие нейрохимические механизмы данных неврологических нарушений тем или иным способом влияющих на ДА нейротрансмиттерную передачу.

- Использование вольтамметрии при изучении нейрохимических компонентов стрессорной реакции

В данной диссертации метод вольтамметрии (FSCV *in vivo*) используется для исследования нейрохимических последствий стресса социального поражения у самцов [41] и самок крыс с различной стратегией поведения [15].

Стрессорные события провоцируют цепочку биохимических и нейрохимических реакций в организме. Нарушениям дофаминергической (ДА) нейротрансмиттерной передачи, вызванными стрессом, уделяется особое внимание в связи с участием ДА как в мотивационном поведении, также в процессе реализации различных патологических состояний, таких как наркомания и алкогольная зависимость, тревога, депрессия и посттравматическое стрессорное расстройство (ПТСР) [255]. Роль мезолимбической ДА нейротрансмиттерной передачи не только в поведении, связанном с получением «награды», но и в аверсивном и стрессорном поведении была впервые показана в работах проф. Мичека [5]. В работах с использованием электрофизиологических методов и методов микродиализа, было показано, что не только «положительные», но и аверсивные стимулы (укол хвоста, иммобилизационный и социальный стрессоры) вызывали активацию мезолимбических ДА нейронов. Авторы связывали данные процессы с «нейроадаптацией» часто наблюдаемой при действии наркотических веществ на мозг [5]. Другие работы связывают данную ДА активацию с мотивационным компонентом стрессорного ответа [1,112,256]. Так же, в исследованиях на животных показано, что кортикотропин-рилизинг-фактор (КРФ) может непосредственно влиять на наблюдаемые изменения внеклеточного ДА в прилежащем ядре [109].

Непосредственный подъем мезолимбического ДА во время иммобилизационного стресса [18], а затем во время стресса социального поражения [19] был показан на свободно-подвижных крысах в лаборатории проф. Будыгина с использованием метода вольтамметрии *in vivo* [19]. Тот факт, что однократный стресс социального поражения может приводить к длительным (до 1 месяца) физиологическим и гуморальным изменениям в организме был показан в работах Куулхаса [4]. Исследования последствий стресса социального поражения на ДА динамику было так же показано в лаборатории проф. Будыгина [240] и отражено в данной диссертации и в статьях [15,41]

Использование трансгенных животных для изучения механизмов стресса

- Использование TRH2 нокаутов для исследования механизмов алкогольного и стрессорного поведения

Исследования, проделанные в лаборатории проф. Будыгина, показали сходные изменения в ДА системе в последствиях стресса и потреблении алкоголя [240]. В данной диссертации отражается участие как ДА, так и СЕР систем в процессах употребления алкоголя стресс-зависимого употребления этанола с использованием крыс-нокаутов по гену триптофан гидроксилазы 2-го типа (TRH2).

Центральная серотонинергическая нейромедиаторная система участвует во многих важнейших процессах в организме, таких как настроение, эмоции и когнитивные функции, социальное поведение. Дефицит СЕР сигналинга, фундаментально должен влиять на развития всех основных функций ЦНС, однако, животные, нокауты по гену TRH2, у которых генетически отключена (на 80-100%) центральная СЕР нейротрансмиттерная система, не только выживают, но и демонстрируют измененный, но широкий спектр поведений [36,37]. Синтез СЕР в организме зависит от активности ферментов триптофан гидроксилазы TRH. Данные ферменты представлены в организме в двух изоформах и кодируются двумя генами. Ген TRH1 отвечает за синтез периферического СЕР, в то время как TRH2 - мозгового СЕР. Ферменты TRH1 и TRH2 различаются также по пространственному распределению. TRH1 преимущественно экспрессируется в клетках кишечника, что является основным источником циркулирующего СЕР, и в шишковидной железе, где серотонин является предшественником мелатонина. TRH2 же экспрессируется в миентеральном сплетении кишечника и в СЕР нейронах ядер шва, локализованных в стволе мозга, где он отвечает за синтез центрального серотонина [37].

Животные нокауты по гену TRH2 отличаются высокой импульсивностью и агрессией [257], кроме того, генетическая инактивация функции TRH2 и последующая нехватка серотонина в зрелом возрасте у мышей приводит к такому изменению в поведении как депрессивное поведение, пониженная тревожность, однако наблюдались высокие показатели обучения в тесте УРАИ [257]. У самок нокаутов по TRH2 наблюдаются нарушения в материнском поведении, связанные с нехваткой серотонина. У таких самок реже выживают детеныши, так как имеют меньший по сравнению с диким типом вес, кроме того, наблюдался канибализм. Сами самки TRH2 нокауты демонстрируют высокую агрессию даже в период лактации, так же худшие, чем животные дикого типа, показатели материнского поведения (поиск детенышей, уход за детенышами, строительство гнезда) [258], таким образом, в данной диссертации самцы и самки выполняют роль агрессивного субъекта (резидента) в процедуре социального стрессирования.

Данные нокауты часто используются как модель таких заболеваний как аутизм, дефицит внимания и гиперактивность [258], однако в данной диссертации они так же выступают в качестве модельного объекта во время стресс-зависимого алкогольного потребления.

В литературе показано, что процессе приема алкоголя происходит повышение уровня СЕР и снижения - кортизола (у некоторых людей повышение уровня кортизола) [259], [260], таким образом, прием алкоголя в некоторых случаях снижает уровень стресса, что может стать одной из причин стрессорного потребления алкоголя. Однако, у некоторых людей при однократном принятии высокой дозы происходит повышение уровня кортизола через 105 минут после приема [261], кроме того, при определенном типе алкоголизма (агрессивный алкоголизм) может наблюдаться агрессивное поведение [262]. Однако, у хронических алкоголиков ситуация обратная, при хроническом потреблении алкоголя них наблюдается низкий уровень серотонина и высокий триптофан гидроксилазы (ТРН2) [263] наряду с низким уровнем кортизола [261]. Показана возможная связь у человека ТРН2-703Т полиморфизма и «стрессорной алкоголизации», однако данные не достоверны, [264], кроме того несмотря на то, что хронический алкоголизм иногда (15-27% алкоголиков) приводит к самоубийствам [265] роль гена ТРН2 в вероятности самоубийств пока остается не ясной, исследования полиморфизмов не дало достоверных данных [266].

При исследовании стрессорного поведения крыс, было показано некоторые различия в реактивности кортикостерона после 1 ч иммобилизационного стресса у самок крыс ТРН2 нокауты в отличие от животных дикого типа, так же показаны несколько различные паттерны активации ПФК в ответ на стресс, однако, не удалось выявить каких либо значительных нейрохимических различий стрессорного ответа между крысами ТРН2 нокаутами и животными дикого типа [267].

Кроме того, отсутствие центральной СЕР нейротрансмиссии с рождения у ТРН2 нокауты, должно было бы вызвать адаптивное компенсаторное увеличение нейротрансмиссии других нейромедиаторных систем, чтобы обеспечить приемлемое функционирование ЦНС. В литературе имеются скудные данные по этому поводу того, что крысы ТРН2 нокауты наблюдается значительное увеличение экспрессии как генов, так и белков нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в префронтальной коре по сравнению с животными дикого типа [267], так же, методом ВЭЖХ показано, что у мышей ТРН2 гетерозигот наблюдается аномальный мозговой метаболизм ДА и НА во время стресса [268]. Все эти скудные данные позволяют продолжить исследования компенсаторных ДА механизмов, которые могут иметь место у ТРН2 нокауты, кроме того, следует выяснить роль СЕР нейромедиаторной системы в

процессах стресса и алкоголизации. Все эти вопросы находятся на этапе активных исследований, однако свет на все эти проблемы удалось пролить в данной диссертации.

- ДАТ нокауты как модель повышенной гиперактивности и стереотипии

Дофаминовый транспортер (ДАТ) - интегральный мембранный белок, основная функция которого заключается в поглощении выбрасываемого ДА из внеклеточного пространства в пресинаптический нейрон. Белок ДАТ избирательно экспрессируется в ДА нейронах черной субстанции, VTA, однако его плотность самая высокая в полосатом теле и прилежащем ядре. В этих отделах ДАТ является основным регулятором передачи ДА сигналов. ДАТ является важным субстратом для психостимуляторов, таких как кокаин, амфетамины и других НВ [269,270].

Экспериментальные изменения функций белка ДАТ (создание животных-нокаутов /нокдуанов) используются для исследования параметров ДА нейротрансмиссии и влияния данных изменений на мотивационный, эмоциональный, когнитивный и двигательный компонент поведения грызунов [270]. После создания ДАТ нокаута выяснилось, что мыши без белка ДАТ оказались жизнеспособны, однако только около 70% животных выживали через 10 недель после рождения. Мыши оказались плодовиты, однако самки нокаутных (КО) мышей обнаружили неспособность к лактации и нарушение материнского поведения и, следовательно, не оказались способны заботиться о помете, однако в целом животные развиваются нормально, однако набирают вес медленнее по сравнению с животными дикого типа и у взрослых мышей ДАТ нокаутов наблюдается некоторый дефицит массы тела (на 30% ниже чем у дикого типа) [271].

Главной характеристикой фенотипа ДАТ нокаутов является выраженная гиперлокомоция и импульсивность, так же выявлены нарушения в регуляции сна и обучении [271]. Данные поведенческие изменения у животных ДАТ нокаутов обусловлены нарушением обратного захвата ДА, и как следствие - компенсаторного увеличения его внеклеточного уровня. Исследование с помощью вольтамметрии показало, что обратный захват у мышей ДАТ нокаутов происходил в 300 раз медленнее, чем у животных дикого типа [271]. Те же результаты воспроизведены и в данной диссертации, однако при использовании крыс ДАТ нокаутов и поведенческих и вольтамметрических методов.

В литературе, при исследованиях на животных, с помощью микродиализа показано, что базальный внеклеточный уровень ДА, в пять раз выше у мышей ДАТ нокаутов по сравнению с животными дикого типа [272]. Этот факт объясняется тем, что у животных ДАТ нокаутов в отличие от животных дикого типа, ДА сохраняется долгое время в синаптической щели, так как обратный захват ДА идет медленнее (в 40–300 раз), и осуществляется в основном за счет

диффузии. Однако, при использовании метода вольтамметрии ДА ответ в зоне прилежащего ядра так же был снижен (составил 75%) у животных ДАТ нокаутов по сравнению с животными дикого типа [273]. Данные результаты можно отнести в том числе к различию в использованных методиках. Микродиализ измеряет базальный уровень внеклеточного ДА, который был повышен у мутантных животных, вольтамметрия же – электрически вызванный внеклеточный фазический ДА ответ, который оказался сниженный из-за сниженного синтеза ДА у ДАТ нокаутов по сравнению с животными дикого типа [274] и истощения нейронов ввиду высокочастотной стимуляции, вызывающей подъем фазического, а не тонического ДА.

Содержание внутриклеточного везикулярного ДА у животных ДАТ нокаутов, показанное с помощью метода ВЭЖХ, оказалось сниженным (до 20 раз) по сравнению с животными дикого типа [269,275]. Данные изменения можно объяснить тем, что у животных ДАТ нокаутов происходят адаптивные изменения в синтетических процессах в ДА системе, таким образом у животных ДАТ нокаутов, за счет нейропластичности происходят адаптации к низкому содержанию ДАТ в тканях и практически отсутствия обратного захвата ДА [274].

В настоящее время мыши ДАТ нокауты зарекомендовали себя как лучшая модель животных для синдрома дефицита транспортера дофамина [269]. Животные ДАТ нокауты в основном используются для моделирования синдрома гиперактивности (СДВГ), так как обладают гиперактивностью и когнитивным дефицитом, наблюдаемом при СДВГ, кроме того при введении амфетамина и метилфенидата обнаружен антигиперкинетический эффект у этих животных [276]. В настоящее время метилфенидат широко используется при лечении СДВГ у пациентов, снижая спонтанную гиперактивность и повышая внеклеточный уровень ДА в префронтальной коре. Кроме того, ДАТ нокауты так же используются как модельный объект при моделировании гипердофаминергических состояний в биполярном расстройстве и шизофрении и моторных проявлений паркинсонизма [269]. Кроме того, ДАТ нокауты исследуют в процессах наркотической зависимости [271]. Как и следовало ожидать, у животных ДАТ нокаутов (а не СЕРТ нокаутов) обнаружилось значительное снижение самовведения кокаина. Таким образом, исследования показали, что кокаин действует на обратный захват ДА через ДАТ [277].

Крысы ДАТ нокауты демонстрируют повышенную двигательную активность и беспокойное исследование окружающей среды, что связано с преходящим профилем тревоги. Кроме того, эти крысы демонстрируют выраженную стереотипность и компульсивное поведение [270]. Стереотипное поведение является важным компонентом активности животных (обнюхивание, лизание, стойки), патологической активности (кивки) [278], кроме того, одним из важных проявлений стрессорной реакции (груминг, закапывание, кусание прутьев клетки) [44],

в любом случае, ДА система непосредственно вовлечена в процессы активации стереотипного поведения. Показано, что амфетамин – дозозависимо запускает различные типа стереотипного поведения у крыс и мышей, а удаление стриатума – тормозит это поведение [278]. В психиатрии стереотипическим обычно называют движения, повторяющиеся без цели. Такие движения можно наблюдать при различных психических или неврологических заболеваний, таких как шизофрения, умственная отсталость, аутизм, обсессивно-компульсивное расстройство, деменция, Синдром Туретта и височная эпилепсия В поведении животных термин «стереотипия» часто относится к компонентам инстинктивного поведению, или «фиксированных паттернах поведения» описанных выше [278]. Животные ДАТ нокауты демонстрируют гиперлокомоцию в новой среде, так же обладают повышенной стереотипностью поведения [271]. В данной диссертации продемонстрированы особенности ДА ответа у крыс ДАТ нокауты с использованием метода FSCV *in vivo*, так же представлены доказательства их гиперлокомоции и повышенной стереотипии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Животные

В экспериментах по действию иммобилизационного стресс использовались белые беспородные крысы-самцы массой 280–320 г., питомник “Пушино”, возраст на момент начала эксперимента – 3 мес. Животных содержали в виварии, в стандартных условиях (5 крыс в клетке) при световом режиме (12/12 ч), со свободным доступом к воде и корму. Все процедуры с животными проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных. Все эксперименты соответствовали международным правилам этического использования животных в соответствии с Женевской конвенцией 1985 г. о “Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных”, Хельсинкской декларацией 2000 г. о гуманном отношении к животным и руководству по уходу и использованию лабораторных животных: восьмое издание [279]. Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу закрытого заседания этического комитета ФГУП НИИГПЭЧ № 001010/18 05.11.2017. В остальных опытах использовались животные из Ресурсного центра Вивария Научного Парка СПбГУ. Животных так же содержали в стандартных условиях, описанных выше. Для экспериментов использовали самцов и самок крыс Вистар массой 280–320 г., так же самцов крыс Spread Dowley средней массой 350 г. и Long Evans (450-500 г), самцов и самок TRH2 КО и WT (линия Дарк Агути), так же ДАТ КО и WT (линия Вистар). Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу этического комитета биологического факультета СПбГУ (номер № 131-03-8 /25.09.2023).

Поведенческие методики

- Тест «открытое поле»

Данный тест использовался в нейрофармакологии для изучения оценки локомоторной, стрессогенной (замирание, груминг) и исследовательской активности (стойки) животных. Основан данный тест на естественном страхе открытых пространств. Существуют различные модификации данного теста. Поля различаются по размеру и форме, однако общим для всех является сам принцип: животное помещается на ярко освещенную арену. В наших исследованиях используется арена (40 x 40 x 40 см). Поведение крысы записывается в течение 5 минут с помощью системы видеозаписи (EthoVision XT 11.5, Noldus. Wageinen, Нидерланды). Продолжительность поведенческих паттернов (локомоторная активность, замирание, стойки, груминг и т. д.) подсчитывали вручную, анализируя записанные видео [280].

- Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

В настоящее время данный тест считается наиболее адекватным для оценки тревожности у лабораторных животных [281,282]. В основе теста лежит естественный страх грызунов перед открытыми пространствами (открытые рукава), в то же время на предпочтение – закрытых (закрытые рукава). В отличие от «открытого поля» ПКЛ регистрирует не только локомоторную активность, но и уровень тревожности (время нахождения в закрытых рукавах лабиринта). ПКЛ состоит из двух открытых рукавов, длиной 50 см, шириной 10 см, и двух закрытых рукавов такой же длины и ширины, высотой не менее 40 см над поверхностью лабиринта. Размеры входов в закрытые рукава составляют 10×10 см. Они расположены друг напротив друга на расстоянии 10 см. Пол каждого из рукавов расчерчен на квадраты 10×10 см, по 5 квадратов на каждом рукаве. ПКЛ располагается на высоте не менее 75 см над полом. Всех животных сажали носом по направлению к центру лабиринта. После тестирования каждого из животных лабиринт протирали 11 % раствором перекиси водорода для уничтожения запаха предыдущей крысы.



Рисунок 4. Регистрация поведения крысы в ПКЛ с помощью программы Noldus (слева) и программы “Поведение крыс” © Nicolai Kamyshev 2007 (справа).

Регистрацию пройденного пути и времени нахождения в открытом/закрытом рукаве лабиринта осуществляли с помощью программы (EthoVision XT 11.5, Noldus. Wageningen, Нидерланды) (см. рисунок 4). Длительность стоек, груминга, замиранья и др. – высчитывались вручную с помощью программы Realtimer компании «открытая наука». На рисунке 4 показан процесс регистрации поведения крысы в тесте ПКЛ с помощью программы Noldus. В отдельных сериях экспериментах поведение животного регистрировали с помощью программы “Поведение крыс” © Nicolai Kamyshev 2007. Программа регистрировала длительность каждого поведенческого акта в % за 100 с измерения. Количество пройденных квадратов регистрировали количественно, $M \pm m$.

- Установка длительной регистрации поведенческой активности крыс «Лаборас»

Для выявления различий в моторной, исследовательской и др. активности крыс в отдельных сериях экспериментов данной диссертации использовали систему автоматической регистрации поведения LABORAS, Metris, Netherlands, которая позволяет в «домашней клетке» без участия экспериментатора, в течение длительного времени регистрировать поведение, потребление воды и пищи у каждой крысы. Основа системы – измерительные платформы, которые преобразовывают движения животного в электрические сигналы. Клетки с животным помещены и поддержаны в фиксированной позиции на измерительных платформах. Вибрации, вызываемые движением животного в клетке, преобразовываются в электрический сигнал, собираемый со всех платформ, который затем усиливается и преобразуются в поведенческие паттерны с помощью специального программного обеспечения. В наших исследованиях измеряли следующие поведенческие показатели: двигательная, исследовательская активность, время неподвижности/сна, длительность груминга, потребления пищи и воды. Измерения проводили в автоматическом режиме на протяжении 18 часов (с 17 ч одного дня до 11 ч следующего дня). В работах, проведенных с использованием системы LABORAS показано, что данный временной период (18 часов) наиболее адекватен и информативен для оценки естественного поведения грызунов [283].

- Тест предпочтения сладких растворов

В реализации данного теста использовали стандартную двухбутылочную схему, при которой крысы имели доступ к воде (в одной бутылке) и 10% раствору сахарозы (в другой бутылке) по 18 часов в сутки в течение 1.5 недель. Потребление воды и 10% р-ра сахарозы измеряли во время темной фазы суточного цикла [284]. Существуют различные модификации данного теста для крыс и мышей с набором концентраций от 2-32%. Исходя из опыта нашей и других лабораторий и статьи [284] мы использовали концентрацию в 10% как наиболее предпочитаемую. На рисунке 5 видно, что крысы предпочитают 10% сахарозу воде на пятый день потребления (см рисунок 5).

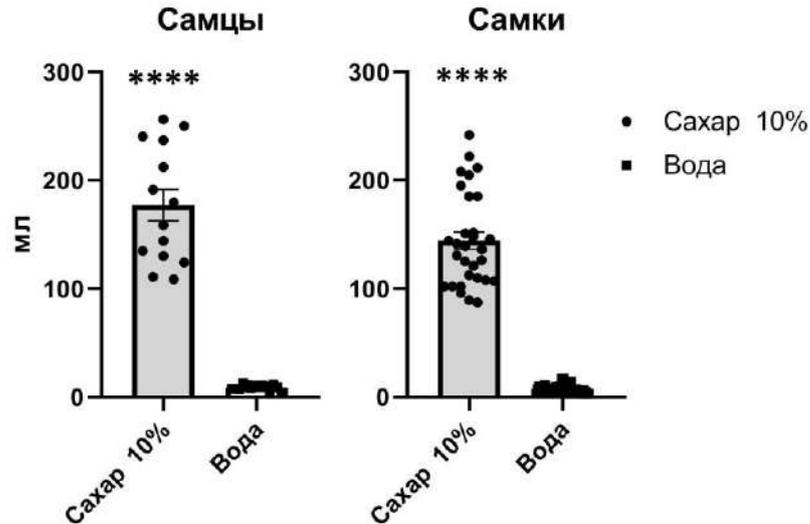
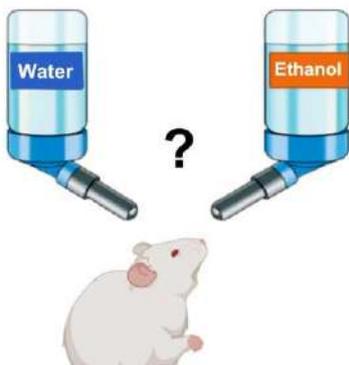


Рисунок 5. Потребление растворов сахарозы /воды самками и самцами крыс Вистар на 5-й день после ежедневного потребления (18ч/день). **** - $P < 0.0001$, t-test Стюдента. По горизонтали – группы животных, по вертикали – потребление, мл.

Предпочтение сахарозы воде в наших экспериментах рассчитывали, как отношение 10% раствора сахарозы (г) к сумме общего потребления жидкости (сахароза + вода, г) $\times 100\%$ [285].

- Тест «алкогольное спаивание»



Для исследования нейрoхимии алкогольного потребления крысы (самцы и самки) TRH2 нокауты (KO)/дикий тип (WT) так же Вистар возрастом около 1 года, массой 350-400 г подвергались процедуре алкогольного спаивания в течение 85 дней с помощью двухбутылочного теста (экспериментальный раствор/вода). В процессе алкогольного спаивания крыс животным ставили 2 поилки, одну - с раствором сахарозы, который постепенно заменялся раствором этанола, другую - с водой. В начале эксперимента крысам ставили поилки с 10% раствором сахарозы/водой, который через 20-ть дней заменяли на раствор этанола (6% сахароза+4% этанол)/вода, затем еще через 20-ть дней (2% сахароза и 8% спирт), по истечению еще 20-ти дней – предъявляли различные стрессорные воздействия: в одних опытах (крысы Вистар) – однократный 20-минутный стресс социального поражения (ССП), в других опытах применяли процедуру субхронического иммобилизационного стресса (4 ч).

Данные потребления раствора (2% сахара и 8% этанол)/ воды регистрировали в течение 2-3-х суток после стрессирования. Для достижения оптимальных значений потребления и создания устойчивой алкогольной зависимости интервал между потреблением сладких-спиртовых растворов составлял 3 дня (только поилка с водой). Поилки взвешивали на весах для подсчета потребления растворов, г. Предпочтение спиртовых растворов воде в наших экспериментах рассчитывали, как отношение потребления спиртовых растворов (г/кг) к сумме общего потребления жидкости (растворы + вода, г/кг) $\times 100\%$ [285].

- Тест Порсолта

Данный тест используется для выявления депрессивно-подобного поведения у крыс [286–288]. При реализации данного теста крысу помещают в наполненную водой цилиндрическую стеклянную емкость (диаметром 45×28 см, с температурой воды $22\pm 2^\circ\text{C}$). Данная температура воды эффективна для создания мотивации к действию у крыс, однако не достаточно низкая чтобы привести к повышенному состоянию иммобилизации из-за холодового стресса [289,290]. Оценка поведенческих параметров начиналась после того, как крыса погружалась в воду и хвост опускался вниз. Во время теста экспериментатор оценивает время неподвижности у крыс в течение 6 мин теста [287,291]. Неподвижность оценивается как кратковременное состояние когда крыса замирает и не двигается [286,287]. В данной диссертации и в некоторых литературных источниках [291–293] данный тест используется так же для отбора животных с «активной» и «пассивной» стратегией поведения. Критерием отбора является – время активного/пассивного плавания в течение 6 минут теста. Животные, демонстрирующие выраженное поведение иммобилизации в тесте Порсолта, классифицируются как «пассивные», если же крыса демонстрирует выраженное активное плавание – «активная» стратегия поведения. Результаты корреляций с другими поведенческими тестами, используемыми нами для отбора животных с данными стратегиями поведения представлены в данной диссертации.

- Тест «предпочтение нового объекта»

Данный тест используется для выявления нарушений зрительной памяти и когнитивных процессов у лабораторных животных [294–296]. В распознавании нового объекта участвует зрительная кора области V1 (часть затылочной коры, ответственной за визуальное восприятие) [296], так же по некоторым данным показано участие гиппокампа [297,298] и префронтальной коры [299,300]. В экспериментах показана, что удаление этих отделов головного мозга приводит к невозможности идентифицировать новый объект в сравнении с ранее предъявляемым [301–303]. Тест направлен на естественную исследовательскую активность грызунов, которая может снижаться при нарушениях функционирования центральной нервной системы.

В основе данного теста лежит естественное любопытство грызунов к новым объектам. Основным критерием к выбору «нового» объекта по сравнению со старым является его отличие по форме, цвету, текстуре и размеру [304]. По моим данным крысы Вистар предпочитают новый объект старому (см рисунок 6).



Рисунок 6. Тест «предпочтение нового объекта». Слева – график предпочтения объектов. По оси X – рейтинг предпочтения нового объекта (формула расчёта: $(H-C)/(C+H)$), по оси Y – индивидуальные значения каждой крысы. На рисунке справа – иллюстрация исследования объектов крысой, заметен процесс обнюхивания нового объекта.

Данный тест состоит из двух частей. В первой части происходит предъявление двух одинаковых объектов. Крыса исследует объекты в течении 8-10 минут. Через час (в случае исследовании кратковременной памяти) или через 24 ч (если исследуется долговременная память) происходят повторное предъявление такого объекта (старый объект – «С») в течение 3-х минут вместе с новым объектом (новый объект - «Н»), отличающимся по цвету, форме и текстуре. С помощью секундомера регистрируется время изучения каждого из объектов, с. в то время когда животное обнюхивает или по-другому исследует новый объект на расстоянии ближе 1 см [294]. Рейтинг предпочтения нового объекта высчитывается исходя из разности времени изучения объектов по формуле $(H-C)/(C+H)$ [294,305]. В используемой мной модификации теста эксперимент проводят в домашних одноместных клетках, чтобы исключить у животных стресс новой обстановки (рисунок 6) [306].

- Тест условного рефлекса активного избегания (УРАИ)

Для тестирования активности стратегии поведения в ситуации электроболевого стресса использовали тест «УРАИ». В наших экспериментах использовался прибор собственного производства, который был построен нами специально для данных исследований [43] и отличался достоверно более высокими показателями «избегания», чем базовая версия [307]. В

любой модификации установка для выработки условного рефлекса активного избегания («УРАИ») представляет собой камеру с прозрачными боковыми стенками, выполненными из органического стекла (в нашей модификации) и пол, замененный на электропроводную решетку [308,309]. Внутри камера разделена перегородкой с проходом в центре. Снаружи на специальном управляющем блоке управления располагается панель с рубильником, через который подается электрический ток и подается условный (тональный сигнал 2-4 кГц 70 дБ - данные параметры подбирались исходя из слуховой чувствительности грызунов [310] и/или электроболевой стимул (ток 0-3 мА). Параметры электрического тока регулировал амперметр со шкалой в 0.1 мкА. Данная чувствительная шкала обеспечивала плавную регулировку интенсивности болевого воздействия, исходя из персональных различий электропроводимости кожи и болевого порога животных. В нашей модификации использовался переменный пульсирующий ток (2 имп./с). При таком воздействии у животных наблюдались проявления болевой реакции (пилоэрекция шерсти, агрессивные стойки, сужение глазной щели, эрекция хвоста, скрежет зубов) даже при действии тока ниже 1 мА, таким образом при низких токах удалось достичь более эффективного поведения «избегания», чем в базовой версии аппарата, кроме того удалось избежать нежелательных аверсивных реакций (выраженное замирание, вокализация, дефекация) наблюдаемых у животных при предъявлении более высоких токов. В процессе тестирования в установке активного избегания животное помещали в камеру УРАИ на 5 минут для снижения стрессорности и для измерения фоновой двигательной, исследовательской и стрессорной активности. По истечении адаптационного периода включали условный раздражитель (звук) в течение 4 секунд, затем к нему присоединяли безусловный раздражитель в виде подачи электрического тока на 6 секунд. Для каждой крысы производили 25 попыток (измерений), межсигнальный интервал между измерениями составлял от 15 до 30 секунд. Сила тока (до 1мА) и длительность межсигнальных интервалов варьировала в зависимости от степени обучения и уровня стресса животного [43]. При тестировании производили измерение количества уходов на безусловный стимул (ток) - «избавление» и на условный (звук) - «избегание». Так же производили измерение количества «не уходов». Время тестирования каждого животного составляло в среднем 20 минут. Тестирование в установке УРАИ осуществляли на протяжении 2-х последовательных дней. По данным полученными нами ранее, [46] эффективность выработки навыка реакций «избегания» на условный сигнал – звук на второй день тестирования определяет активность стратегии поведения животного.

- Тест «Конкуренция за воду»

Использовался для выявления социального статуса животных в клетке [311]. Крыс, находящихся в домашних клетках (n = 5) с устоявшейся иерархией, подвергали водной

депривации в течение 24-х ч. После этого устанавливали поилку с водой на специальном штативе. По данным литературы [312] и по опыту в нашей лаборатории, иерархия у крыс устанавливается обычно в течение 5-7-ми дней после помещения в новую клетку. Стабильность иерархии определялась незначительным количеством социальных конфликтов в клетке в процессе лабораторных манипуляций (чистка клеток и т.д.), а также отсутствием конкуренции за какие-либо ресурсы (пища и вода в свободном доступе) и других стрессорных воздействий. Поведение крыс регистрировали с помощью видеокамеры. Время каждого тестирования составляло 10 мин. При анализе видеозаписи для каждого животного, предварительно помеченного яркой меткой, измеряли латентный период подхода к поилке, число и эффективность агрессивных атак. Социальный статус вычислялся по эффективности конкуренции за витальный ресурс (воду) по совокупности поведенческих показателей. Тестирование социального статуса проводили три раза с интервалом раз в 2 нед., к соответствующим поведенческим группам относили животных с результативностью 2/3 и 3/3. По окончании процедур рандомизации из общей группы крыс-самцов ($n = 60$) были выделены следующие подгруппы: “активные доминанты” АД ($n = 15$) и “неактивные субординанты” СН ($n = 15$). Отобранных для дальнейшего эксперимента животных содержали в их домашних клетках для сохранения иерархического статуса [43].

- Тест «отдергивание хвоста» (*tail flick*)

Тест «отдергивание хвоста» или «*tail flick test*» применяется для измерения болевого порога у крыс. Регистрируют латентный период реакции «отдергивания» хвоста в ответ на тепловое раздражение с. В процессе теста животное помещается на нагретую пластину на 20 мин. Поверхность калибруется таким образом, чтобы нормальное животное реагировало примерно через 10 с после воздействия (обычно 52–53 °С). Исследователь записывает латентный период и длительность, в течение которого животное реагирует на тепловые раздражители. Индивидуальные реакции различаются: облизывание задней лапы является надежным показателем дискомфорта, хотя некоторые животные могут прыгать или демонстрировать вокализацию [313,314]. В нашей работе использовался аппарат PANLAB 7160, Испания. Адаптации к установке не производилась, учитывалось одно измерение, нагревание прибора происходило в течение 20 мин, финальная температура 50°С.

Биохимические, гистологические и генетические тесты

- Биохимический анализ сыворотки крови

Анализ триглицеридов, креатинина, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), холестерина проводили по методу [315] на автоматизированном биохимическом анализаторе SAPHIRE-400 (Tokyo Boeki Ltd., Япония) с использованием наборов реагентов производства фирмы Randox (Randox Laboratories Ltd., Великобритания). Перед анализом плазму крови выделяли у крыс через 5 дней (4 часа\день) после иммобилизационного стресса. Для анализа использовалась сыворотка крови, полученная из крови, собранной после декапитации, затем подвергнутой центрифугированию со скоростью 2000 об\мин и отделению верхней фракции без сгустков.

-Анализ кортикостерона в плазме крови

Кортикостерон является надежным индикатором стрессорного состояния у животных. Под влиянием стресса данный гормон выбрасывается в кровь из коркового вещества надпочечников и его концентрация остается повышенной вплоть до 6-ти часов после стрессорного воздействия [4,316]. В наших исследованиях мы проводили фоновое измерение уровня кортикостерона, так же через 4 часа после однократного 4-х часового иммобилизационного стресса и через 5 дней после иммобилизационного стресса (4 ч \день). Для анализа использовалась плазма крови, полученная из крови, собранной из хвостовой вены в специальную пробирку с ЭДТА. Для измерения кортикостерона использовали фотометр микропланшетовый Termophisher Multiscan FC и набор Abnova Elisa Kit.

- Иммуногистохимический анализ (ИГХ) ДА рецепторов

Процедура, реактивы. Процедура проводилась у крыс через 5 дней после иммобилизационного стресса (4 ч \день). После декапитации головной мозг животных извлекали и вырезали тканевые образцы сегментальной плоскости левого полушария в стереотаксических координатах: -1,13 до -2,07 mm *ant. Bregma* (<https://scalablebrainatlas.incf.org/>). Тканевые образцы сразу после вырезки помещали на держатель образцов в камеру микротомы-криостата Slee MEV при температуре -13⁰С. В качестве криопротектора использовали 9% раствор сахарозы, приготовленный *ex tempore*, которым полностью покрывали образец ткани. Получали поперечные срезы головного мозга толщиной 7 мкм. Срезы фиксировали в ацетоне в течение 5 мин, после чего 5 мин промывали 0,01 М фосфатно-солевым буфером TBS IHC Wash Buffer+Tween, 20X (Cell Marcue). Для ИГХ использовали:

1. Для идентификации D1a: мультимерную безбиотиновую систему детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (SpringBio) хромоген диаминобензидин
2. Для идентификации D2: мультимерную безбиотиновую систему детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent AP (SpringBio) хромоген fast red.

Все этапы ИГХ выполнены с помощью планшета Slide Master (SkyTek Laboratories) при температуре окружающей среды 21-23⁰С. На 10 минут наносили на срезы Protein Block (фосфатный буфер pH 7,6 содержащий 0,5% BSA и 0,5% казеина). Промывали в TBS 5 мин.

Наносили на срезы рабочий раствор первичных антител (Mouse Anti-dopamine D1a receptor Millipore[®] (MAB5290) и Anti-Dopamine D2 receptor (AB1558) Millipore[®]) в титрах от 1:50-1:200.

Для разбавления антител использовали Primary Antibody Diluent (Diagnostic Biosystems). Инкубировали от 60 минут при комнатной температуре до 12 часов при +4С. Промывали в TBS дважды по 5 минут. Вносили на срезы HRP Conjugate (вторичные антитела, козы, анти-кроличьи, меченные пероксидазой хрена). Инкубировали 15 минут. Промывали в TBS пять раз по 5 минут. Вносили на срезы предварительно подготовленную смесь 20 мкл DAB Plus Chromogen (3,3'-диаминобензидин) и 1 мл DAB Plus Substrate. Инкубировали 5 минут. Промывали в TBS 3 смены по 5 минут. Далее срезы обрабатывали в спиртах восходящей крепости, просветляли орто-ксилолом и заключали в среду Biomount (Biovitrum).

Протокол оценки ИГХ. Окрашенные срезы просматривали под микроскопом при режимах увеличения 103х; 247х и 413х. На срезах фотографировали регионы неокортекса и стриатума при увеличении 103х и далее в программе ВидеоТест подсчитывали количество позитивно окрашенных нейронов на площади размером 10⁴ мкм (рисунок 7).

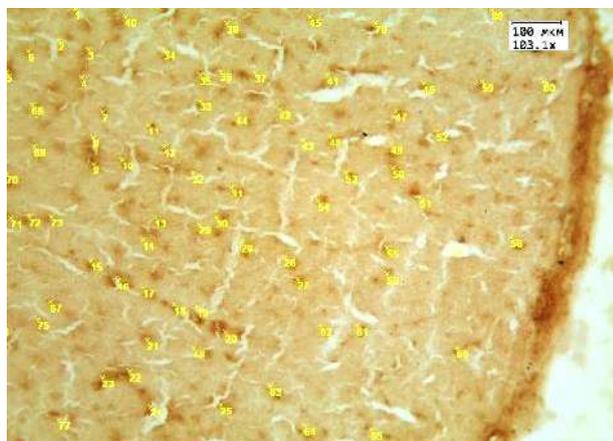


Рисунок 7. Иллюстрация подсчета ДА клеток в программе ВидеоТест. Желтые стрелочки обозначают номера ДА клеток. На рисунке оказано 80 клеток.

- Методика измерения стадий эстрального цикла крыс

Взятие и анализ влагалищных мазков проводились у самок крыс методом вагинального смыва. Для этого пластиковая пипетка с 60 мкл дистиллированной воды вводилась атравматично в влагалище крысы, которая сидела в закрытом тканевом рукаве. После введения пипетки во влагалище крысы - производилось 3 нажатия и каплю жидкости с биоматериалом помещали на предметное стекло. После каждой крысы носик пипетки выкидывали. Далее производили процедуру окрашивания влагалищных мазков по Май Грюнвальду. Для этого на предметное стекло с влагалищным мазком капали 20 мкл красителя эозин метиленового синего и накрывали покровным стеклом [317]. Далее такой влажный окрашенный препарат немедленно помещали под световой микроскопом Leica с увеличением 300-400 раз и проводили анализ стадии эстрального цикла (рисунок 8).

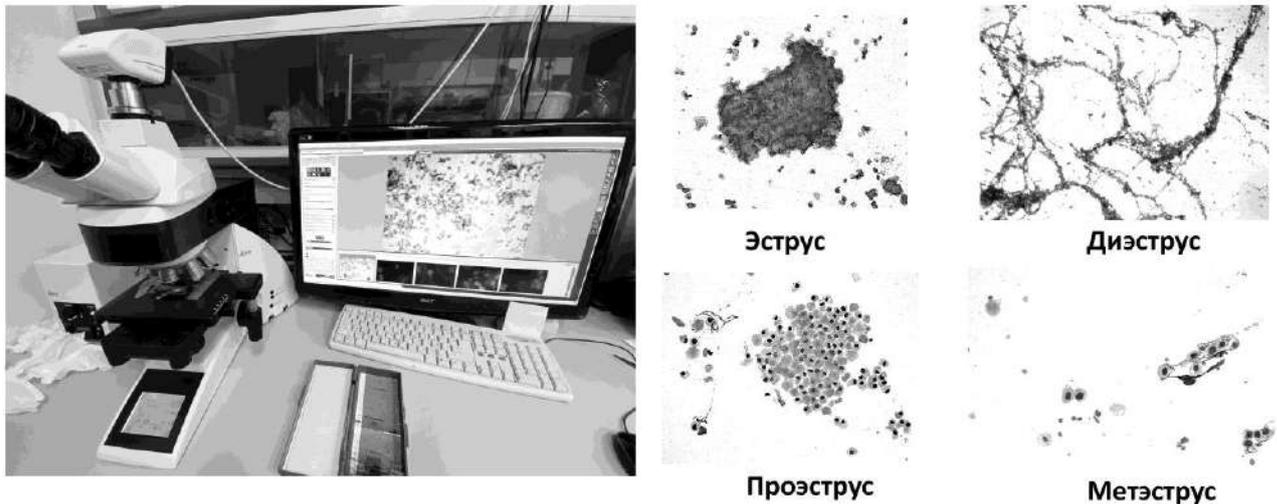


Рисунок 8. Иллюстративная схема идентификации стадий эстрального цикла у крыс. На фотографии слева изображен процесс идентификации стадий эстрального цикла у крыс по фотографии. На рисунке справа изображены стадии эстрального цикла.

Эстральный цикл у крыс (рисунок 8) состоит из 4-х фаз: проэструса, эструса, метэструса, диэструса [317–320]. Диэструс (наиболее продолжительная стадия) характеризуется наличием лейкоцитов и большого количества слизи в мазке. В стадии проэструса мазок содержал крупные ядерные эпителиальные клетки, с синеватым крупным ядром. Стадия эструса идентифицировалась по наличию в мазке большого количества крупных ороговевших безъядерных клеток, в конце стадии (поздний эструс) образующих значительные скопления. В фазе метэструса присутствуют клетки всех 3-х типов (лейкоциты, эпителиальные клетки, чешуйки). Однако, некоторые исследователи не выделяют эту стадию цикла у крыс, а относят ее к раннему диэструсу из-за трудности ее идентификации [321].

Примечательно, что процедура взятия влагалищных мазков производилась в одно и то же время (13.00) для увеличения точности полученных данных, так как утром и ночью у крыс наблюдается пик прогестерона [322,323] и максимально атравматично для крысы. Во время и после процедуры крысы демонстрировали нормальное поведение (отсутствовала вокализация во время процедуры, отсутствовало стрессорное поведение замиранья после процедуры). Взятие влагалищных мазков производили в течение 2-х недель чтобы исключить стресс от взятия мазков [317].

В исследованиях социального стресса на самках стадии цикла определялись у крыс до процедуры стрессирования и поведенческих тестов, в случае деления на группы (по типу стрессорной реакции) крысы подбирались так, чтобы в каждой группе было одинаковое количество крыс в стадии диэструса (не рецептивная фаза цикла) и эструса\проэструса (рецептивная фаза цикла), так как в литературе показано изменение тревожности у крыс в таких стадиях эстрального цикла [319].

- Методика генотипирования *TRH2* нокаутов

TRH2 является ключевым геном, участвующим в каскаде синтеза нейронального серотонина (5-НТ) играя ключевую роль в регуляции нейротрансмиссии 5-НТ (Gutknecht et al., 2012). Определение крыс, нокаутов по этому гену является необходимым для проведения экспериментов. Данный процесс называется генотипированием.

Сам процесс генотипирования состоит из нескольких этапов. На первом этапе из фрагмента ткани животного выделяется ДНК при помощи лизирующего и нейтрализующего ферментов, далее производится амплификация ДНК с помощью процедуры ПЦР (полимеразная цепная реакция). Для прохождения ПЦР готовится специальная смесь из праймеров и специального раствора (BioLabmix) и добавляется в пробирки для проб. Необходимо проверить эффективность прохождения ПЦР. Для этого проводится процедура промежуточного электрофореза с 2% агарозным гелем (3г агарозы к 150 мл ТАЕ 1x + 100 мкл Раствор EtBr 1000x) на режиме 80V в течение 40 мин – 1 ч. (рисунок 9). Для визуализации полученных после промежуточного электрофореза результатов используют программу ImageLab.

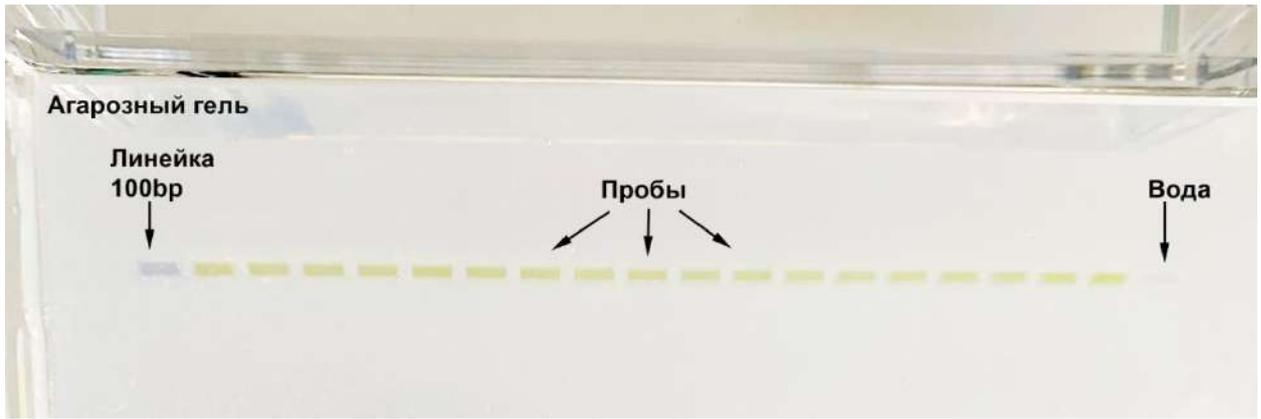


Рисунок 9. Начальная стадия электрофореза (до разделения проб).

Для выявления фрагментов ДНК, соответствующих генотипу нокаута (KO), гетерозиготы (Hz) и дикого типа (WT) в данном исследовании необходимо провести процедуру рестрикции (разрезание фрагментов ДНК). Для этого надо приготовить специальный буфер для рестрикции (состав – рестриктаза Mnl1 (NEB R0163S), CutSmart buffer и вода), внести данный буфер в пробы, нагреть образцы до 37 С (2,5 ч), затем до 60 С (20 мин). После остывания проб провести процедуру гелевого электрофореза (3% агарозный гель). Для визуализации полученных данных генотипирования так же используют программу ImageLab (рисунок 10).

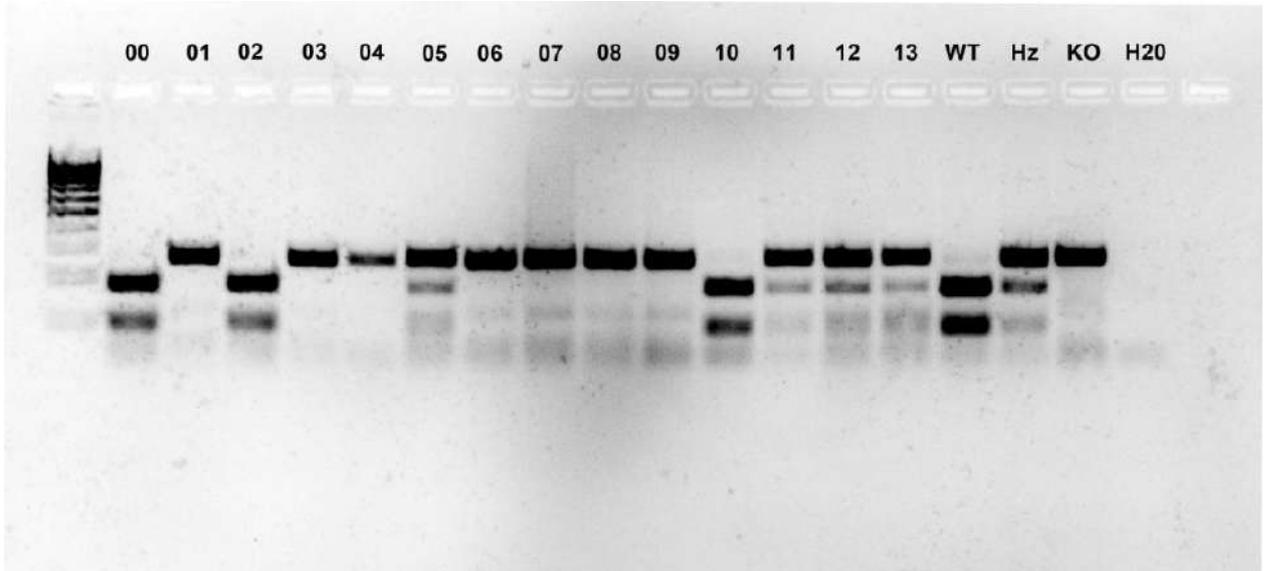


Рисунок 10. Финальные результаты генотипирования крыс нокаутов по гену TRH2. Генотипу WT (дикий тип) соответствуют пробы (00,02,10); KO (нокауты) (01,03,04,06-09); Hz (гетерозиготы) (05,11-13).

Методика высокоскоростной циклической вольтамметрии (FSCV in vivo)

- Регистрация ДА ответа у анестезированных животных с помощью метода вольтамметрии

В нашей лаборатории мы используем методику вольтамметрии in vivo на анестезированных крысах и мышах для изучения процессов выброса и обратного захвата ДА, так же процессов истощения\синтеза ДА и регистрируем ДА ответ после действия различных фармакологических агентов [41].

Перед началом экспериментальных процедур животных взвешивали, затем производилась анестезия с помощью уретана 1,5 г\кг. Перед началом операционных процедур производится тестирование эффективности наркоза путем раздражения поверхности стопы (подошвенный рефлекс) и хвоста, во время операционных процедур данное мониторирование так же производится каждые 10 мин. Если до операции, в течение 30 мин или в процессе появляется признаки выхода из наркоза – доза наркоза увеличивается на 0,01 мл (показания записываются). Далее происходила разметка черепа далее, проверка и подключение соответствующего вольтамметрического оборудования (Рисунок 11), затем опускание электродов для адаптации в тканях. В процессе адаптации производилась процедура «cycling». Эта процедура необходима для увеличения стабильности данных, получаемых от WE и снижении «шума». В течение этой процедуры WE находится в мозге животного в течение 10 минут при включенном потенциале с частотой 60 Гц. После процессов адаптации электродов, их позиционируют в соответствующий области по стереотаксическим координатам [324].

Регистрирующий угольный микроэлектрод (WE) (диаметр до 6 мкн и длиной 70-100 мкн) опускали в область прилежащего ядра (NAc) (AP: 1,3 мм, ML: 1,3 мм, DV: -7,1 мм), металлический стимулирующий электрод (SE) (Plastics One, VA) опускали в зону вентральной области покрышки (VTA) (AP: -5.2 mm, ML: 1.0 mm DV: -8.4 mm). Хлорсеребряный электрод сравнения (Ref) (Ag\AgCl) (который предварительно хлорируют в 1N растворе HCL) опускается на минимальную эффективную глубину в ткани контралатерального полушария. Электроды (WE и Ref) подключали к вольтамметрическому усилителю, сопряженному с компьютером, на котором установлено специализированное программное обеспечение для регистрации вольтамметрических данных (HDCV). Для детекции ДА использовался потенциал треугольной формы волны (от -0,4 В до +1,3 В и обратно до -0,4 В) по сравнению с Ag/AgCl, 400 В/с) (рисунок 11).

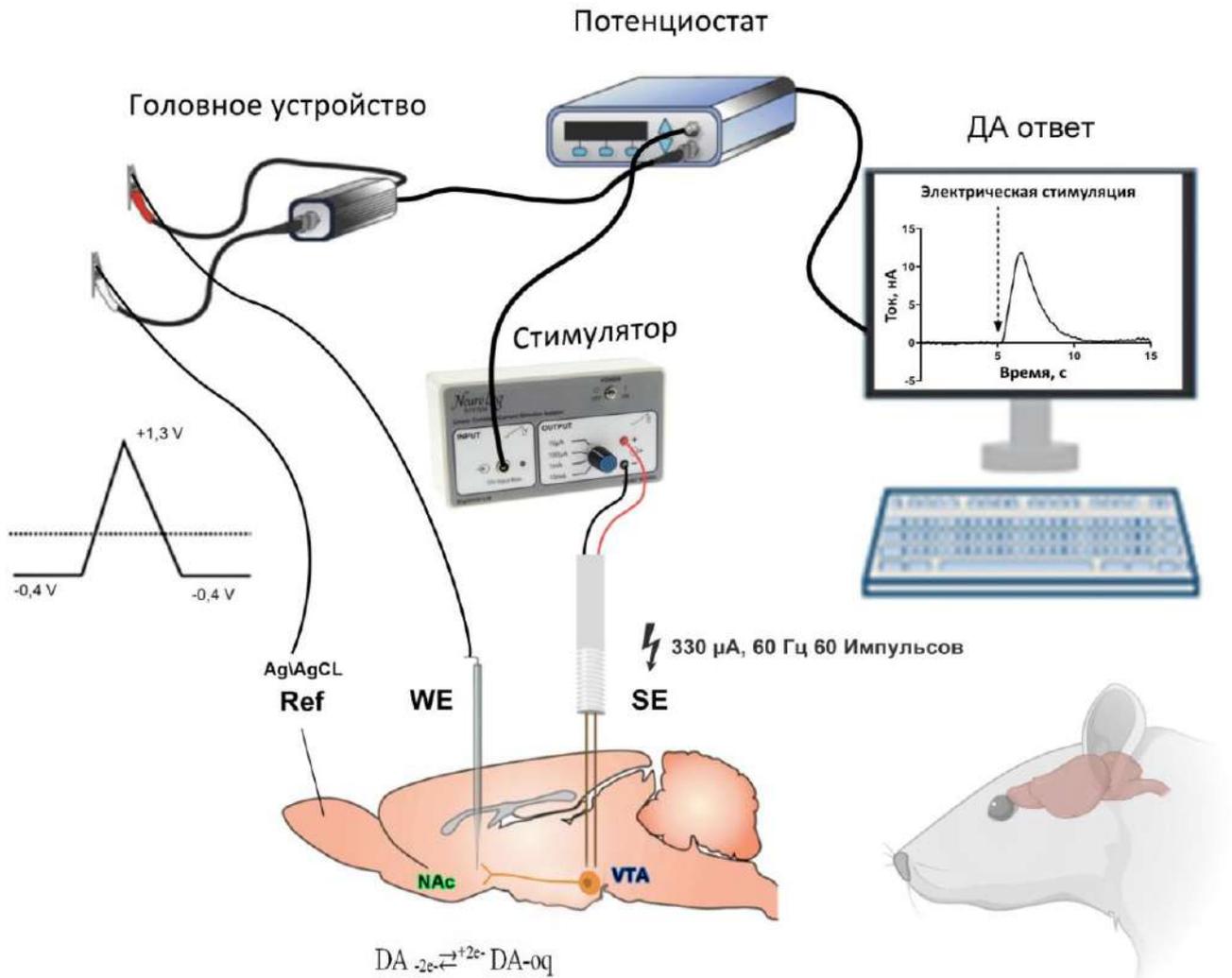
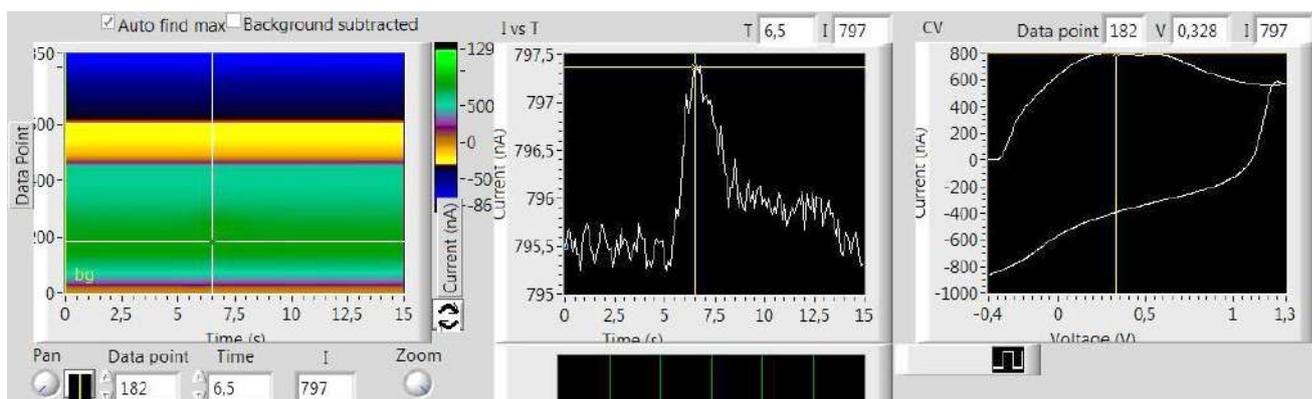


Рисунок 11. Общая схема вольтамметрической установки и положения электродов в процессе регистрации ДА с помощью метода FSCV in vivo. Ref – электрод сравнения, WE – регистрирующий микроэлектрод, SE – стимулирующий электрод. NAc – прилежащее ядро, VTA – вентральная область покрышки. В процессе регистрации ДА ответа на электроды WE и Ref подаются и поддерживаются (с помощью потенциостата) соответствующие потенциалы. Для WE используется потенциал треугольной формы, -0,4 В до +1,3 В и обратно по сравнению с Ref (Ag\AgCl). Электрическая стимуляция осуществляется SE и подается с различными параметрами тока с компьютера через потенциостат и стимулятор, в ответ на электрическую стимуляцию зоны VTA с помощью WE регистрируется ДА ответ в NAc. Данные ДА ответа, получаемые после электрической стимуляции, за вычетом фона, поступают на персональный компьютер с установленной программой HDCV. На рисунке показан характерный ДА ответ, nA после 1 с стимуляции 330 μ A.

В процессе электрической стимуляции (необходимой для ДА регистрации) у животного регистрируются лишь отдельные рефлекс подергивания усов, данный рефлекс продолжается всего 1 с в течение стимуляции, по выраженности и симметричности данного рефлекса можно судить о зоне попадания стимулирующего электрода. Примечательно, что все остальные рефлексы (подошвенный рефлекс и др.) на протяжении всего эксперимента тестируются каждые 10 мин и должны быть подавлены, то есть отсутствовать.

В процессе вольтамметрических измерений, а именно во время приложения потенциала значительно возрастают поверхностные не фарадеевские токи. По своей величине данные токи превышают необходимые нам фарадеевские токи (более чем в 10 раз), полученные от окислительно-восстановительных реакций ДА, которые и таким образом заглушают ДА сигнал. В программе HDCV возможно аппаратно удалить значения этих поверхностных токов, которые могут достигать до 1000 нА (рисунок 12) и извлечь необходимый ДА сигнал в зоне НАс, полученный после электрической стимуляции зоны VTA.

Вольтамметрический сигнал БЕЗ вычета фона (✗ Background subtracted)



Вольтамметрический сигнал за вычетом фона (✓ Background subtracted)

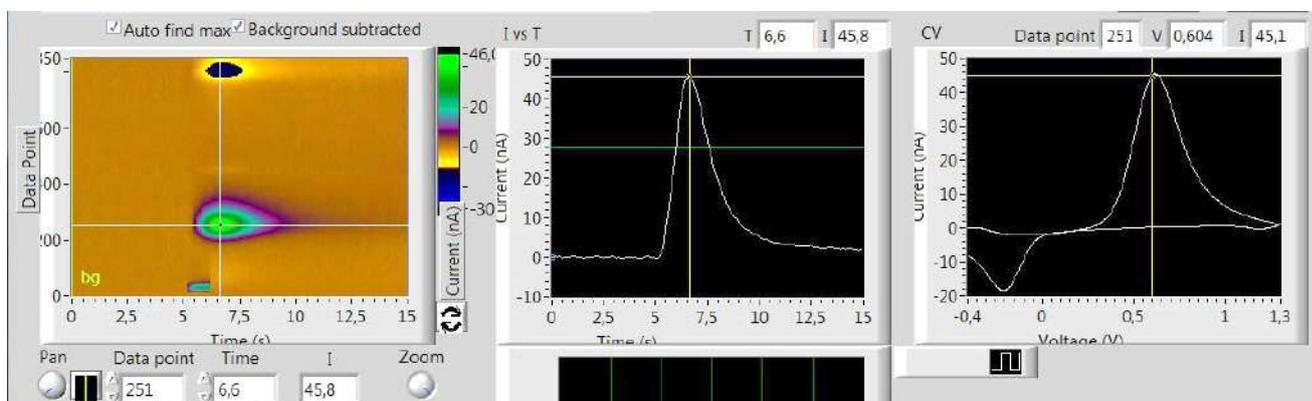


Рисунок 12 На рисунке изображены вольтамметрические сигналы без и с вычетом фоновых нефарадеевских токов. На картинке явно видно, что без вычета таких токов невозможно идентифицировать ДА ответ, так как такие токи более чем в 17 раз превосходят ДА сигнал.

- Характеристики стимуляций и частотная зависимость сигнала

В процессе экспериментов с использованием метода вольтамметрии для регистрации ДА нами использовались следующие характеристики:

Длина регистрирующей части рабочего электрода: 80-165 μM

Положение WE, SE определяется по атласу, относительно стереотаксических координат.

Прикладываемый на рабочий электрод потенциал по сравнению с потенциалом электрода сравнения Ag\AgCl: -0.4 до +1.3 В; -0.4 В, скорость 400 В/с.

Частота стимуляции: 5-60 Гц

Амплитуда: 198-330 μA

Количество импульсов: 5-60 в 1 сек

Время стимуляции: 1 сек

Время между стимулами: 5-10 мин

Примечательно, что во время поиска ДА сигнала мы использовали более низкие токи (198 μA), чем в экспериментальной части (330 μA). Такая схема использовалась из-за того, что процесс восстановления ДА после стимуляции высокими токами равен 7-10 мин, а низкими – 1 мин. Таким образом, возможно найти оптимальный ДА сигнал при низких токах, затем выполнить экспериментальную часть на 330 μA .

После нахождения стабильного уровня ДА на глубине, соответствующей стереотаксическим координатам выполняется процедура частотной зависимости ДА сигнала от характеристик электрической стимуляции (рисунок 19 и др.). Стимуляция производится с интервалами 10 минут и с частотными характеристиками сигнала от 5-60 Гц при амплитуде сигнала 330 μA , время стимуляции 1 с. В отдельных сериях эксперимента производилась зависимость амплитуды сигнала от ДА ответа. В таком дизайне изменялась лишь амплитуда сигнала (от 198-330 μA с шагом 33 μA) при постоянном времени стимуляции и частотных показателях (60 Гц, 60 пульсов).

- Использование метода FSCV для изучения процессов истощение/синтеза ДА

Данная процедура производится для того, чтобы изучить процессы истощения и последующего восстановления уровня ДА в нейронах. Ранее показано, что сильная продолжительная стимуляция истощает ДА из терминалий [245], нами использовалась схема с 10 с стимуляцией VTA и с последующей регистрацией ДА релиза в течение 180 мин [41]. Для этого, после достижения стабильного базального уровня ДА (различия в уровне сигнала двух последних стимуляций не более 10%), крыс подвергали процедуре ДА истощения (10 с, стимуляция 60 Гц, 60 импульсов). Протокол истощения включал три последовательные стимуляции (330 μA , 60 Гц, 600 импульсов), которые проводились с интервалом 1-2 с. Затем использовали обычную стимуляцию (330 μA , 60 Гц, 60 импульсов) с интервалами в 1 мин (14

стимуляций), 5 мин и 10 мин, чтобы проследить процесс восстановления ДА сигнала. Полученные значения ДА сигнала переводятся в % от фоновых значений (среднее от двух первых значений до стимуляции принимается за 100%).

- Использование метода вольтамметрии для изучения функциональности Д2 ауторецепторов

Для выявления функциональности Д2 ауторецепторов использовали Д2 антагонист раклоприд, который вводили (2 мг / кг) внутривенно (в.в.). Запись ДА ответа производили в течение 90 мин после введения данного препарата.

- Гистологическая верификация позиции регистрирующего микроэлектрода

После вырезки образцы ткани интересующей области головного мозга фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 24 часов, промывали в проточной воде в течение 20 минут, после чего выдерживали при +4°C в 30% растворе сахарозы в 0,1 М фосфатном буфере по методике [325] в течение 48-96 часов. Образец ткани мозга после обработки криопротектором замораживали в камере криостата в 7% растворе сахарозы в 0,1 М фосфатном буфере. Криостатные срезы толщиной 15 микрон получали на микротоме-криостате SleeMev (Germany) при температуре -18 °C. Окрашивали срезы гематоксилин-эозином по стандартной методике. Микроскопию срезов выполняли на микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Germany).

- Оборудование и электроды и для процедуры вольтамметрии

В процессе регистрации ДА методом вольтамметрии мы используем следующее оборудование:

Вольтамметрическая установка (рисунок 11), состоящая из блока потенциостата (Potentiostat), генерирующего и поддерживающего потенциал заданной величины (PS) (UNC Chemistry Electronics Shop, Chapel Hill, NC, USA). К блоку PS подключен блок разводящий проводку электродов (Headstage) к которому подключен на проводах серебряный электрод сравнения и угольный регистрирующий микроэлектрод. Электрическая стимуляция VTA с различными электрическими характеристиками производится с помощью стимулятора (NeuroLog, DIGITIMER, Англия) при помощи стимулирующего электрода. Блок стимулятора так же подключен к PS, который в свою очередь подключен к персональному компьютеру со специальным программным обеспечением High Definition Cyclic Voltammetry (HDCV), NC, USA. Данное программное обеспечение контролирует параметры сканирования (потенциала подаваемого потенциостатом), а именно форму и электрические (мы используем потенциал треугольной формы для детекции ДА -0,4 В до +1,3 В и -0,4 В) и временные (400 В/с) характеристики потенциала, так же время сканирования (9.3 мс) и время между сканированиями

(100 мс) [326]. Полученный после электрической стимуляции VTA ДА сигнал, высчитывался аппаратно, при помощи данной программы, которая удаляет фоновые не фарадеевские токи, происходящие ввиду электрохимических процессов на поверхности регистрирующего электрода во время сканирования, и вычленяет фарадеевский ДА сигнал. Для уменьшения шума, который может значительно влиять на вольтамметрические измерения – стереотакс и электроды находятся в камере Фарадея.

В качестве стимулирующего электрода мы использовали двухполярный стимулирующий электрод (Plastics One, VA, USA). Электрод был обрезанн до длины 8,8 мм, расстояние между ножками электрода составляло 1 мм.

Электрод сравнения изготавливали из серебряной проволоки, которая была покрыта изоляцией с диаметром 0,5 мм. Перед экспериментами снимался слой изоляции для освобождения серебряного слоя, для последующего электролиза под действием постоянного тока 3А 5 В с добавлением 1Н раствора соляной кислоты. В результате электролиза, благодаря электрохимической реакции на поверхности данного электрода происходил процесс хлорирования с образованием хлорсеребряного покрытия (AgCl).

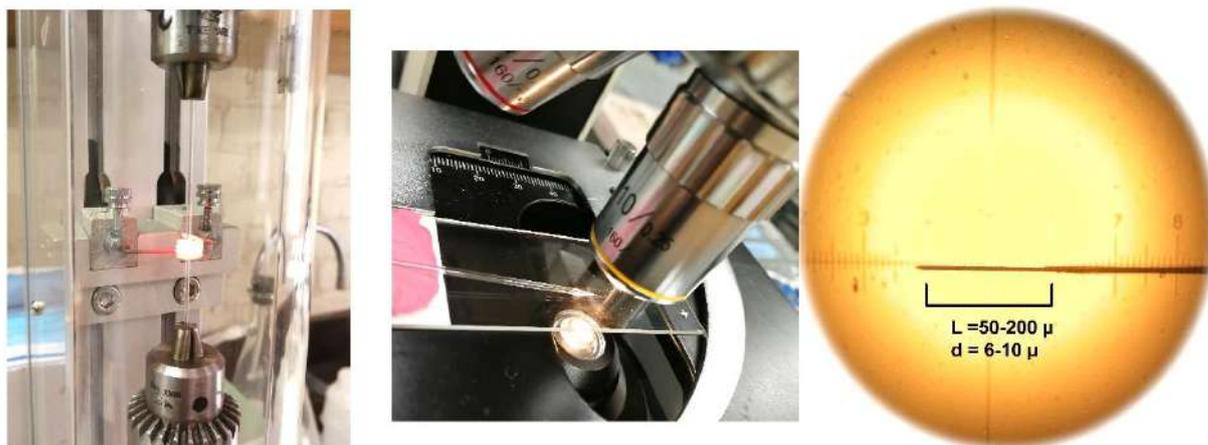


Рисунок 13. Процесс изготовления регистрирующего микроэлектрода. Слева – растягивание электрода на пулере. По центру и справа процесс электрод в процессе и после обрезки до заданной длины. На рисунке электрод длиной 210 μ и неправильной формы, такой электрод не подходит для экспериментов на крысах так как будет давать зашкал из-за слишком высокой чувствительности.

Регистрирующие микроэлектроды изготавливались вручную (рисунок 13). Мы используем стеклянный капилляр диаметром 0,8 мм (A-M Systems, K-F Technology, USA) углеродное волокно, которое засасывается в капилляр с помощью хирургического отсоса (Армед 7Е-В, РФ). Готовый полуфабрикат помещается в пулер (РС-100, Narashige, Япония), где он

растягивается и полученную таким образом заготовку обрезают в ручную на микроскопе с помощью скальпеля. Длина полученного таким образом углеродного волокна в среднем составляет 100 μ . Экспериментаторы пытаются использовать электроды длиной от 80-100 μ , так как длина электрода напрямую связана с его чувствительностью. Процесс изготовления регистрирующего микроэлектрода показан на рисунке 13. В процессе экспериментальной в стеклянный капилляр помещается соединяющий с установкой провод, который предварительно был обмазан раствором жидкого серебра (Silver Print, USA), для лучшей электропроводимости.

- Калибровка электродов in vitro

Так как в процессе регистрации ДА сигнала методом FSCV мы используем электроды разной длины, следовательно, разной чувствительности и как результат мы получаем разный ДА сигнал. Таким образом, необходимо ввести соответствующий калибровочный коэффициент для корректировки полученных данных. Для этого мы используем калибровку электродов *in vitro* в растворе ДА с заданной концентрацией по методу [327]. Установка для калибровки собиралась вручную (рисунок 14) и состояла из блока подачи фосфатного буферного раствора (состав: KCl – 7,45г, KH_2PO_4 – 1,36 г, d. H_2O – 1л; Ph=7,4) и 10 μM раствора ДА. В процессе калибровки электрод опускался в буферный раствор, затем с помощью шприца равномерно в течение 5-10 с подавался раствор ДА (10 μM), затем ДА смывался подающимся из другого шприца тем же буферным раствором. Процедура повторялась вплоть до достижения максимальных значений ДА ответа электрода, которые затем записывались.

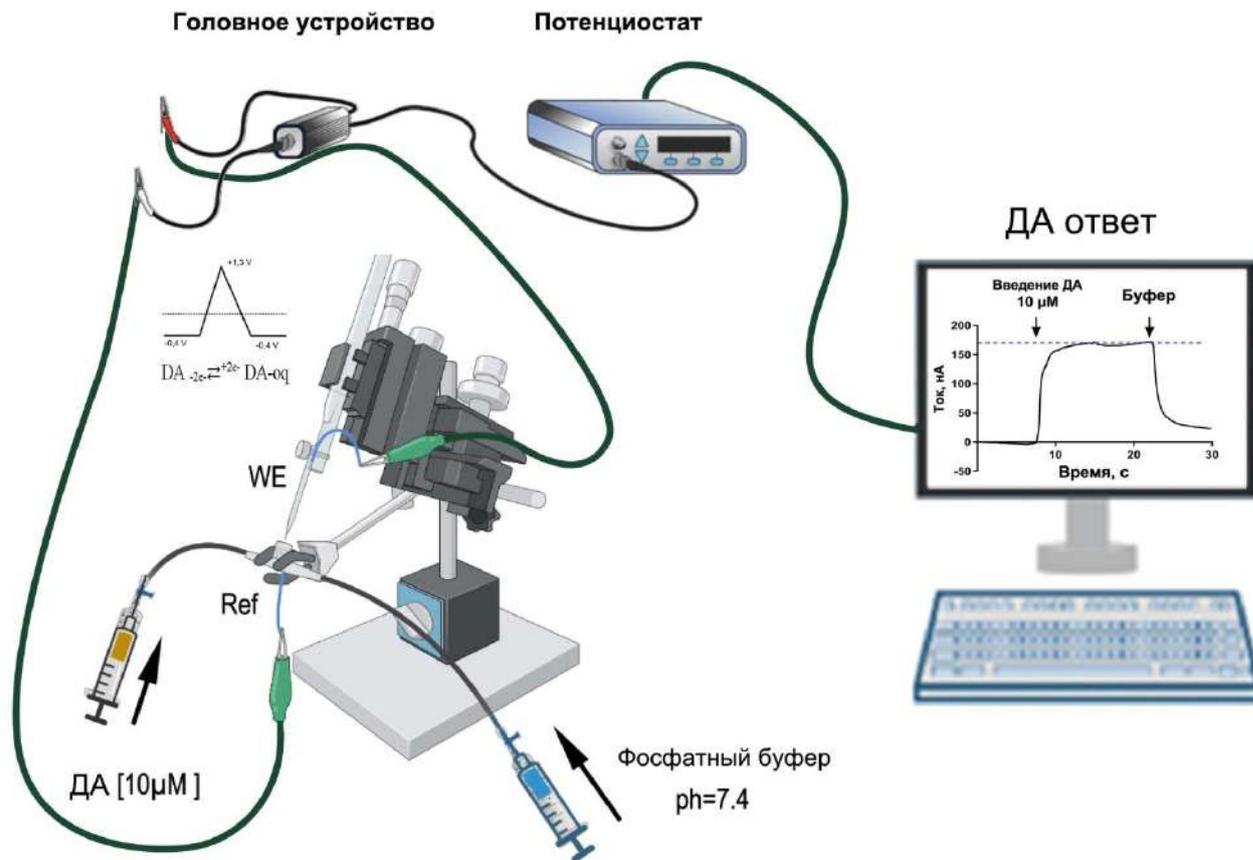


Рисунок 14. Схема калибровочной установки.

На рисунке 14 показано, что растворы (ДА ($10\mu\text{M}$) и фосфатного буфера) подаются в мини отсек, в который опускается калибруемый электрод (WE) с электродом сравнения (Ref) ($\text{Ag}\backslash\text{AgCl}$). Во время калибровки в течение 5-10 с сначала подается раствор ДА, затем смывается с помощью буфера так же в течение 5-10 с. Примечательно, что во время калибровки электроды всегда погружены в буферный раствор для того, чтобы происходили соответствующие электрохимические реакции. На электроды WE и Ref подаются через провода головного устройства (Headstage) и поддерживаются (с помощью потенциостата) соответствующие потенциалы. Для WE используется потенциал треугольной формы, необходимый для детекции ДА -0,4 В до +1,3 В и обратно по сравнению с Ref на который подается постоянный известный потенциал. Данные ДА ответа, получаемые после подачи раствора ДА, за вычетом фона (рисунок 12), поступают на персональный компьютер с установленной программой HDCV. На рисунке показан такой ДА ответ, полученный после калибровки электрода длиной $100\ \mu\text{m}$ (рисунок 14).

На рисунке 15А показан ДА ответ электрода в процессе его калибровки на момент подачи ДА раствора. Значительный ДА ответ может даже в реальном времени менять потенциал

электрода, влияя на процессы окисления\восстановления ДА, значительно сдвигая их в сторону окисления (рисунок 15Б). После нахождения максимального ДА сигнала у данного электрода происходил пересчет значений полученного в нА сигнала в μM и высчитывался калибровочный коэффициент из расчета на 1 μM раствора. То есть если средний ДА ответ у электрода длиной 90 мкм = 233 нА (на раствор в), то калибровочный коэффициент при пересчете на 1 μM – будет 23,3.

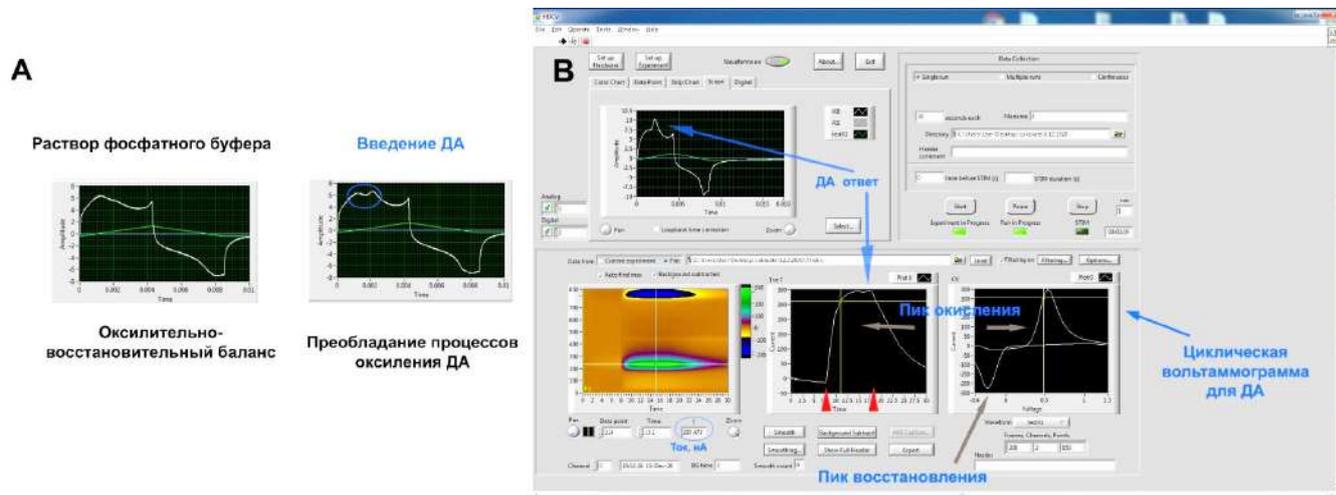


Рисунок 15. Отображение на экране компьютера процесса калибровки электрода. А - изменение формы потенциала в процессе подачи ДА раствора на угольный регистрирующий микроэлектрод до и после подачи раствора ДА. В – Циклическая вольтаммограмма с пиками окисления (+0,6 В) и восстановления (-0,2 В) соответствующими электрохимическим процессам окисления и восстановления ДА, так же на рисунки изображены ДА ответы, показанные на графике и в виде цветовой схемы и ДА ответ, выраженный в цифровом значении тока.

Процедуры стрессорных воздействий

- Острый кратковременный стресс

Для создания острого неконтролируемого стрессорного воздействия использовали процедуру неизбежного плавания в тесте Порсолта (процедура тестирования описана ранее); [43]. В литературе показано использование данной процедуры для моделирования стресса и депрессивно-подобных симптомов [171].

- Острый и субхронический иммобилизационный стресс

Для реализации процедуры острого и длительного неконтролируемого стрессорного воздействия – использовали процедуру однократного (4ч) и длительного иммобилизационного стресса (4 ч/ 5 дней, ежедневно (с 10.00 до 14:00)). Иммобилизацию производили в специальных пеналах. В экспериментах по воздействию субхронического (4 ч/ 5 дней) иммобилизационного

стресса до и после процедуры производили оценку поведенческого и нейрохимического компонента стрессорного ответа [43].

Данные воздействия использовались для моделирования различных компонентов посттравматического стресса, таких как острое стрессорное расстройство – при однократном воздействии (acute stress disorder ASD [328] и депрессии – при многократном воздействии стресса [192,193].

- Стресс повседневности (CMS)

Для моделирования стресса повседневности по П. Вилнеру [170] самцы крыс Вистар (n=80) подвергались различным, ежедневно сменяющимся воздействиям в течение 4-х недель. В нашей работе мы использовали следующие виды: пищевая депривация, водная депривация, наклон клетки на 45 °С, изоляция, скучивание, инверсия светового дня, влажная подстилка. Применение данных воздействий менялось в псевдослучайном порядке для создания неконтролируемости ситуации. Длительность каждого воздействия составляла 24 ч. Все животные подвергались воздействию в одно и то же время [46]. Для купирования депрессивно-подобного состояния, вызванного влиянием CMS использовали антидепрессант бупропион (Aspen Bad Oldesloe GmbH, Германия) в дозе 10 мг/кг веса животного на протяжении 10 дней в.б. Контрольной группе вводили физиологический раствор того же объема [47].

- Процедура однократного стресса социального поражения (ССП)

В экспериментах по воздействию СПП использовали половозрелых самцов Sprague-Dawley (280-330г) в качестве «интродеров», которых ссаживали в клетку к более крупному и агрессивному «резиденту» Лонг Эванс (>350г) для создания устойчивой стрессогенной среды в течение 20-ти минут сеанса СПП [20,34,35]. В течение первых и последних 5-минутных сегментов экспериментального сеанса (20 минут) крысы-резиденты и крысы-интродеры взаимодействовали через проволочную клетку. Данная клетка позволяла только визуальное, слуховое и обонятельное восприятие агрессивного субъекта. В течение последующего 10-минутного сеанса «свободного взаимодействия» защитная клетка удалялась. В это время происходила регистрация длительности всех исследуемых поведенческих элементов (атаки (clinch attack), защитное поведение (defense), замирание (freezing - крыса не двигается), бег (running), исследовательское поведение (exploration), позы подчинения (submission - крыса лежит на спине), другое (other – ходьба или стояние на месте). Контрольным животным в течение 20-ти минут предоставлялась возможность взаимодействовать с особью своего вида, из своей клетки (конспецификом) [41].

- Социальный стресс при остром отравлении органофосфатами (ФОС)

Эксперимент включал измерения фоновых поведенческих показателей и три группы сравнения: группа «стресс» (крысы, находящиеся в одной клетке с подвергнутыми острому отравлению животными), группа РОХ2х (крысам введен параоксон в дозе 0,6ЛД50 через час после введения параоксона в дозе 0,45ЛД50), группа СВРОХ (крысам введен параоксон в дозе 0,6ЛД50 через час после введения СВDP в дозе 3,3 мг/кг). Наблюдения за животными продолжались в течение 8 недель после отравления. Для выявления депрессивно-подобного и посттравматического компонента как у животных, подвергнутых острой интоксикации, так и у находящихся с ними в одной клетке животных группы «стресс» использовали специальную батарею поведенческих тестов, включающих в себя измерение, проводимые через 8 недель после однократного отравления, такие как: когнитивный тест (распознавание нового объекта), тест на депрессивность (тест Порсолта); кроме того тестирования локомоторной и другой активностей проводившегося ежедневно и тестирование в течение 8-ми недель, 18ч в день (см. установка Лаборас).

Статистические методы исследования

Статистическая обработка полученных материалов была проведена в программе GraphPad Prism версии 6.05 – 8. Критерий нормальности Д'Агостино и Пирсона использовался для подсчета того, соответствуют ли значения нормальному Гауссовскому распределению. Для сравнения двух групп использовали непарный двусторонний t-критерий Стюдента (нормальное распределение) или непараметрический U-критерия Манна-Уитни (не нормальное распределение, малые группы). При сравнении трех групп использовали однофакторный критерий One-Way ANOVA (нормальное распределение) или критерий Крускала-Уолиса (не нормальное распределение, малые группы). Для многофакторного сравнения использовали двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Глава 1. Исследование дофаминового ответа с помощью метода вольтамметрии

Вольтамметрия – эффективный метод исследования различных характеристик ДА ответа в зоне прилежащего ядра (NAc) во время электростимуляции зоны VTA. Установка оптимального положения электродов по стереотаксическим координатам: регистрирующего (WE) и стимулирующего (SE) необходима для проведения любых вольтамметрических исследований.

Примечательно, что опускание этих электродов (WE и SE) происходило не сразу, а постепенно для поиска оптимального максимального ДА сигнала в данной области (рисунок 16). В процессе поиска ДА сигнала необходимо правильно выставить электроды, чтобы сигнал был правильной формы и величины, характерной для животных данной группы при верной постановки регистрирующего микроэлектрода. Правильность постановки регистрирующего электрода выявляется с помощью последующей гистологической верификации (рисунок 37 D).

Зависимость ДА сигнала от глубины установки электродов в мозге крыс

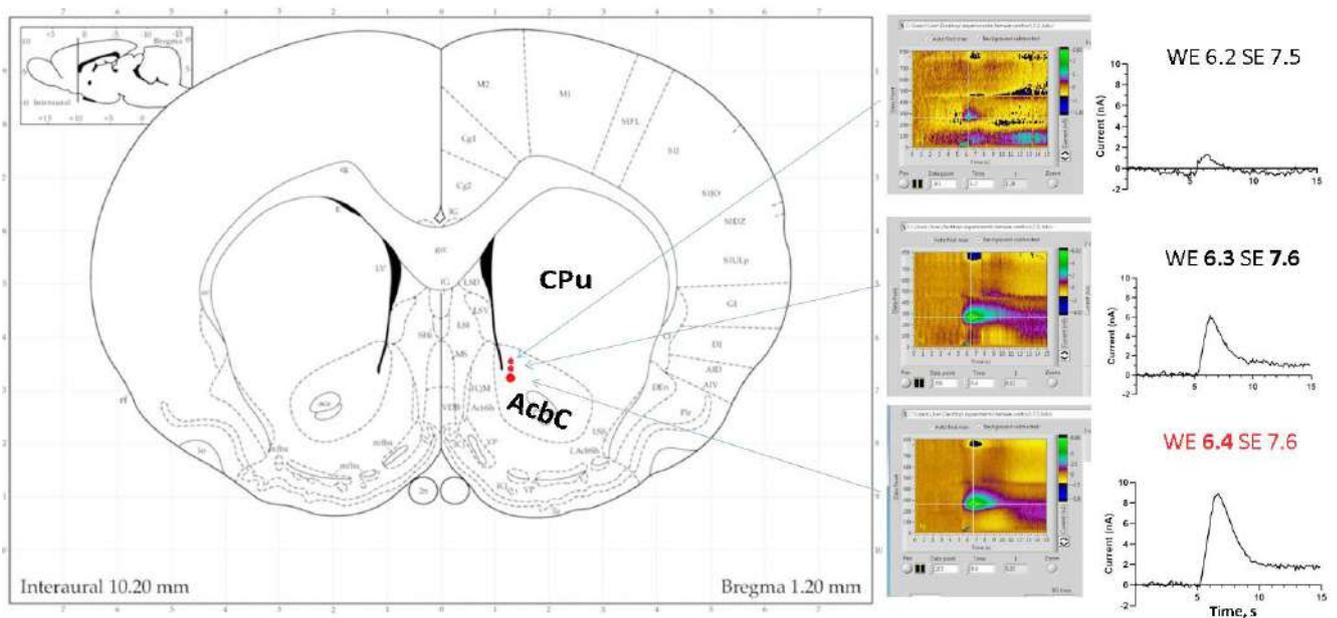


Рисунок 16. Дофаминовый (ДА) ответ нейронов после установки электродов. На рисунке регистрирующий электрод (WE) позиционируют через хвостатое ядро (CPu) в зону прилежащего ядра (AcbC), а стимулирующий (SE) в зону вентральной области покрышки (VTA). Справа графики, отражающие ДА сигналы (схемы и цветное отображение), слева – положение движения WE в стереотаксическом атласе [324].

На рисунке 16 мы можем видеть, что в пределах стереотаксических координат прилежащего ядра можно наблюдать большой разброс сигналов у крыс (группа «контроль»), кроме того, эти сигналы напрямую связаны с глубиной постановки регистрирующего электрода (WE), однако при действии стрессорного раздражителя (группа «стресс») – происходит изменение ДА сигналинга и наблюдается повышение ДА сигнала по всем глубинам в пределах NAc, однако наблюдается большой разброс значений, что вероятно связано с индивидуальной чувствительностью крыс к стрессу.

В нашей лаборатории мы показали зависимость ДА ответа от глубины установки регистрирующего электрода (зоны прилежащего ядра), (рисунок 17).

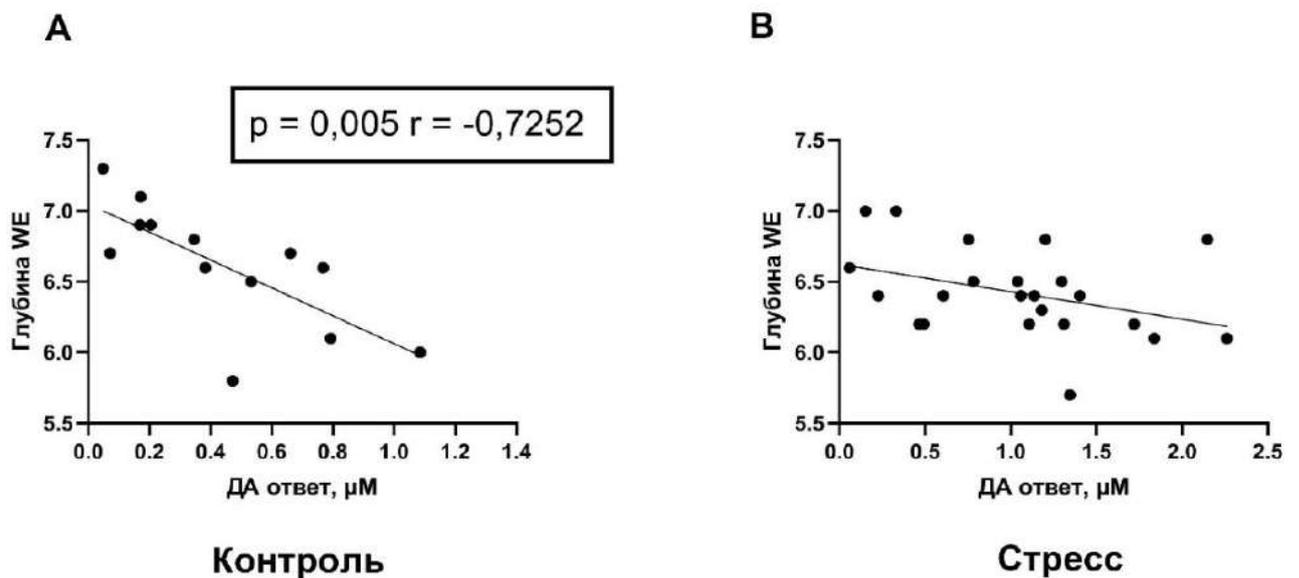


Рисунок 17. Связь ДА ответа и глубины постановки электрода с помощью метода FSCV *in vivo*. По оси X – ДА ответ в μM ; по оси Y – глубина опускания регистрирующего (WE), представленная в мм от мозга. Корреляционный анализ Пирсона.

Кроме того, мы показали зависимость массы крыс от глубины установки электродов (таблица 1). Данная таблица полезна для поиска оптимального ДА сигнала в прилежащем ядре у крыс разной массы.

Масса крысы, г	Глубина WE (от мозга)	Глубина SE (от мозга)
195±6.1 (n=5)	6.2±0	7.8±0.2
248.2±6.5 (n=12)	6.4±0	7.9±0.1

329.9±7.4 (n=11)	6.5±0	8.1±0
------------------	-------	-------

Таблица 1. Зависимость массы животного от глубины опускания электродов. В таблице показаны массы крыс, г, так же даны глубины опускания основных WE (регистрирующего), SE (стимулирующего) электродов, ответственных за появление ДА сигнала (в данном процессе так же играет роль Ref (хлорсеребряный электрод сравнения), однако, глубина опускания данного электрода, не влияет на уровень ДА сигнала.

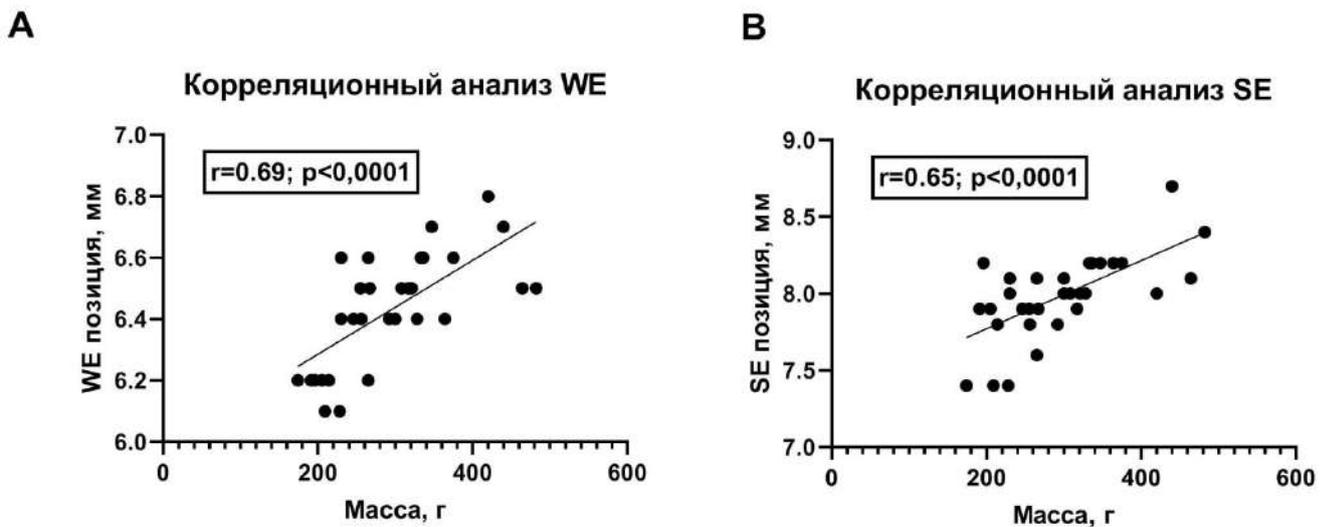


Рисунок 18. Корреляционный анализ Пирсона для крыс Вистар (n=8). По оси X – масса крыс, г; по оси Y – позиция регистрирующего (WE) (А) и стимулирующего (SE) (Б) электродов, представленная в мм от мозга. Метод FSCV in vivo.

В работах нашей лаборатории показана частотная и амплитудная зависимость сигнала в области прилежащего ядра при стимуляции VTA [41,241]. Корреляционный анализ Пирсона для крыс Вистар (n=8) показал положительную корреляцию между ДА ответом и частотой электрической стимуляции ($r=0.904$, $p=0.051$) (рисунок 18).

Ранее линейная частотная зависимость ДА сигнала в зоне VTA была показана в работах родоначальника быстрой сканирующей вольтамметрии М. Уайтмана [245].

В данной работе представлена и частотная и амплитудная зависимость ДА сигнала в зоне NAc при стимуляции зоны VTA с различными характеристиками тока у анестезированных крыс (рисунок 19).

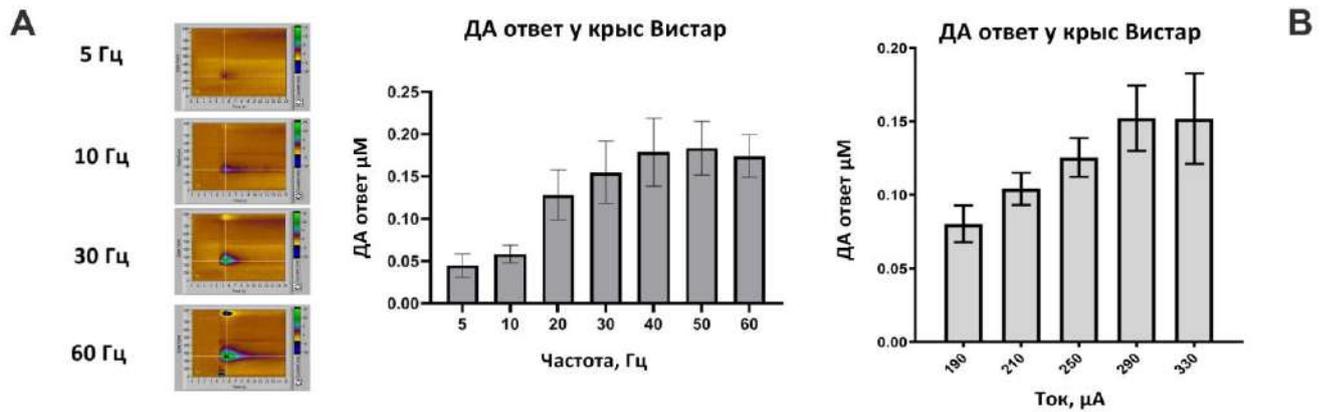


Рисунок 19. Зависимость ДА сигнала от различных характеристик тока. А – Цветовое отображение ДА сигнала. В - ДА ответ у крыс в зависимости от электрической стимуляции разной частоты (5-60 Гц) при силе тока 330 мкА и при разной амплитудной характеристики тока (190-330 μA) при частоте электрического тока 60 Гц.

На рисунке 20 видно, что уровень ДА не зависит от длительности инъекции, однако наиболее точной (с меньшим количеством шума) будет калибровка со стандартной длительностью инъекции 9-10 секунд. На рисунках 20 С и F изображена зависимость ДА ответа от Ph буфера, таким образом буфер с Ph = 7,4 наиболее адекватен для калибровки. На рисунке 20С показана зависимость ДА ответа от длины регистрирующего электрода, обнаружена значительная положительная корреляция ($P < 0.0001$, $r = 0,9$), таким образом ДА сигнал напрямую связан с длиной используемых электродов, однако имея средние величины ДА сигнала при использовании электродов известной длины возможно примерно пересчитать нА в μM по известной формуле без калибровки электрода.

Примечательно, что использование различной ДА концентрации не влияет на положения пиков окисления/восстановления ДА на вольтаммограмме, только на их величины (рисунок 20), однако, при использовании буфера с различным Ph – происходит смещение пиков. Таким образом, Ph среды является важной характеристикой при регистрации ДА ответа. Данное замечание было так же высказано другими авторами [329,330].

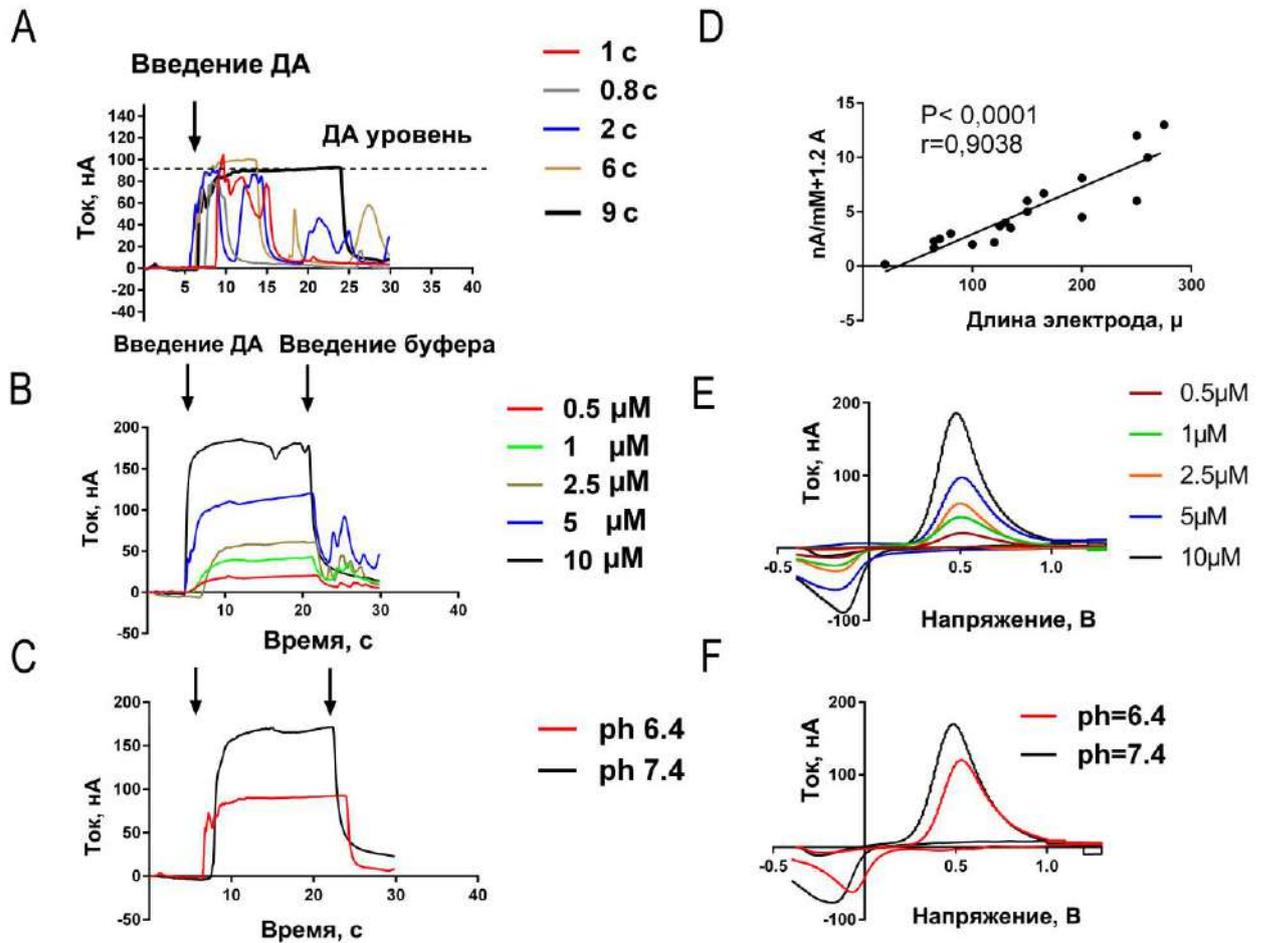
Калибровка регистрирующих электродов (WE) *in vitro*

Рисунок 20. Дофаминовый (ДА) сигнал, нА полученный во время калибровки электродов с различными характеристиками. А - зависимость ДА ответа от длительности инъекции (0,8 – 9 с) ДА раствора с концентрацией 10 μM . В – ДА ответ, полученный при ДА инъекции в течение 10 с. С – ДА ответ при 10 с инъекции ДА с использованием фосфатного буфера различной концентрации. D – зависимость ДА ответа от длины регистрирующего электрода, нМ. Е, F – соответствующие вольтаммограммы при 10 с инъекции ДА.

Зависимость формы ДА сигнала от параметров выброса\обратного захвата ДА

- ДАТ нокауты как модель стереотипного поведения

У крыс и мышей процессы выброса\обратного захвата – находятся в состоянии равновесия, однако у крыс, ДАТ нокауты (КО) с отсутствующим дофаминовым транспортером (ДАТ) и как следствие, значительно сниженным обратным захватом ДА, значения обратного захвата ДА различаются более чем в 20 раз от значений, наблюдаемых у крыс дикого типа (ДАТ WT). Так же крысы-нокауты ДАТ КО в отличие от крыс дикого типа (WT) демонстрируют

выраженную локомоторную и стереотипическую активность в локомоторном боксе $P=0.016$; Unpaired t-test (Рисунок 21).

Как мы знаем из литературных данных, что главной характеристикой фенотипа ДАТ нокаутов является выраженная гиперлокомоция [271] являющаяся причиной практически полного отсутствия обратного захвата ДА у животных ДАТ нокаутов. Повышенная стереотипическая активность часто наблюдается во время стрессорного воздействия у грызунов [44], однако применительно к данной модели, авторы отмечают выраженную стереотипность и компульсивное поведение у животных ДАТ нокаутов [270]. Так как ДА система непосредственно вовлечена в процессы активации стереотипного поведения, что показывают эксперименты с введением амфетамина [278], то такое поведение следовало бы ожидать и у ДАТ нокаутов, что мы и увидели в нашем исследовании. Исследование с помощью вольтамметрии другими авторами показало, что обратный захват у мышей ДАТ нокаутов происходит в 300 раз медленнее, чем у животных дикого типа [271]. Мы исследовали данные процессы у крыс ДАТ нокаутов (КО) и животных дикого типа (WT) с помощью вольтамметрии и поведенческих методик (локомоторные боксы) и получили сходные данные.

Таким образом, мы можем наблюдать, что метод вольтамметрии (FSCV *in vivo*) позволяет наглядно увидеть различие в процессах выброса и обратного захвата у животных (WT и КО), а в сочетании с поведенческими методиками позволяет проследить причинно-следственные связи в поведении животных и их мозговой нейрохимии.

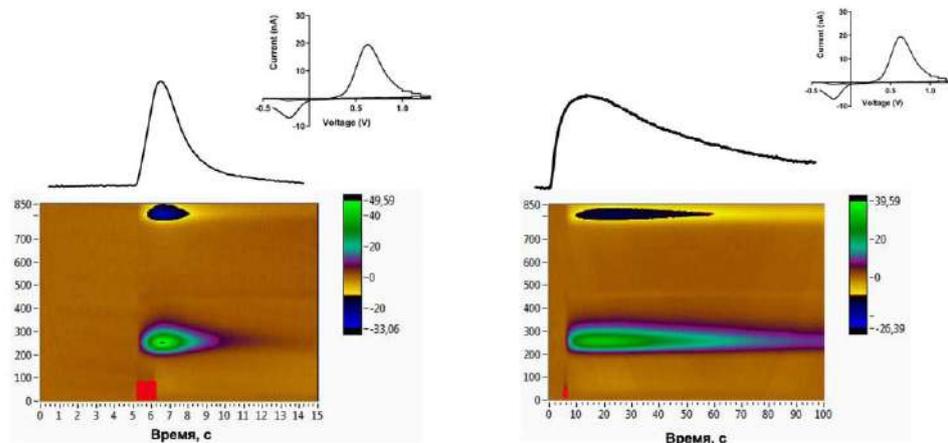
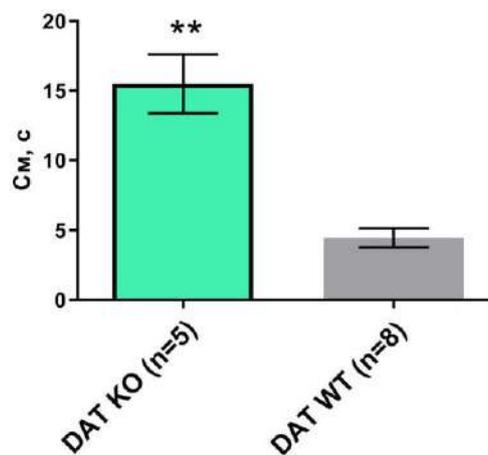
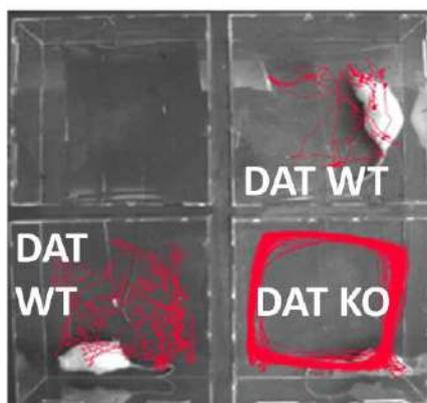
A**Вольтамметрический сигнал****DAT WT****DAT KO****B****Траектория передвижения****Скорость передвижения**

Рисунок 21 Особенности поведения и ДА нейротрансдачи у крыс ДАТ КО и животных дикого типа (WT). А – вольтамметрический ДА сигнал у крыс ДАТ WT (слева) и ДАТ КО (справа) после 1 с электрической стимуляции 330 μ А 60 ГЦ 60 Импульсов (репрезентативное отображение сигнала). В – локомоторная активность крыс в течение 10 минут в локомоторных боксах.

На рисунке 21 наглядно показано, что практически полное отсутствие обратного захвата ДА у крыс нокауты по гену ДАТ, выявленного с помощью метода вольтамметрии, приводит к гиперлокомоции и увеличению стереотипного поведения в отличие от животных дикого типа.

- Сравнение показателей ДА динамики у мышей и крыс в фоне и под влиянием различных фармакологических веществ с использованием метода вольтамметрии

Вольтамметрический сигнал

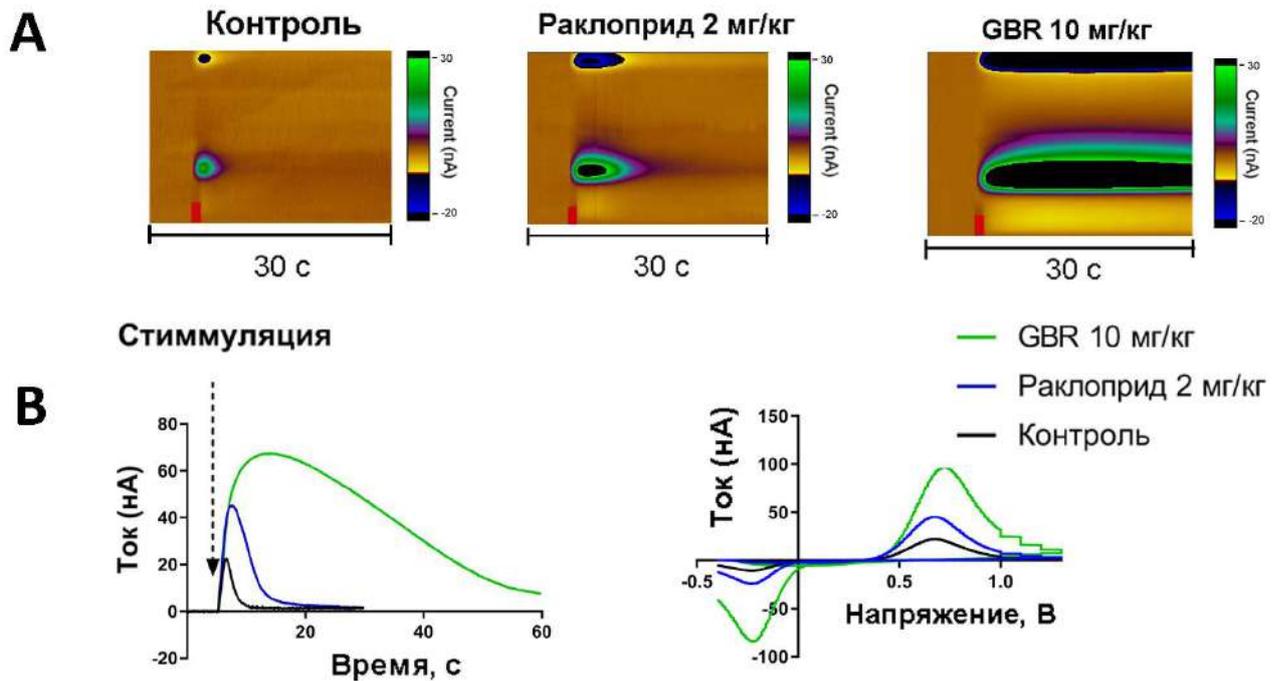


Рисунок 22 Репрезентативное отображения ДА сигнала у мышей после стимуляции VTA (330 мкА, 60 Гц, 60 Импульсов, 1 с) в зоне NAc до и через 10 мин после введения раклоприда 2 мг/кг и через 60 мин после введения GBR 10мг/кг. В части (А) изображены цветные отображения (Color Plots) вольтамметрических сигналов, красный квадрат – начало электрической стимуляции (1 с). В части (В) изображены ДА ответы (нА) и циклические вольтаммограммы у мышей, отображающие основные электрохимические параметры ДА сигнала (пик окисления 0,6 В; восстановления - 0,2 В) в контроле, через 10 мин после введения раклоприда и через 60 минут после введения GBR.

Под действием раклоприда (2 мг/кг) у мышей в 1,5-2 раза увеличиваются параметры выброса ДА без изменений параметров обратного захвата (рисунок 22). Так как раклоприд, являясь D2 антагонистом, временно блокирует D2 ауторецепторы, регулирующие синтез тирозингидроксилазы, то содержание ДА в синапсе – возрастает, что мы можем наблюдать в наших результатах. Под воздействием GBR (10 мг/кг), введенным через 30 мин после введения раклоприда, увеличивается в 4 раза выброс ДА и в 5-6 раз снижается обратный захват ДА у мышей. Так как GBR 12909 временно выключает функции ДАТ, основной механизм, регулирующие обратный захват ДА в синапсе становится временно приостановленным. Из рисунка 23А мы видим, что, однако у крыс – динамика раклоприда сильно отличается от мышью (рисунок 23), даже при одинаковых дозах мы можем наблюдать значительно (Р

<0.0001, двусторонний ANOVA с повторными измерениями) менее выраженный эффект у мышей, в отличие от крыс.

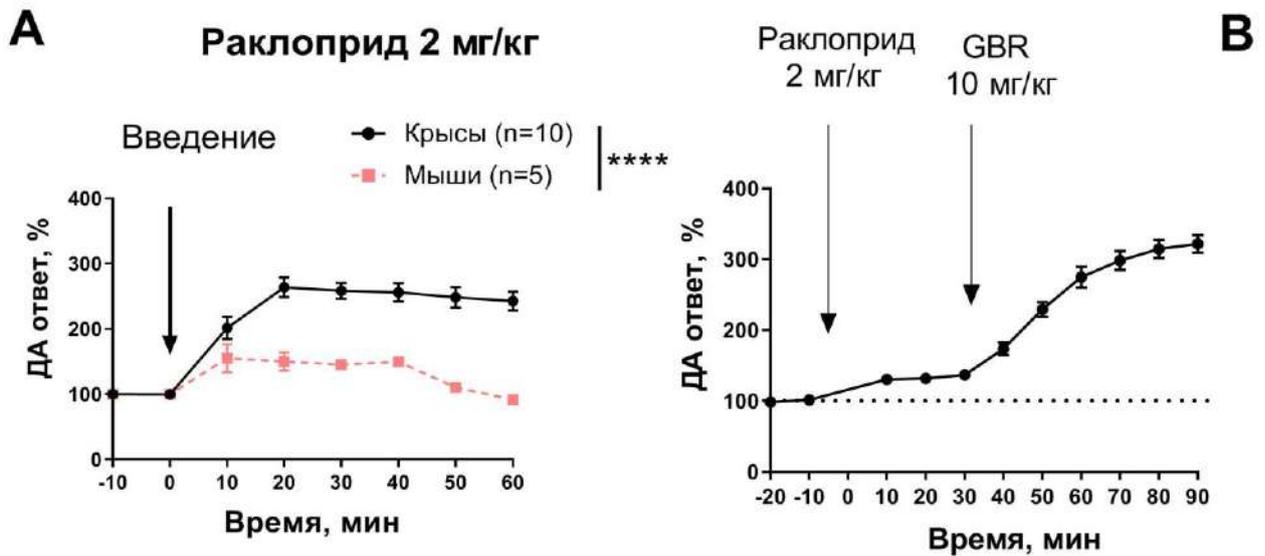


Рисунок 23. Дофаминовый ответ у мышей и крыс после в/б введение раклоприда дозой 2 мг/кг и GBR дозой 10 мг/кг. По оси X – время, в мин. По оси Y – ДА ответ, % от фоновых значений. А – ДА ответ у мышей и крыс после введения раклоприда дозой 2 мг/кг. В - ДА ответ у мышей (n=9) после последовательного введения раклоприда 2 мг/кг и GBR 10 мг/кг. Данные представлены как среднее \pm SEM, двусторонний ANOVA с повторными измерениями; **** - $P < 0,0001$.

По данным литературы раклоприд и GBR 12909 имеют различный эффект при в/б введения грызунам. GBR 12909 по механизму действия является селективным ингибитором обратного захвата ДА действует как кокаин, но более селективно, временно блокируя функции ДАТ. При введении животным обнаружена дозозависимую длительную поведенческую активацию, характеризующуюся увеличением локомоции, стоек, обнюхивание и различными другими стереотипиями при увеличении дозы, показаны «подкрепляющие» различные виды поведения эффекты от введения GBR 12909 [331]. Нейрохимический профиль от введения GBR 12909 при использовании средних и высоких доз, сходен с профилем ДАТ нокаут, что показали исследования вольтамметрии и микродиализа [246,332], однако при внутривенном введении даже меньшие дозы приводят к длительной инактивации ДАТ у крыс [333]. Раклоприд же действует как селективный антагонист D2 аторецепторов, так же увеличивая ДА концентрации в синаптической щели, однако не влияя на ДАТ, что было показано и методами микродиализа и вольтамметрии [41,332,334], по механизму действия раклоприд более селективен чем галоперидол и так же имеет антипсихотический эффект [334].

В нашем исследовании на мышах GBR 12909 вводили через 30 мин после введения раклоприда, в то время как раклоприд уже переставал действовать на ДА ответ у мышей, так же была группа мышей и крыс без GBR 12909, но с раклопридом. Таким образом, мы смогли исследовать действие GBR 12909 и раклоприда по отдельности методом вольтамметрии и так же как и в статьях проф. Е.А. Будыгина, приводимых на крысах в дозе 20 мг/кг [246], мы показали значительное и стойкое (до 2-х часов) увеличение ДА ответа под действием GBR 12909. Однако, в нашем исследовании мы использовали дозу в 2 раза меньше (10 мг/кг) чем в исследованиях проф. Е.А. Будыгина и другой вид животных (мыши) и, следовательно, увидели чуть менее выраженное увеличение ДА ответа (300% а не 500%), однако мы так же получили значительное увеличение ДА ответа через 60 мин после введения. Так же, мы обнаружили значительные ($P < 0,0001$) межвидовые различия в ДА ответе при введении раклоприда в рабочей дозе (2 г/кг) между мышами и крысами. Требуются дополнительные исследования другими методиками, что выявить причинно-следственную связь таких изменений, в такое изменение ДА ответа свой вклад могла ввести разная чувствительность крыс и мышей к раклоприду данной дозировки, так же различное распределение D2 ауторецепторов в районе прилежащего ядра мозга крыс и мышей.

Таким образом, исходя из этих двух исследований, мы можем заключить, что метод вольтамметрии (FSCV *in vivo*) является надежным методом, который эффективно используется для регистрации мгновенного внеклеточного ДА ответа у грызунов. С помощью данного метода так же можно исследовать ДА нейротрансмиттерную передачу в прилежащем ядре у ДАТ нокауты и других животных с измененной ДА нейротрансмиттерной передачей, так же осуществлять фармакологические манипуляции, влияющие на уровень мозгового ДА. Однако для такой регистрации следует учитывать различные электрохимические особенности используемых материалов, так же сложности хирургических и стереотаксических манипуляций. Наиболее эффективно использовать метод вольтамметрии в сочетании с поведенческими методиками для выявления причинно-следственных связей между мозговой нейробиологией и поведенческой активностью, что будет так же отражено в следующих главах диссертации.

Глава 2. Исследование нейрохимических основ алкогольного и агрессивного поведения

Исследование алкогольного потребления у крыс Вистар

Для создания алкогольной зависимости использовался протокол с приучением крыс Вистар (n=10) к сладкому раствору и затем к спиртовому раствору (см. тест «алкогольное спаивание в разделе «методы»). Для этого был использован стандартный двухбутылочный тест. В одной бутылки находилась вода, а в другой - раствор сахарозы (10%), который в течение 2,5 месяцев постепенно заменялся на 10% раствор этанола. Предъявление растворов и измерение параметров потребления происходило 2 раза в неделю. После достижения стабильных параметров потребления раствора этанола 10% была применена процедура однократного социального стрессорного воздействия (ССП), описанной ранее (рисунок 24).

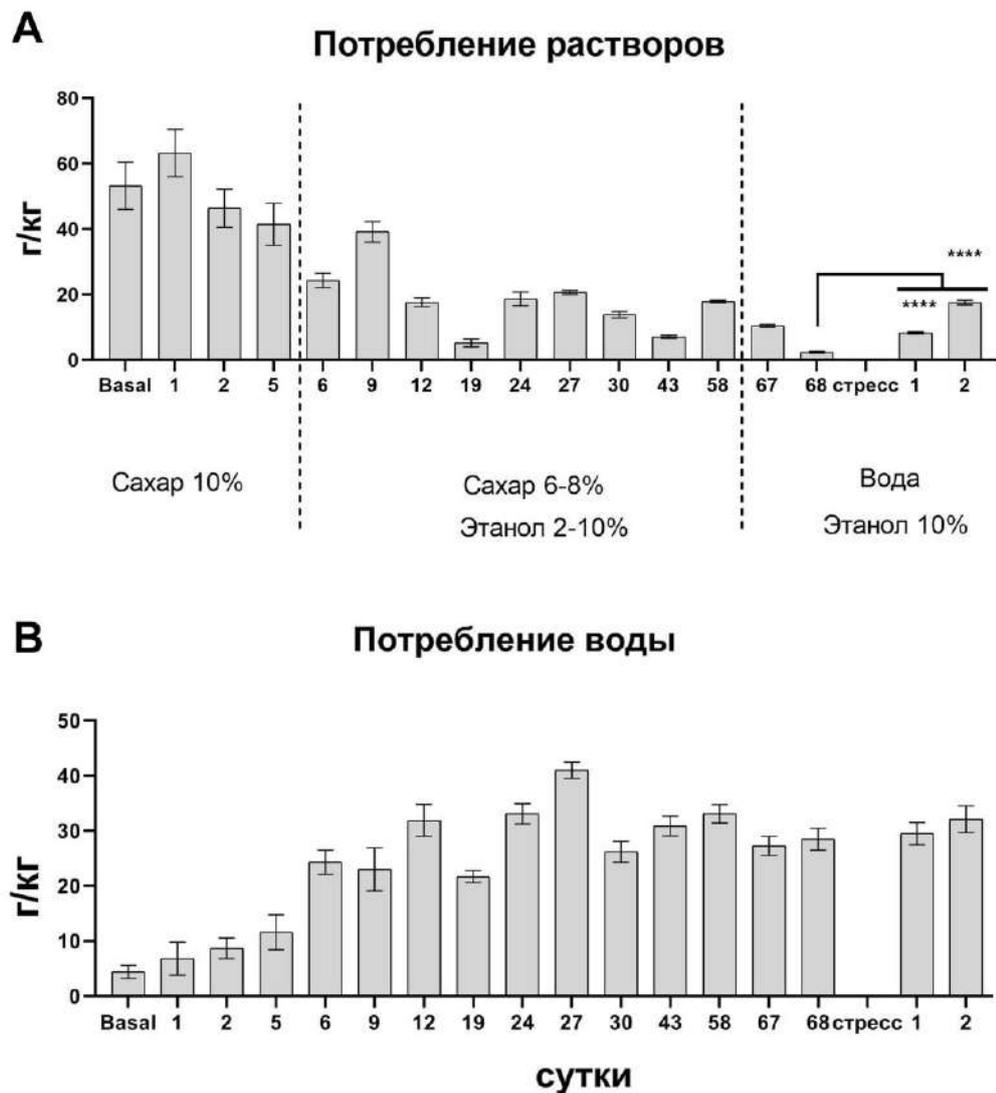


Рисунок 24. Потребление растворов крысами Вистар (n=10) в течение 70 дней с использованием двухбутылочной схемы. В процессе алкоголизации крыс раствор 10% сахара постепенно

заменялся 10% раствором этанола/вода. На рисунке А показано потребление растворов (сахара/спирта) у животных в течение 68 дней, затем 2-х дней после однократного ССП. На рисунке В – потребление воды. По оси X – время эксперимента, сут., по оси Y – потребление растворов, г. Данные потребления растворов пересчитаны на кг веса животного. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; Непарный t-тест; **** - $P < 0.0001$.

После достижения стабильных параметров потребления раствора этанола 10% (рисунок 24) была применена процедура однократного социального стрессорного воздействия. Было обнаружено значительное достоверное увеличение (Непарный t-тест; $P < 0.0001$) потребления 10% спирта у животных в течение 2 суток после ССП по сравнению с значениями за сутки до стресса. Не обнаружено достоверных различий в потреблении воды крысами до и после стрессорного воздействия. Так же было показано, что предпочтение раствора этанола снижается у крыс со снижением концентрации сахара в растворах.

В результате проведенного исследования мы можем заключить, что крысы Вистар эффективно подвергаются алкогольному спаиванию, что так же было показано в литературе [335]. Как показали различные исследования на животных, стресс может служить триггером к увеличению потребления алкоголя [35], что так же было показано в наших данных.

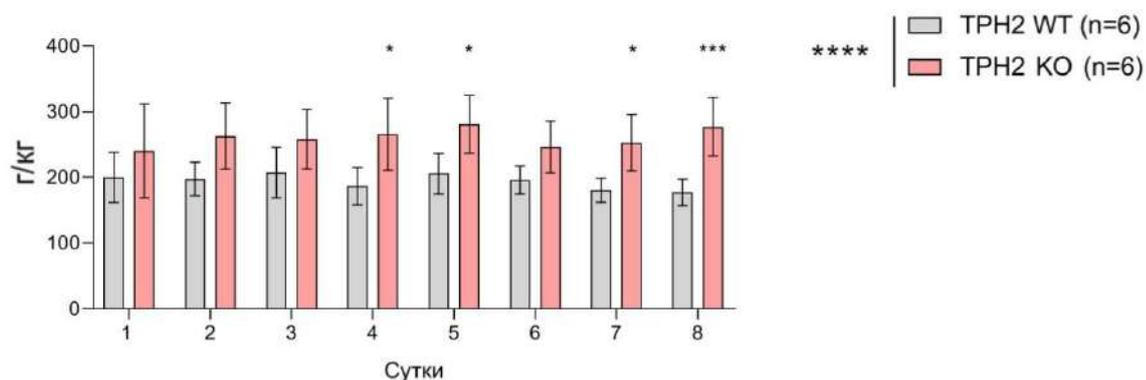
Таким образом, по результатам данного эксперимента, однократный социальный стресс провоцирует алкогольное потребление у самцов крыс Вистар.

Исследование потребление сладких растворов крысами нокаутами по гену TRH2

В течение 8-ми дней у животных TRH2 KO и WT ($n = 6$ в группе) производили измерение потребления раствора 10% сахара по сравнению с водой в парадигме двухбутылочного теста. Было показано достоверное (Two-way ANOVA, $F(1, 40) = 65,77$; $P < 0,0001$, повторяющиеся измерения) увеличенное потребление сладких растворов и менее выраженное увеличенное потребление воды (Two-way ANOVA, $F(1, 40) = 8,671$; $P = 0,0054$, повторяющиеся измерения) у животных TRH2 KO по сравнению с диким типом (WT). На первые сутки животные TRH2 KO по сравнению с WT достоверно больше пьют воды (Two-way ANOVA, $P = 0,04$; множественные сравнения Сидака), однако на следующие сутки, вероятно из-за снижения неophobia и увеличения привыкания к сладким растворам, происходит увеличение потребления уже сахара животными TRH2 KO по сравнению с WT. Крысы TRH2 KO по сравнению с диким типом достоверно больше пьют раствор сахара 10%, на 4-е, 5-е и 7-е сутки (Two-way ANOVA, $P \leq 0,02$; множественные сравнения Сидака), на 8-е сутки эти различия между животными TRH2 KO и WT в потребления сладких растворов достигают максимальных значений (Two-way ANOVA, $P = 0,0009$; множественные сравнения Сидака) (рисунок 25).

A

Динамика потребления 10% раствора сахарозы



B

Динамика потребления воды

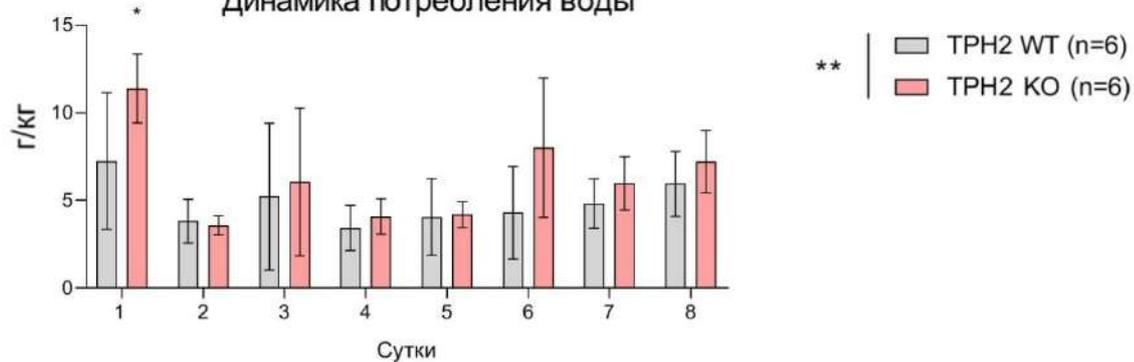


Рисунок 25. Результаты двухбутылочного теста (сахароза 10%/вода) у крыс TPH2 KO и WT. Графики потребления (A) раствора сахарозы (10%) и воды (B) животными TPH2 KO и WT в течение 8-ми суток. Ось X – время потребления, сут., ось Y – потребление растворов, г раствора/кг веса животного. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; * - $P \leq 0,04$; ** - $P = 0,005$; *** - $P = 0,0009$; **** - $P < 0,0001$; Two-way ANOVA.

Исследование алкогольного потребления у животных нокаутов по гену TRH2 до и после стресса

Для создания алкогольной зависимости у крыс TRH2 KO и WT использовали стандартный протокол с приучением крыс к сладкому, затем к спиртовому раствору (см тест «алкогольное спаивание в разделе «методы»). После приучения крыс к алкогольному потреблению (8% этанол + сахар 2%) / вода, животные были подвергнуты процедуре острого неконтролируемого стресса (ОНС) - (4 ч иммобилизационный стресс).

В течение 100 дней алкогольного потребления крысы TRH2 KO оказались более подвержены алкоголизации, в отличие от животных дикого типа, что выражалось в характеристиках предпочтения сахарно-спиртовых растворов ($P=0,03$; Two-way ANOVA) и общего потребления сахарно-спиртовых растворов ($P<0,0001$; Two-way ANOVA) (рисунок 26) и в потреблении корма ($P=0,008$; Two-way ANOVA) (рисунок 28). Наблюдалось достоверное увеличение ($P=0.03$; Two-way ANOVA; множественные сравнения Сидака) в потреблении раствора сахара 10% на 6 сутки крысами KO по сравнению с WT (рисунок 27).

В результате действия стресса (ОНС) у животных нокаутов по гену TRH2 (KO) в отличие от дикого типа (WT) наблюдалось увеличение предпочтения спиртового раствора (8% спирт 2% сахар) на 2-е и 3-е сутки ($P=0.008$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) после стресса по сравнению со значениями до стресса (рисунок 26).

Так же, у крыс TRH2 KO на 1-е ($P=0.031$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни), 2-е ($P=0,0159$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) и 3-е сутки ($P=0,0079$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) сутки после стресса, так же на 3-е сутки у крыс WT ($P=0,0152$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) более выражено потребление спиртового раствора (8% спирт 2% сахар) по сравнению со значениями до стресса (рисунок 26).

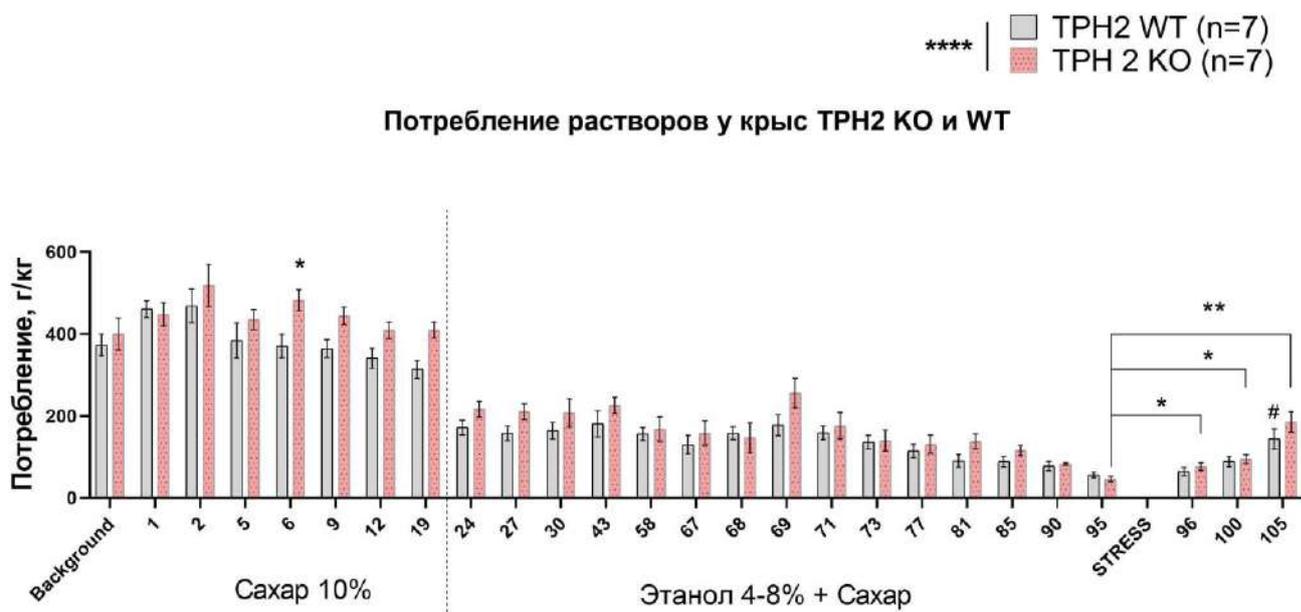


Рисунок 26. Результаты потребления растворов крысами TPH2 KO и WT. Ось X – потребления растворов животными TPH2 KO и WT, сут.; ось Y – потребление сахарно-спиртового раствора воде, г/кг. Расчет потребления растворов производили по формуле (потребление раствора, г/масса крысы, кг \times 1000). Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. Данные KO (* - $P \leq 0.03$; ** - $P = 0,0079$) и WT (# - $P = 0,0152$) по сравнению со значениями до стресса (95 сутки); непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Не наблюдалось статистически значимых изменений в потреблении воды (рисунок 27) между крысами TPH2 KO и WT, однако стресс (ОНС) вызвал значительное снижение потребления корма (рисунок 28) у животных обеих групп: WT ($P = 0,0022$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) и KO ($P = 0,0079$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни) на 1-е, 2-е и 3-е сутки после ОНС.

Потребление воды у крыс ТРН2 КО и WT

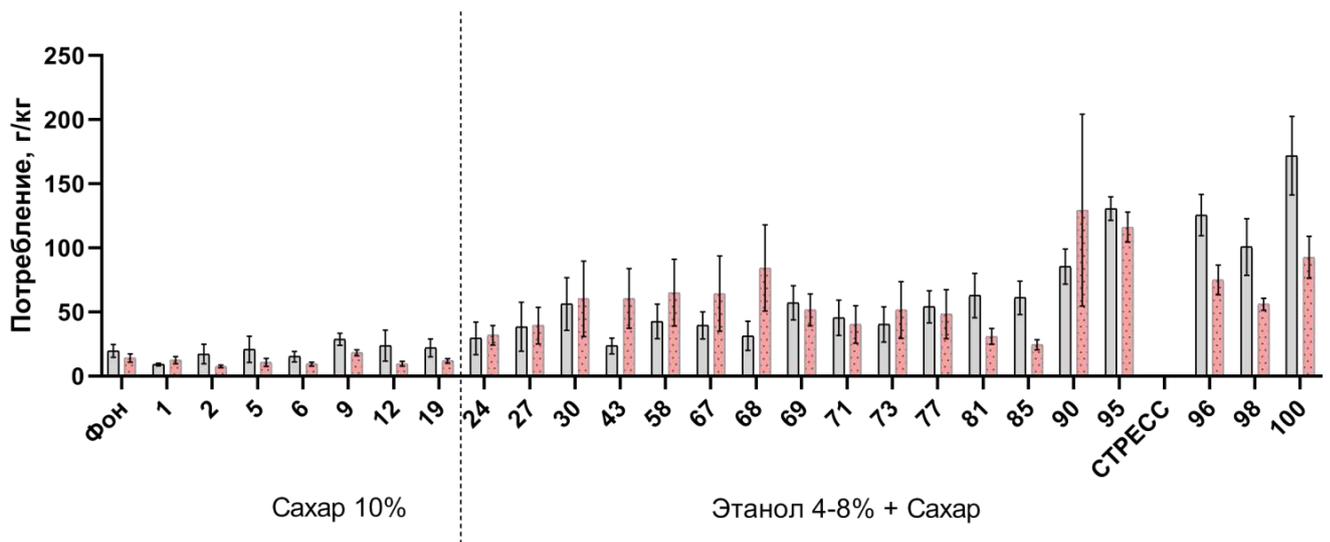


Рисунок 27. Результаты потребления воды крысами ТРН2 КО и WT. Ось X – потребления воды животными ТРН2 КО и WT, сут.; ось Y – потребление воды, г/кг. Расчет потребления воды производили по формуле (потребление воды, г/масса крысы, кг \times 1000). Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего.

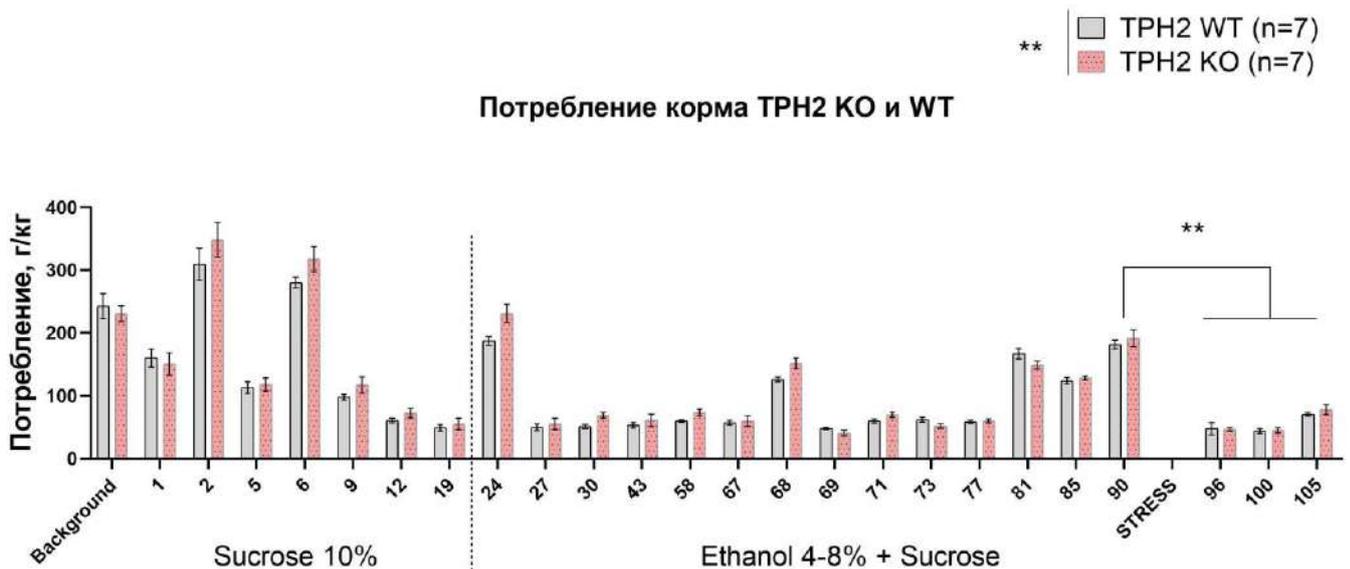


Рисунок 28. Результаты потребления корма крысами ТРН2 КО и WT. Ось X – потребления корма животными ТРН2 КО и WT, сут.; ось Y – потребление корма, г/кг. Расчет потребления корма производили по формуле (потребление корма, г/масса крысы, кг \times 1000). Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. Данные КО и WT на 1,2,3 сутки после стресса по сравнению со значениями до стресса (95 сутки) ** - $P \leq 0,008$; непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Различий в изменении массы тела на протяжении всего алкогольного потребления между группами КО и WT и до и после стресса не наблюдалось (рисунок 29), однако, в процессе потребления 10% раствора сахара, а затем сахарно-спиртового раствора (6% сахар/ 4% спирт) наблюдалось статистически значимое снижение массы тела в течение первых 30-ти дней исследований (Two-way ANOVA; $F(15, 159) = 1,899$; $P=0,0268$) у животных КО по сравнению с WT, вероятно из-за процесса активного потребления сладкого спиртового раствора.

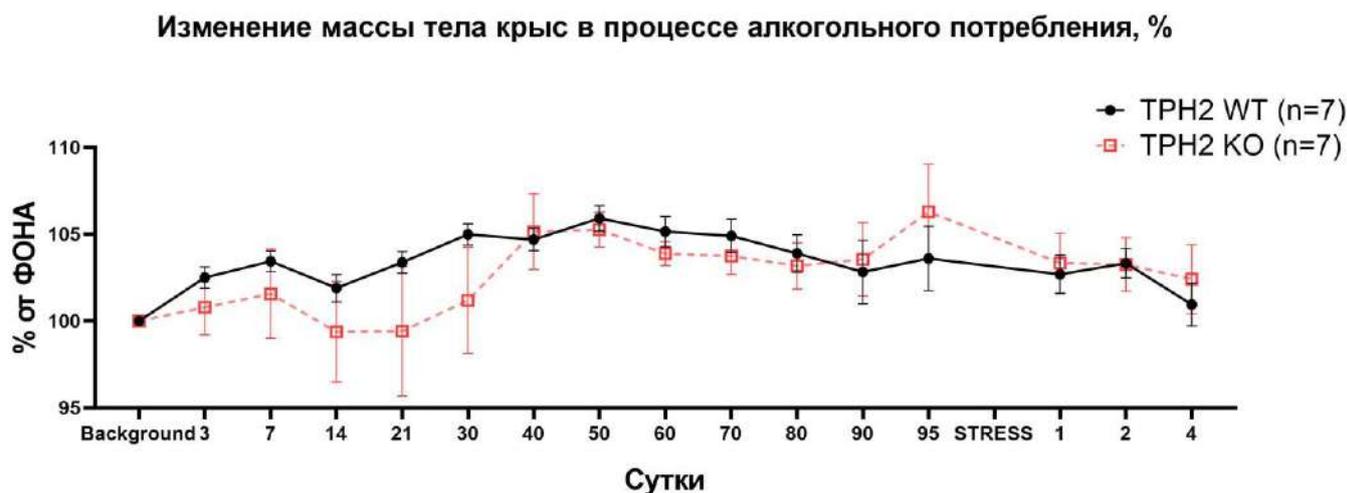


Рисунок 29. Динамика изменения массы тела крыс TRH2 КО и WT в процессе алкогольного потребления. Ось X – изменение массы тела животных, в отличие от фоновых значений, принятых за 100%. Ось Y – время, сут. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего. * - $P = 0,0268$, Two-way ANOVA.

Таким образом, можно заключить, что крысы нокауты по гену TRH2, по сравнению с диким типом значительно в большей степени подвержены алкогольной зависимости. Однократный иммобилизационный стресс повлиял на всех животных, в особенности на 3-е сутки после стресса, однако стресс-индуцируемый алкоголизм в большей степени развился у животных TRH2 КО по сравнению с диким типом. Данные изменения, возможно, связаны с нейрохимическими особенностями TRH2 КО, которые будут описаны в следующей главе.

Исследование ДА нейротрансмиссии у крыс TRH2 нокаут

Исходя из полученных данных (рисунок 30) мы можем заключить, что у крыс TRH2 KO в отличие от крыс дикого типа не наблюдается различий в функционировании D2 ауторецепторов в зоне прилежащего ядра. Отсутствуют различия в параметрах ответа/обратного захвата ДА в зоне прилежащего ядра при тонической и фазической электростимуляции VTA. Однако, обнаружено достоверное снижение времени восстановления мезолимбического ДА после длительной электрической стимуляции ($P = 0.0349$, двусторонний дисперсионный анализ с повторяющимися измерениями). Данные нейрхимические различия, наряду со значительными различиями в СЕР нейротрансмиссии (более 80% отсутствия СЕР нейротрансмиссии в мозге у крыс TRH2 KO), могут отражать поведенческие отклонения, которые показаны в последующих главах.

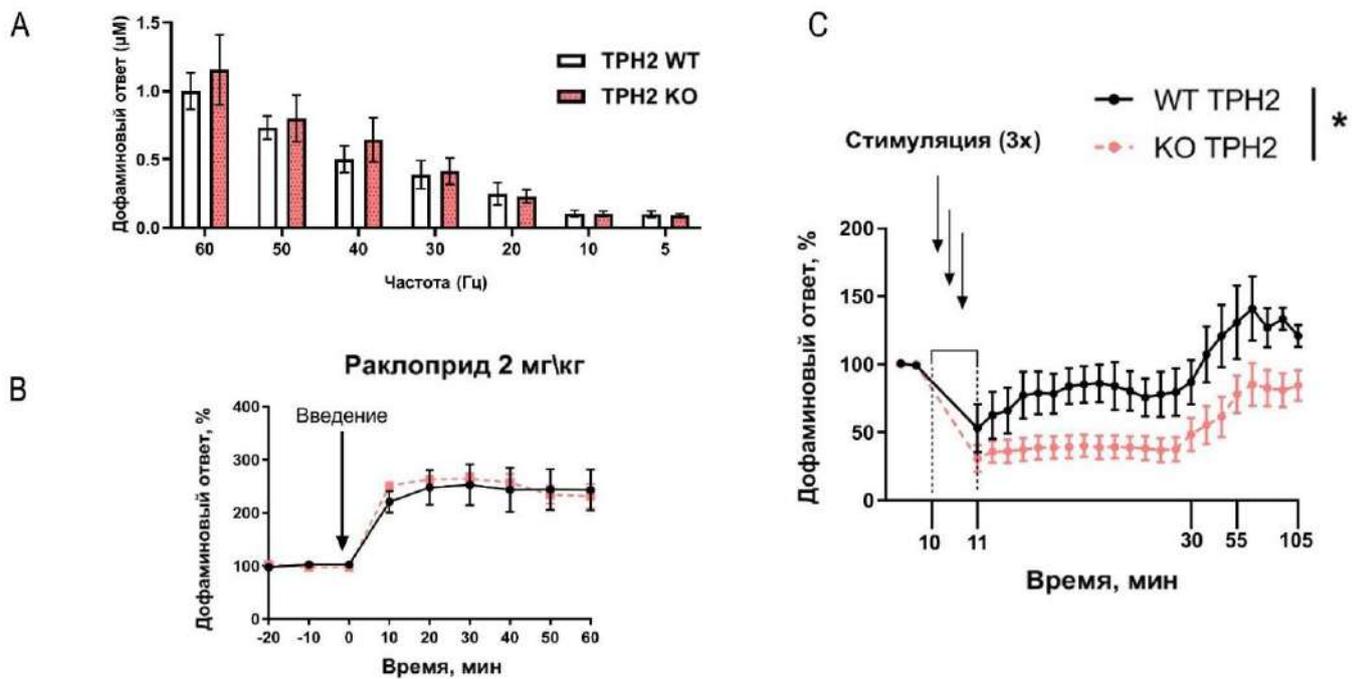


Рисунок 30. Особенности мезолимбической дофаминовой (ДА) нейротрансмиссии у крыс TRH2 нокаут (KO) ($n=7$) и крыс дикого типа (WT) ($n=7$). (A) – ДА сигнал в NAc в зависимости от стимуляции VTA с различной частотой тока у крыс KO и WT. Параметры электростимуляции VTA (1 с, 5–60 Гц, 5–60 импульсов, ток 330 мкА, интервал между стимуляциями 10 мин). (B) – ДА сигнал в NAc до и после введения раклоприда 2 мг\кг в\б. (C) – Процедура ДА истощения/восстановления ДА после 3-х длительных стимуляций (60 Гц 600 импульсов, 10 сек). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, двусторонний дисперсионный анализ с повторяющимися измерениями; * - $P = 0.0349$.

Особенности агрессивного поведения у крыс TRH2 нокаутов

В процессе агрессивного взаимодействия крыс TRH2 нокаутов с крысами Вистар наблюдались следующие паттерны поведения, представленные ниже (рисунок 31). Примечательно, что атаки с наибольшей агрессивностью (violent attacks) – с укусами, наблюдались только у самцов крыс-резидентов, нокаутов по гену TRH2.

Обнюхивания



Псевдо-ссадки



Груминг



Стойки



Угрозы/провокация атаки



Замирание

Атаки, завершающиеся подчинением



Рисунок 31. Поведенческие элементы крыс нокаутов по гену TRH2 (KO) и крыс дикого типа (WT), выступающих в качестве резидентов процессе взаимодействия с крысами Вистар, выступающих в качестве интродуров в парадигме теста стресс социального поражения (ССП).

Исходя из данных таблицы 2 и рисунка 32, самки-резиденты дикого типа, по сравнению с самцами-резидентами дикого типа, демонстрируют значительно ($P \leq 0.0001$; Манн Уитни непараметрический тест) большую социальную исследовательскую активность (обнюхивание оппонента), однако различий между группами нокаутов и группами дикого типа по данному показателю не наблюдалось, напротив, в показателях исследования пространства (стойки) обнаруживается различие между группами нокаутов и диким типом у самцов-резидентов ($P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни) и самок-резидентов ($P \leq 0.003$; параметрический непарный т-тест); значительно снижено время груминга ($P = 0.0008$; непараметрический тест Манна Уитни) у самцов-нокаутов по сравнению с самцами дикого типа. Изменений во времени груминга в группах самок (КО/WT) – не наблюдалось. Вероятно, наблюдаемые различия в параметрах груминга объясняются высоким уровнем стресса во время агрессивных взаимодействий между самцами - крысами нокаутами - резидентами и самцами дикого типа - интродерами (рисунок 32). Действительно, самцы TRH2 КО по суммарным показателям атак (рисунок 32), достоверно более агрессивны, чем самки TRH2 КО ($P = 0.054$; непараметрический тест Манна Уитни), однако, все крысы TRH2 КО намного агрессивнее, чем крысы-самцы ($P = 0.0017$; непараметрический тест Манна Уитни) и особенно чем самки ($P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни) дикого типа.

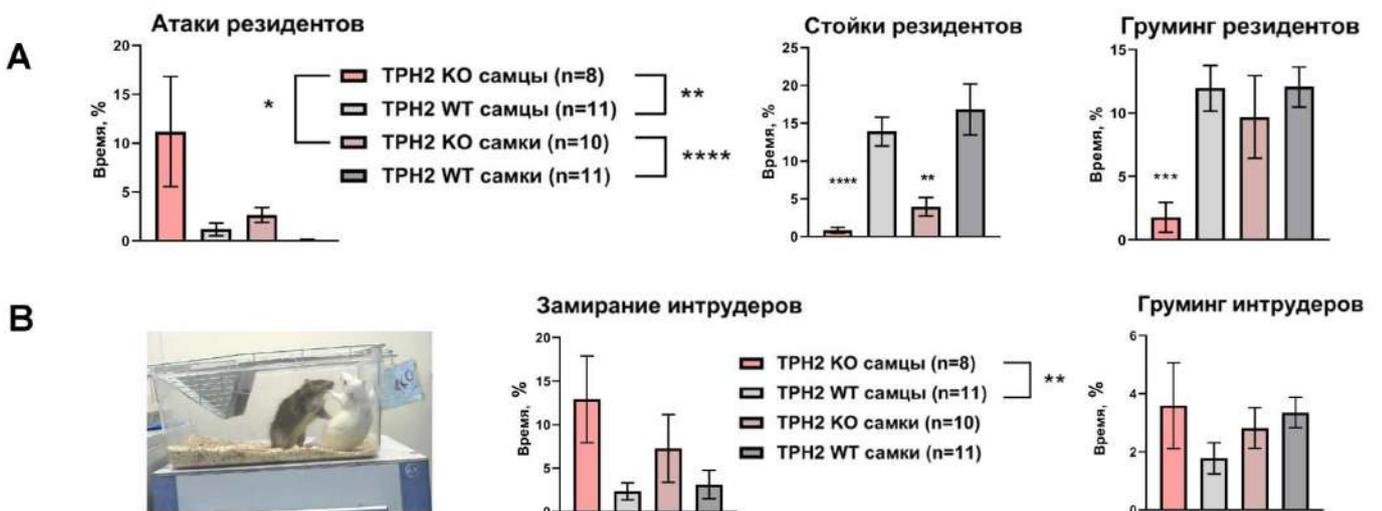


Рисунок 32. Поведение крыс TRH2 КО и WT, выступающих в качестве резидентов (А) и крыс Вистар, выступающих в качестве интродеров (В) во время взаимодействия с резидентами крысами TRH2 КО и WT в течение 10 мин в тесте стресс социального поражения (ССП). Данный рисунок является дополнением к таблице 2 и дублирует некоторые ее данные. На рисунке представлены такие поведенческие элементы как: атаки (слабая атака + мощная атака + псевдосажки), груминг, стойки, замирение. Ось X – группы животных. Ось Y – время, %. Данные

представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. * - $P = 0.054$; ** - $P \leq 0.003$; **** - $P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный т-тест.

Группы животных	Поведенческие элементы у крыс-интродеров, в течение 10 мин агрессивного взаимодействия в тесте ССП с крысами-резидентами											
	Обнюхивание %	Стойки %	Грумминг %	Атака слабая %	Атака мощная %	Атака мощная п	Бег %	Замирание %	Защита %	Псевдосадки %	Подчинение %	Другое %
Самцы ТРН2 КО (n=8)	9.0 \pm 3.0	0.9 \pm 0.4	1.8 \pm 1.2	2.9\pm1.3 **	8.2\pm5.8 **	3.5\pm1.1 **	0.8 \pm 0.6	0.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	74.8 \pm 4.6
Самцы ТРН2 WT (n=11)	6.0 \pm 1.0	13.9\pm1.9 ****	12.0\pm1.8 ***	0.5 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	0 \pm 0	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.9	0.7 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2	64.1 \pm 3.1
Самки ТРН2 КО (n=10)	17.0 \pm 2.4	4.0 \pm 1.2	9.7 \pm 3.26	2.5\pm0.8 ****	0.1\pm0.1 *	0.4\pm0.2 *	0.5 \pm 0.3	2.1 \pm 1.2	3.9 \pm 2.1	0.2 \pm 0.1	0.8 \pm 0.4	59.2 \pm 3.1
Самки ТРН2 WT (n=11)	16.6\pm1.3 ****	16.8\pm3.4 **	12.1 \pm 1.6	0.1 \pm 0.1	0 \pm 0	0 \pm 0	0.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.5	0.3 \pm 0.3	0 \pm 0	1.6 \pm 0.6	52.1 \pm 2.5

Таблица 2. Поведенческие элементы: обнюхивание оппонента, стойки, груминг, слабые провоцирующие атаки (слабые укусы, толчки), мощные атаки (клинч атака, атака с укусом), бег, замирание, защитное поведение, псевдосадки, позы подчинения, другое поведение (ходьба, стояние на месте и др.) у крыс ТРН2 КО и WT, выступающих в качестве резидентов процессе 10 мин взаимодействия с крысами Вистар, выступающих в качестве интродеров в парадигме теста стресс социального поражения (ССП). Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. * - $P \leq 0.03$; ** - $P \leq 0.03$; *** - $P = 0,0008$; **** - $P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный т-тест.

Если детально исследовать агрессивные взаимодействия между группами животных КО/WT, выступающих в качестве резидентов в тесте ССП, то можно отметить, что у нокаутов по гену ТРН2 было обнаружено увеличение ($P = 0.0032$; непараметрический тест Манна Уитни) в

показателях слабых провоцирующих атак у самцов и самок крыс ТРН2 КО ($P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни), так же увеличение времени мощных атак у самцов ($P = 0.001$; непараметрический тест Манна Уитни) и самок ($P = 0.028$; непараметрический тест Манна Уитни) и количества мощных атак у самцов ($P = 0.001$; непараметрический тест Манна Уитни) и самок ($P = 0.035$; непараметрический тест Манна Уитни) крыс ТРН2 нокаутов по сравнению с соответствующими животными дикого типа.

Агрессия ТРН2 КО - резидентов провоцирует достоверное увеличение параметров замирания у самцов крыс-интродеров ($P = 0.0063$; непараметрический тест Манна Уитни) по сравнению с резидентами-дикого типа (рисунок 33), что свидетельствует о высоком уровне стресса у крыс-интродеров во время столкновения с агрессивными самцами ТРН2 нокаутами в отличие от столкновения с менее агрессивными самцами дикого типа.

Как показали эксперименты с использованием животных моделей, демонстрирующих агрессивное поведение, дисфункция или низкий уровень мозгового СЕР (часто наряду с гиперфункцией ДА системы) приводит к проявлению импульсивной агрессии [215,336]. СЕР играет ингибирующую роль в проявлении агрессивного или зависимого поведения [336], так как же в литературе показано, что применение СИОЗ или Д2 агонистов, снижает агрессивное и алкогольное поведение [260,336]. У мышей ТРН2 КО, показано значительное (до 10 раз) увеличение импульсивной агрессии в тесте резидент-интродер, так же сниженную тревожность и высокую депрессивность [337].

В нашем исследовании мы так же продемонстрировали 10-ти кратное увеличение количества атак у самцов крыс ТРН2 нокаутов (КО) по сравнению с животными дикого типа (WT) с признаками агрессивного поведения (violent attacks) – укусов, данные атаки ТРН2 нокаутов (КО) приводили к выраженному замиранию у атакуемых резидентов, что свидетельствовало о сильной стрессорной реакции у атакуемых крыс. Самки ТРН2 так же демонстрировали атакующее поведение по сравнению с самками дикого типа, которые не проявляли никакой агрессии по отношению к интродеру. Таким образом, мы показали, что крысы (и самки и самцы) ТРН2 КО так же как и мыши [337] обладают повышенной агрессивностью и могут выступать как агрессивный агент в тесте «резидент-интродер», особенно в экспериментах с использованием самок-агрессоров, которые обычно не демонстрируют агрессивных действий по отношению к «интродеру», но самки ТРН2 КО, как показали наши исследования - демонстрируют.

Стресс является провоцирующим фактором к приему алкоголя [35,221]. В данной работе это доказано на крысах Вистар и на ТРН2 КО и WT животных, однако мы так же показали, что

крысы TRH2 КО более подвержены стресс-индуцированному приему алкоголя, чем животные WT. Причиной такой подверженности является дисбаланс нейромедиаторных систем у крыс-нокаут, в особенности системы «вознаграждения». Доказательством данной теории служит тот факт, что по нашим данным у крыс TRH2 КО показано увеличение потребления сладких растворов и сладких алкогольных растворов, то есть всех тех растворов, которые имеют гедонистическую ценность.

Наряду с увеличением агрессии можно предположить, что дисрегуляция мезолимбической ДА системы, отвечающей за мотивационный компонент поведения вместе с подавленной активностью центральной СЕР системы, отвечающий в том числе за когнитивный контроль эмоционального и импульсивного поведения [336], приводит к измененному мотивационному поведению (повышенная импульсивная агрессия, повышенное гедонистическое поведение, повышенная подверженность к стрессорному потреблению алкоголя) у животных TRH2 КО. В литературе показаны различные данные на людях, страдающих от алкоголизма, пациентов с нервно-психическими заболеваниями, получающих ДА агонисты в качестве лекарственных средств [216], людей, зависимыми от потребления наркотических веществ – у всех этих людей нарушен когнитивный контроль эмоций и наблюдается пониженный уровень центрального СЕР [336]. Таким образом, нормальное функционирование ДА и СЕР системы необходимо для обеспечения оптимального функционирования мотивационного поведения посредством когнитивного контроля импульсивности.

Таким образом, исходя из повышенной агрессивности крыс-нокаут по гену TRH2, мы можем рекомендовать данных крыс как отличную модель для создания агрессивной среды и стресса социального поражения. Полученные данные свидетельствуют о важности функционирования центрального звена СЕР системы, при нарушении которого наблюдается так же нарушение синтетических процессов в ДА системе и как следствие, увеличение общей гедонистической мотивации, мотивации к потреблению алкоголя и к агрессивным действиям.

Глава 3. Исследование последствий однократного стресса социального поражения с помощью метода вольтамметрии и поведенческих методик

Исследование последствий стресса социального поражения у самцов крыс - Поведенческие изменения, наблюдаемые во время однократного ССП у самцов крыс

Данный раздел посвящен изучению последствий стресса социального поражения (ССП). В ходе работы использовался метод быстрой сканирующей вольтамметрии и поведенческие методики.

В ходе данных экспериментов животные опытной группы подвергались процедуре однократного ССП (процедура однократного ССП подробно изложена в разделе «Материалы и методы») или вольтамметрическим исследованиям (рисунок 33).

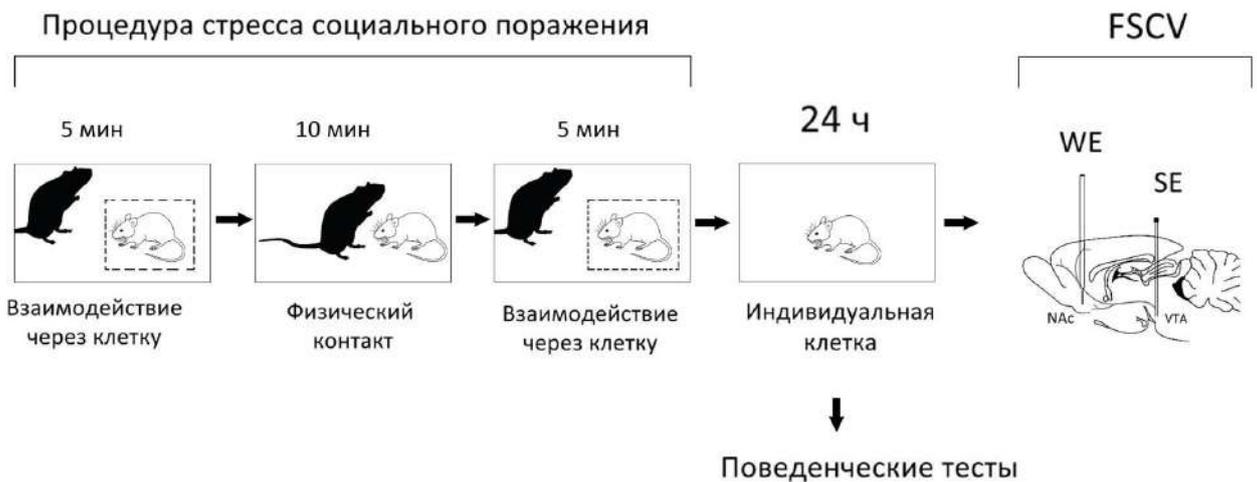


Рисунок 33. Схематическая иллюстрация экспериментальных процедур. NAc – прилежащее ядро, VTA – вентральная область покрышки, FSCV – циклическая вольтамметрия с быстрым сканированием, WE – рабочий регистрирующий электрод, SE – стимулирующий электрод.

Во время процедуры однократного ССП животные-интродеры подвергались множественным агрессивным клинч-атакам (иногда с укусами) в течение от резидентов. Среднее время прямого физического контакта составило $436 \pm 81,5$ с (данное время варьировало в зависимости от степени агрессивности крысы-резидента). Средний латентный период первой атаки составил $1,3 \pm 0,2$ с. Животные опытной группы, подвергнутые ССП, демонстрировали активное защитное ($12,1 \pm 3,0$ %), бег ($0,7 \pm 0,2$ %), исследовательское поведение ($26,6 \pm 5,8$ %), а также замирание ($25,6 \pm 4,6$ %), подчиненное ($1,7 \pm 0,6$ %) поведение. Во время взаимоотношения с конспецификами животные контрольной группы демонстрировали высокие показатели исследовательской активности ($27,0 \pm 4,1$ %) и практически не демонстрировали

поведения замирания ($0,1 \pm 0,1\%$), то есть стресс в данном взаимоотношении отсутствовал. Напротив, у животных-резидентов группы «стресс» (Рисунок 34) в процессе стрессорного взаимодействия отсутствовал «груминг», было показано высокие значения поведения замирания (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,0006$) у стрессированных животных (непарный двусторонний t-критерий, $p = 0,0001$) по сравнению с контрольной группой., однако различий в исследовательском поведении между животными опытной и контрольной группы не наблюдалось ($27,0 \pm 3,6$ против $26,6 \pm 5,1$; $p = 0,09546$, непарный двусторонний t-критерий).

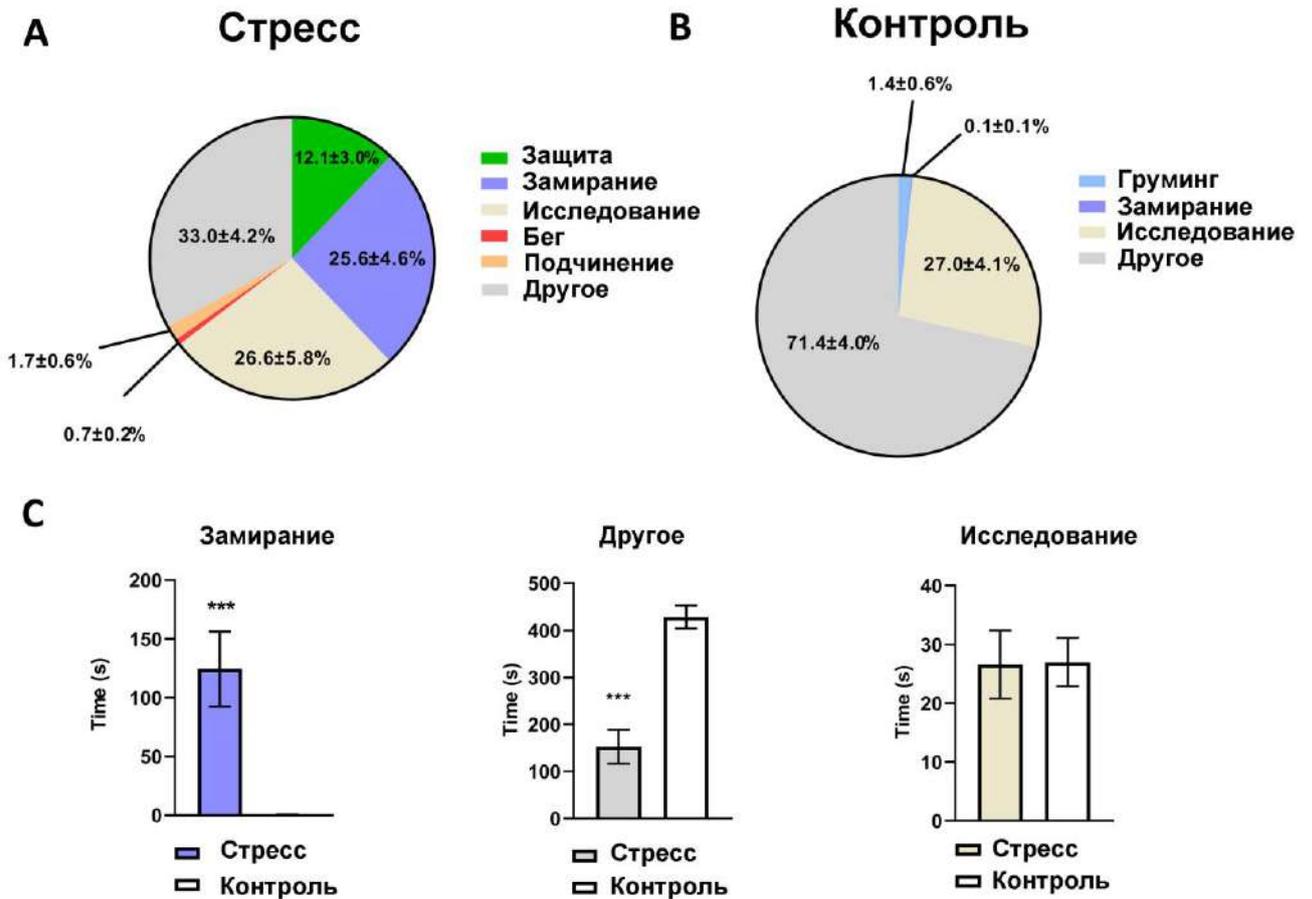


Рисунок 34. Поведение крыс во время стресса социального поражения. Поведение характеризовалось как оборонительное, замирание (крыса не двигается), исследовательское (стойки и обнюхивание), бег, субмиссивное (крыса лежит на спине) или другое (ходьба, стояние). А - Распределение поведения крыс-интродеров во время стресса социального поражения, представленное в процентах от общего времени процедуры ($n = 8$) (среднее значение \pm SEM). В - Распределение поведения, демонстрируемого «контрольными» крысами во время 20-минутного воздействия неагрессивного самца конспецифика, представленное в процентах от общего времени сеанса ($n = 8$), (среднее \pm SEM). С - Влияние стресса социального поражения на проявление различных форм поведения по сравнению с контрольной группой, не

подвергавшейся стрессу. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. По горизонтали – группы животных, по вертикали – время, с. Использовались непарные двусторонние t-критерии или U-критерий Манна-Уитни ($n = 8$ в группе), *** - $p \leq 0,0006$.

- Поведение, наблюдаемое через 24 часа после единичного ССП у самцов крыс

Показано отсутствие достоверных различий между животными подвергнутыми ССП и группой контроля по ряду поведенческих тестов, таких как: предпочтение 10% раствора сахарозы ($120,4 \pm 5,8$ % vs $127,7 \pm 81,5$ %, $p = 0,8048$, U-критерий Манна-Уитни) (рисунок 35), локомоторная активность в открытом поле ($27,6 \pm 2,0$ м vs $26,1 \pm 1,6$ м, $p = 0,5819$), груминг ($9,8 \pm 3,2$ с vs $14,2 \pm 4,6$ с, $p = 0,2176$, U-критерий Манна-Уитни) и стойки ($63,9 \pm 6,1$ с vs $50,7 \pm 3,6$, $p = 0,1051$, U-критерий Манна-Уитни) тест). Однако у животных подвергнутых ССП, наблюдалось достоверное увеличение времени неподвижности в тесте принудительного плавания Порсолта ($0,8 \pm 0,2$ против $0,4 \pm 0,1$; $p = 0,0427$, непарный двусторонний t-критерий) по сравнению с контролем (рисунок 35 F).

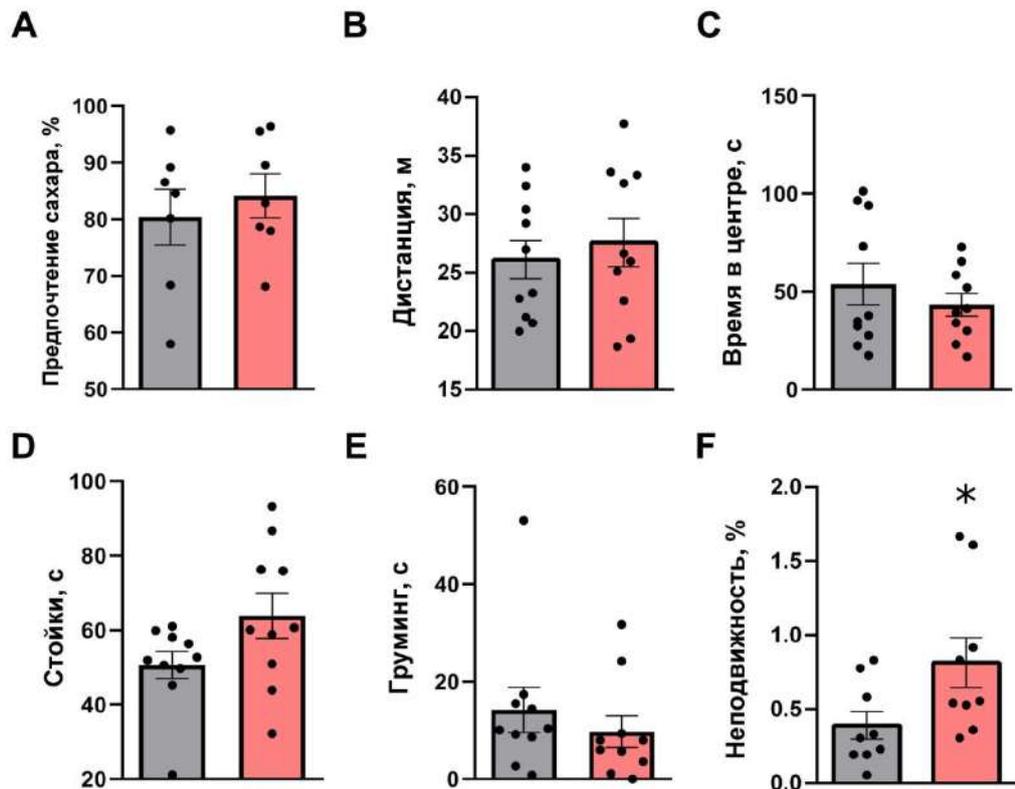


Рисунок 35. Поведение животных через 24 часа после однократного ССП. (А) Предпочтение 10 % раствора сахарозы, измеренное через 24 часа ($n = 7$); (В–Е) локомоторное и тревожное поведение в тесте «открытое поле» ($n = 10$); (F) Время неподвижности в тесте Порсолта ($n = 9$ в

группе). Серые столбики – животные контрольной группы; Красные столбики – группа «стресс». Все данные представлены как среднее \pm SEM. Использовали непарный двусторонний t-критерий или U-критерий Манна-Уитни, * - $p = 0,0427$.

- Влияние однократного ССП на динамику ДА ответа в прилежащем ядре у самцов крыс

Метод вольтамметрии *in vivo* использовался для оценки изменений ДА ответа у животных через 24 часа после процедуры ССП по сравнению с группой контрольных животных (взаимодействие с конспецификом). На рисунке 36 показан ДА ответ (60 Гц, 60 импульсов, 1 с) у животных группы «стресс» и контроля в виде цветowych схем и графиков. На рисунке 36 D так же показана гистологическая верификация позиции регистрирующего микроэлектрода.

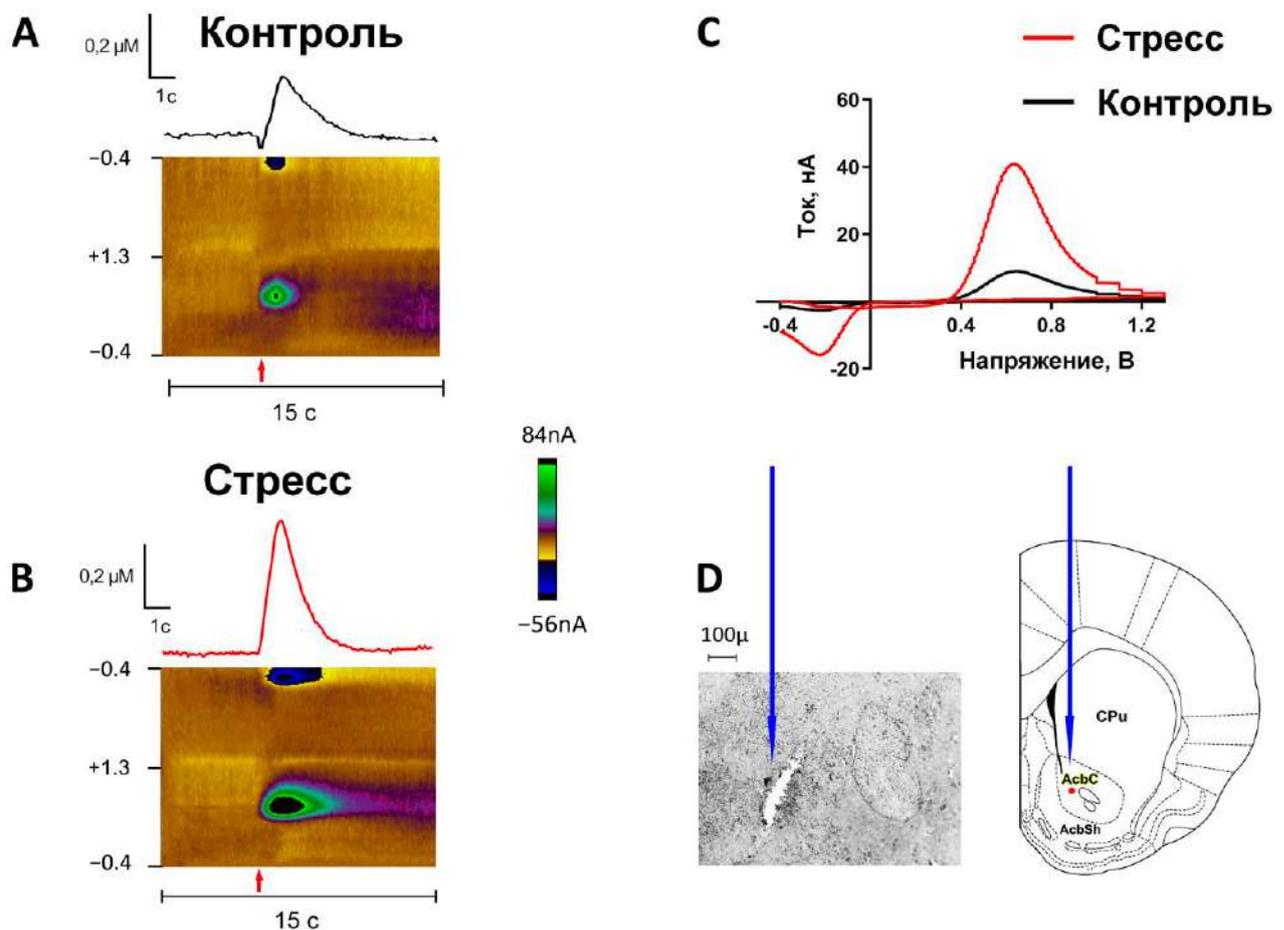


Рисунок 36. ДА ответ в NAc во время электрической стимуляции VTA. Выброс ДА в мозге подвергшихся однократному ССП (B) и контрольных (A) животных в течение 15 с. Красные стрелки указывают на начало электрической стимуляции (1 с, 60 Гц, 60 импульсов, ток 330 μ A). (C) Репрезентативная циклическая вольтаммограмма, показывающая пики окисления и восстановления при $\sim 0,6$ и $\sim -0,2$ В (соответственно), подтверждающая то, что полученный

сигнал является ДА. (D) Гистологическая верификация положения рабочего электрода в NAc (синяя стрелка) (Справа). Путь электрода на коронарном срезе на расстоянии 1,60 мм от Брегмы; (Слева) повреждение ткани, указывающее на размещение электрода, наблюдалось на коронарном срезе ткани. CPu – хвостатое ядро; Acbс — прилежащее ядро, ядро; AcbSh - прилежащее ядро, оболочка.

На рисунке 37 показано, что амплитуда ДА ответа была увеличена в обеих (стресс и контроль) группах в зависимости от частоты электрической стимуляции VTA (повторные измерения двустороннего дисперсионного анализа; $F(6, 78) = 15,59, p < 0,0001$), однако достоверно более выраженный ДА наблюдался у животных группы «стресс» по сравнению с контрольной группой (повторные измерения двухфакторного ANOVA; $F(1, 13) = 7,005, p = 0,0201$). Более высокий ДА ответ был показан у животных группы «стресс» по сравнению с контролем на более высоких (60, 50 и 40 Гц; $p < 0,05$), но не на более низких частотах (30, 20, 10 и 5 Гц; $p > 0,05$).

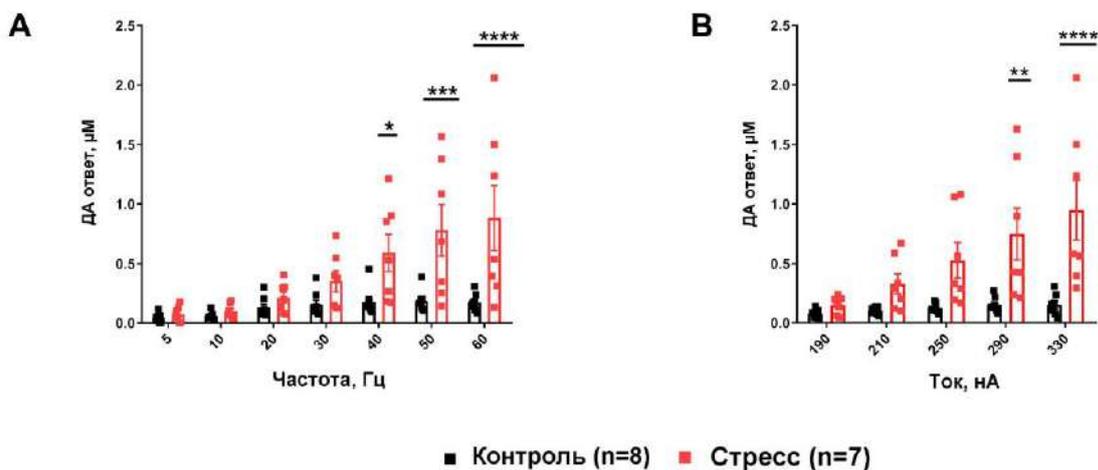


Рисунок 37. ДА ответ в NAc с различными частотными (A) и амплитудными (B) характеристиками электростимуляции VTA (1 с, 5–60 Гц, 5–60 импульсов, ток 330 µA) через 24 часа после ССП. ДА ответ у животных подвергшихся процедуре ССП ($n = 7$) и животных контрольной группы ($n = 8$). Данные представлены как среднее \pm SEM, двусторонний ANOVA с повторными измерениями; * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Введение раклоприда, селективного антагониста ДА рецепторов D2 (2 мг/кг, в.б.), привело к значительному увеличению ДА ответа в обеих группах (повторные измерения двухфакторного ANOVA; $F(8, 88) = 30,26; p < 0,0001$), однако, у животных группы «контроль» данный ответ был более выражен, чем в группе «стресс» ($F(1, 11) = 5,321; p < 0,05$) (рисунок 38).

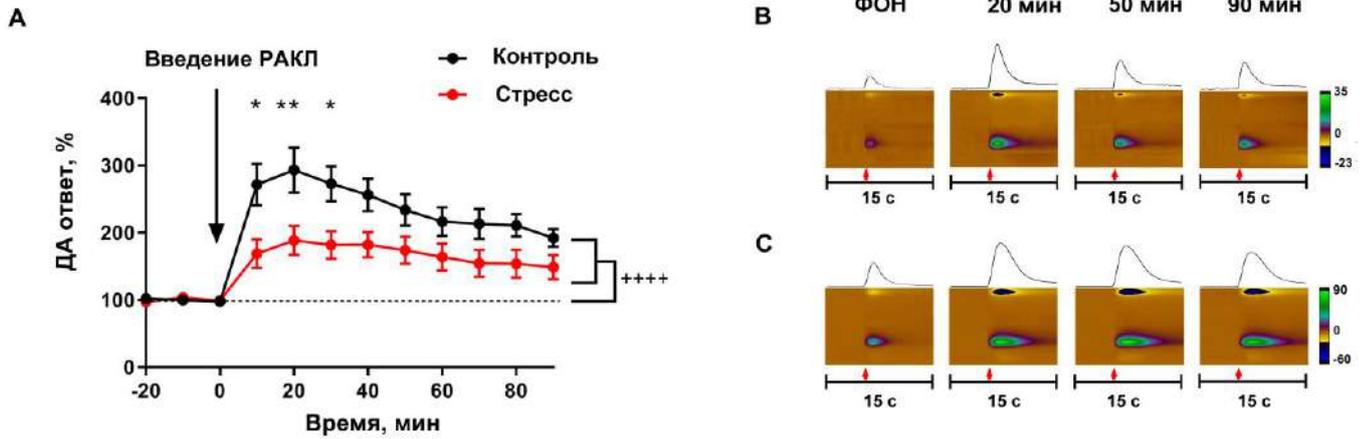


Рисунок 38. Раклоприд (2 мг/кг) оказывал значительно меньший эффект на ДА ответ в НАс у крыс, подвергшихся стрессу социального поражения в отличие от животных контрольной группы. (А) Мезолимбический ДА ответ после введения раклоприда. Данные представлены как среднее \pm SEM. Контрольная группа ($n = 8$), животные группы «стресс» ($n = 5$). Повторные измерения двустороннего дисперсионного анализа, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; +++++ - $p < 0,0001$. (В, С) Репрезентативные цветовые графики, отражающие ДА ответ в НАс у животных контрольной (В) опытной (С) групп. Красная стрелка указывает на начало электрической стимуляции (1 с, 60 Гц, 60 импульсов, ток 330 μ А).

В результате процедуры ДА истощения (рисунок 39), обе группы продемонстрировали одинаково резкое снижение ДА ответа (повторные измерения двустороннего дисперсионного анализа; $F(21, 210) = 14,76$; $p < 0,0001$), различия между группами не наблюдалось ($F(1, 10) = 1,141$; $p > 0,05$).

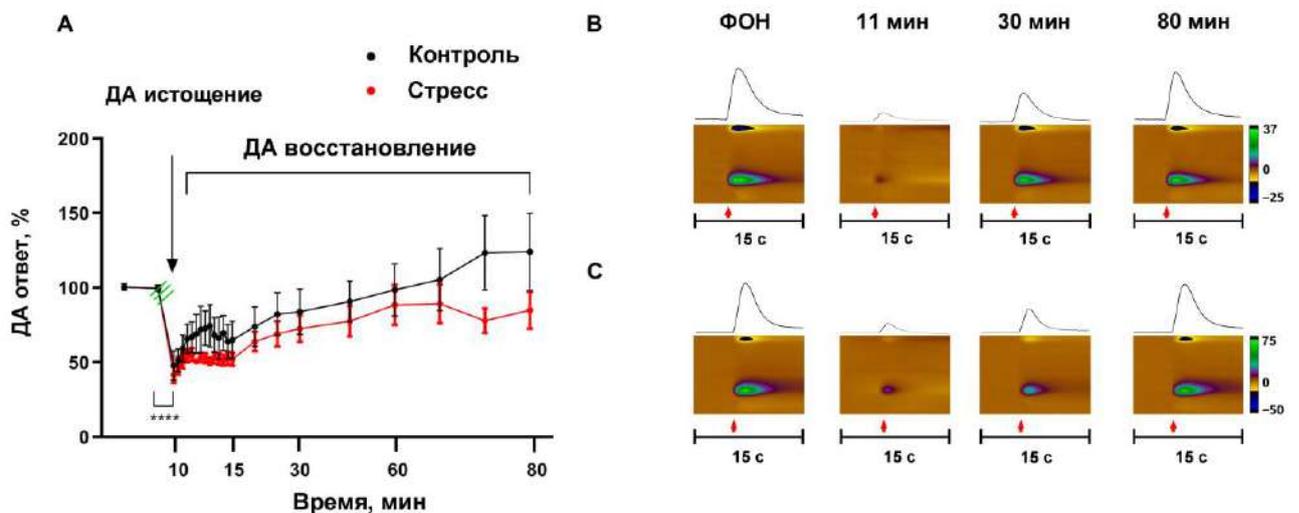


Рисунок 39. Стресс социального поражения не повлиял на процессы ДА истощения. (А) Электрически-вызванный ДА ответ, полученный с интервалами 1 мин (14 стимуляций), 5 мин (3

стимуляции) и 10 мин (5 стимуляций) после применения серии импульсов, предназначенных для истощения ДА в области NAc. Данные представлены как среднее \pm SEM; (n = 6 в группе); **** - $P < 0,0001$ (повторные измерения двухфакторного дисперсионного анализа). (В, С) Репрезентативные цветовые графики и ДА ответы в мозге контрольных (В) и стрессированных (С) крыс, полученные через 1, 20 и 70 минут после истощения ДА. Красная стрелка – начало электростимуляции.

Несмотря на то, что большинство проведенных поведенческих тестов не выявило существенных изменений в поведении животных через 24 часа после агрессивного взаимодействия, тем не менее, в тесте принудительного плавания наблюдалось существенное увеличение времени неподвижности у животных группы «стресс» по сравнению с контролем через 24 ч после ССП.

В данном эксперименте так же было показано, что влияние антагониста ДА D2-рецепторов, раклоприда (2 мг/кг, в.б.) на ДА ответ было достоверно снижено у животных, подверженных ССП по сравнению с животными контрольной группы (рисунок 38). Процедура ДА истощения (рисунок 39) не привела к снижению или восстановлению амплитуды ДА ответа после стресса, вызванного социальным поражением.

При ССП у грызунов возникают острые физиологические адаптации, включающие активацию сердечно-сосудистой и эндокринной систем [33,338] наряду с нейрхимическими изменениями, такими как повышенная ДА и норадреналинергическая нейротрансmissão [19,339,340] а также резкие изменения в паттернах поведенческой активности [19,340]. Большинство этих изменений уменьшаются или пропадают в течение 24 часов после воздействия стрессора. Однако некоторые поведенческие и нейробиологические эффекты могут наблюдаться даже после единичного эпизода социального поражения [340]. Так же, в литературе показано, что длительное агрессивное взаимодействие резидента и интродера приводит к значительным поведенческим изменениям, таким как: снижение амплитуды суточного температурного ритма, выраженного в повышении температуры тела в фазе суточного покоя, снижению спонтанной активности в домашней клетке и уменьшению локомоции в новой среде. [32,341]. Однако, в текущем исследовании было показано достоверное увеличение времени неподвижности в тесте принудительного плавания Порсолта в группе «стресс» уже после однократной процедуры ССП. Известно, что тест Порсолта является одним из индикаторов депрессивно-подобного состояния [286,287]. В текущем исследовании данное поведение сопровождалось увеличением ДА ответа в NAc.

В литературе показано, что единичный стресс может способствовать развитию нейрональных адаптивных процессов, происходящих в мезолимбической ДА системе. На модельных животных показано, что стресс вызывает блокаду LTP в ДА нейронах VTA [342,343]. Так же, было показано, что в течение как минимум 24 часов после острого стресса наблюдается увеличение AMPA/NMDA рецепторов в зоне VTA [344,345]. Таким образом, в литературе показано, что усиление нейропластичности в зоне VTA, происходящее под действием различных стрессогенных факторов, может сохраняться через 24 часа после окончания действия стресса. Кортикотропин-рилизинг-фактор (КРФ) может быть ответственным за наблюдаемые изменения внеклеточного ДА. Этот нейропептид выбрасывается в ответ на острый стресс, способствуя как адаптивному так и неадекватному поведению [346,347] посредством его действия на центральные рецепторы КРФ [111]. Показанные изменения нейронов VTA напрямую связаны с увеличением ДА концентрации в NAc в ответ на действие стрессора [5].

Изменения внеклеточной концентрации ДА потенциально могут приводить к пресинаптической нейроадаптации, направленной на компенсацию таких изменений, влияя на процессы синтеза, ауторецепторную регуляцию релиза и обратного захвата нейромедиатора.

Чтобы выяснить, могут ли последствия единичного ССП влиять на ДА динамику на пресинаптическом уровне, мы применили протокол ДА истощения. Такой протокол позволял выявить возможные изменения в синтезе, обратном захвате и ауторецепторной регуляции ДА [348–350]. Этот подход основан на том факте, что для восстановления электрически-вызванного ДА ответа после длительных высокочастотных электрических стимуляций, требуется определенное время. Динамика снижения и восстановления ДА должна отражать процессы общей пресинаптической нейрональной регуляции. Несмотря на существенную разницу, обнаруженную в ДА ответах между крысами, не подвергавшимися воздействию ССП, и крысами, подвергшимся ССП, протокол ДА истощения приводил к полному истощению и затем восстановлению ДА сигнала. Таким образом, эти данные могут свидетельствовать о том, что баланс внутрисинаптических процессов в NAc крысы не нарушается при однократном социальном поражении.

Тем не менее, единичный ССП приводил к снижению эффективности D2 антагониста раклоприда у крыс опытной группы, подвергнутых ССП по сравнению с контролем. Таким образом, стресс вызвал изменение регуляции ДА ответа, осуществляемой с помощью D2-рецепторов в зоне NAc. Интересно, что есть данные о том, что острое агрессивное воздействие увеличивает плотность D2 рецепторов в зоне NAc у крыс-интродеров [351]. По другой гипотезе раклоприд и ДА конкурируют за D2 рецепторы, из-за увеличения количества

внутрисинаптического ДА после ССП наблюдалось снижение фармакологического эффекта препарата ввиду процессов конкуренции за субстрат (рецептор). Таким образом, в группе «стресс» после введения раклоприда наблюдалось ослабление блокады пресинаптических ауторецепторов и как следствие, снижение ДА концентрации, в отличие от группы контроля, у которой наблюдалось значительное увеличение ДА ответа в НАс под действием раклоприда в течение всех 90 мин наблюдения.

Таким образом, наши данные продемонстрировали заметные изменения ДА нейротрансмиссии в зоне НАс, так же, обнаружены отдельные признаки депрессивно-подобного состояния без изменений остальных форм поведения через 24 часа после воздействия ССП. Примечательно, что полученные изменения наблюдались после однократного воздействия социального стресса.

Влияние последствий ССП у самок крыс на ДА нейротрансмиссию и поведенческую активность

Было проведено сходное исследование влияния последствий ССП на самок. В данном исследовании использовались те же временные параметры стрессорного воздействия и значений электрического тока, что и были использованы на самцах в предыдущем исследовании последствий ССП. Все экспериментальные группы состояли из равного количества животных в различных стадиях эстрального цикла. Это было сделано для того, чтобы избежать влияния стадии цикла на поведение или динамику ДА ответа [319].

На рисунке 40 показано статистически значимое снижение общей исследовательской активности (в среднем на $30,23 \pm 3\%$) у самок крыс, подвергшихся действию ССП по сравнению с контрольной группой крыс. Так же в группе опыт присутствовали такие элементы поведения как: бег, защитное, атакующее поведение и груминг. В процессе действия ССП среднее время прямого физического контакта у самок крыс составило $644,2 \pm 25,1$ с (рисунок 40). Это время варьировалось в зависимости от степени агрессивности (наличие укусов, атаки) крысы-резидента. В среднем самки подвергались $0,8 \pm 0,2$ агрессивным атакам без укусов во время процедуры ССП.

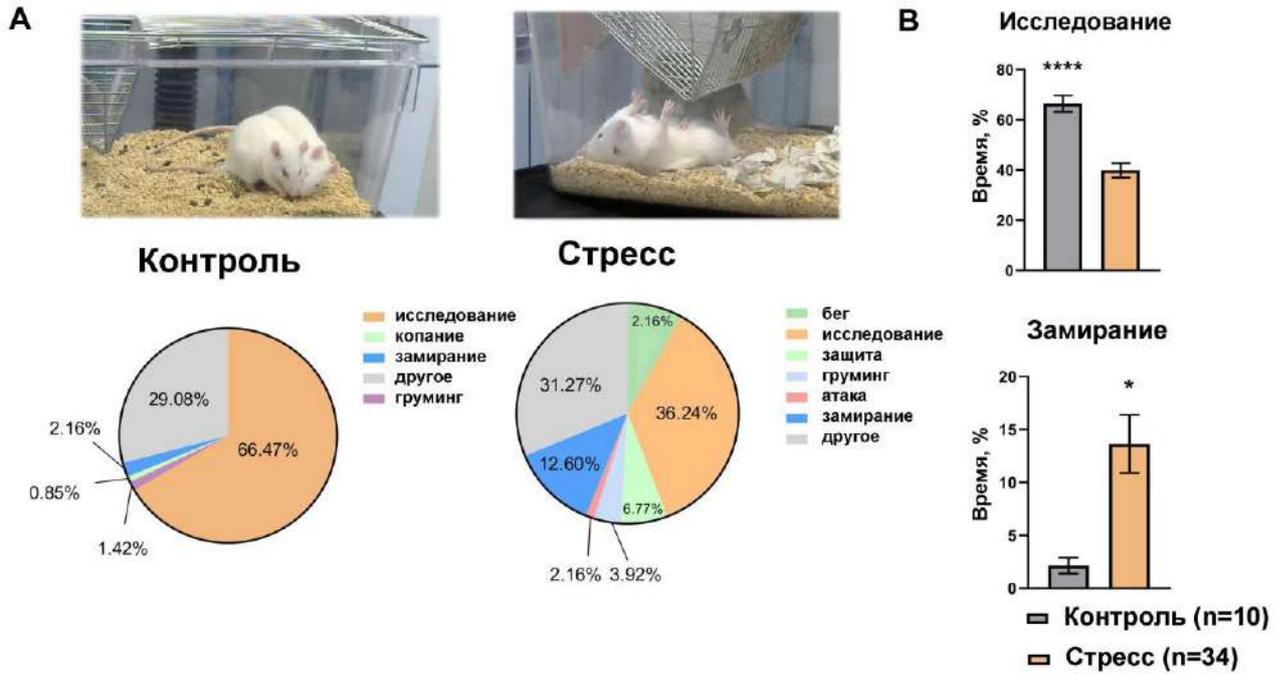


Рисунок 40. Поведение самок крыс во время стресса социального поражения. А – поведенческие паттерны (исследовательская активность, копание, замирание, груминг, бег, защита, атаки и другое) демонстрируемые животными во время ССП (справа) и во время взаимодействия с дружественной особью своего вида (слева - контрольная группа). В – статистически значимые различия в исследовательской активности обеих групп. **** - $p < 0,0001$, непарный t-тест.

В отличие от самцов, самки крыс демонстрировали различные, порой полярные поведенческие паттерны во время однократного ССП. Данный факт позволил нам разделить животных на две группы: с высокой и низкой исследовательской активностью во время процедуры ССП, то есть на крыс с активной и пассивной стратегией поведения во время ССП. Животные активной и пассивной группы демонстрировали различный поведенческий профиль во время ССП (рисунок 41). Так исследовательская активность пассивных животных во время ССП была снижена в среднем на 40% по сравнению с контролем, в то время как у группы с активной стратегией поведения эти значения не превышали 20%. Данные группы животных значительно различались не только по параметрам общей исследовательской активности (стойки, обнюхивания пространства и чужака) между группами (непарный t-критерий, $P \leq 0,0003$, рисунок 42) и контрольными крысами (Непарный t-критерий, $P < 0,0001$), но и по параметрам замирания между группами (U-критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$) и контролем (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,0026$).

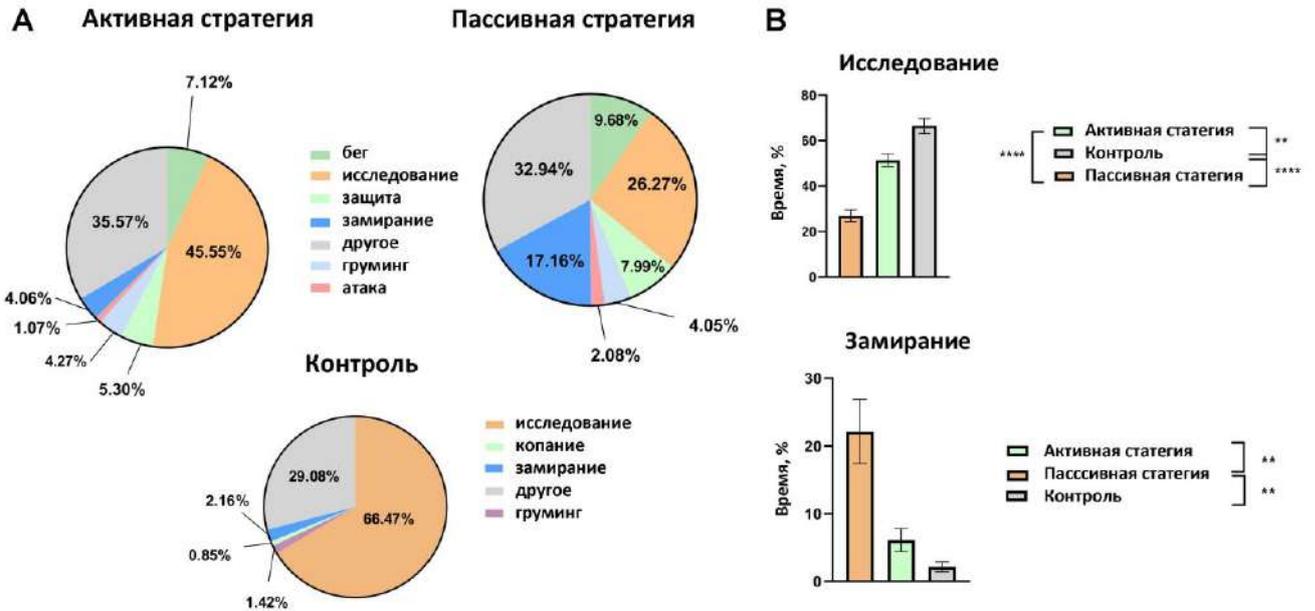


Рисунок 41. Поведение крыс с активной и пассивной стратегией поведения во время однократного стресса социального поражения. Поведение при социальном поражении проявлялось как: оборонительное, атакующее (агрессивные позы и атаки), исследовательское (обнюхивание и стойки), бег, замирание (freezing), копание (digging), груминг и другое (ходьба, стояние). (А) – Поведенческие паттерны у крыс с пассивной ($n = 16$), (среднее \pm SEM) и активной ($n = 18$), (среднее \pm SEM) стратегией поведения во время 20 минутной процедуры ССП и у контрольных животных ($n = 10$), (среднее \pm SEM) во время 20 минутного воздействия с неагрессивным конспецификом. (Б) – Исследовательское поведение и поведение замирания во время процедуры ССП у самок крыс с различной стратегией поведения. Данные представлены как среднее \pm SEM, использовались непарные двусторонние t-критерии или U-критерий Манна-Уитни, **** - $P < 0,0001$; *** - $P \leq 0,0003$; ** - $P < 0,0012$.

Через сутки после стрессорного воздействия обнаружено статистически значимое увеличение общей исследовательской активности (стойки) (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,04$, рисунок 42) в ПКЛ у самок крыс, наряду со сниженным потреблением (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,01$) и тенденции к снижению предпочтения (U-критерий Манна-Уитни, $p = 0,07$) сладких растворов (10% раствор сахарозы), что свидетельствует о развитии состояния ангедонии наряду с повышенной исследовательской активностью (вертикальные стойки) у крыс через 24 ч после ССП.

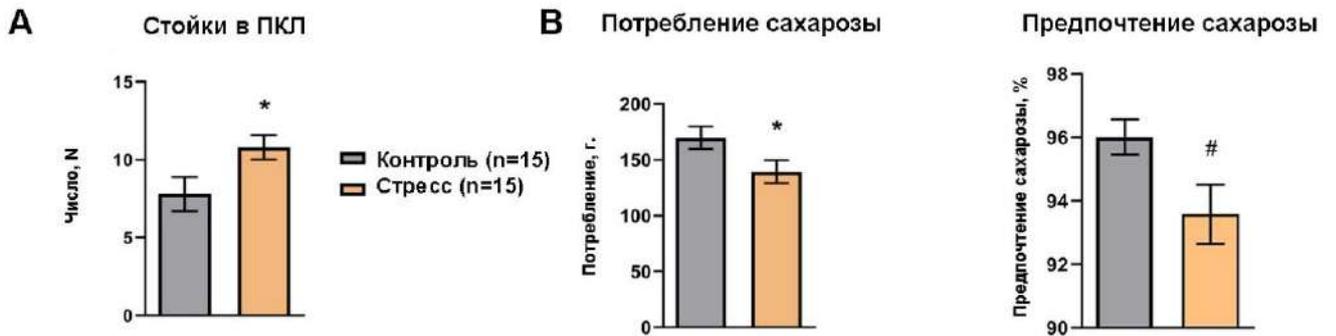


Рисунок 42. Поведение самок крыс через 24 часа после однократного стресса социального поражения. А – увеличение стереотипического поведения (вертикальные стойки) у стрессированных крыс по сравнению с контролем в ПКЛ; В – снижение потребления сладких растворов у крыс, подвергнутых ССП в отличие от группы контроля. * - $p \leq 0.03$, # - $p \leq 0.1$, непарный t-тест.

При разделении животных по стратегиям поведения было обнаружено, что состояние ангедонии более выражено у животных с пассивной стратегией поведения через 24 ч после ССП по сравнению с контролем (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,02$, рисунок 43). Без разделения по группам невозможно обнаружить различий в показателях депрессивно-подобного состояния в тесте принудительного плавания Порсолта через 24 часа после ССП, однако, после групповой рандомизации мы можем наблюдать сильную тенденцию к увеличению латентного периода первой иммобилизации у самок с пассивной стратегией поведения по сравнению животными активной группы (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,06$, рисунок 43) и контролем (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,04$, рисунок 43). Через 24 часа после ССП не было обнаружено каких-либо изменений в тревожном поведении в приподнятом крестообразном лабиринте у самок крыс как пассивной, так и активной группы, по сравнению с контролем, однако наблюдалось значительное увеличение исследовательского поведения (стойки) у всех самок крыс по сравнению с контрольной группой (U-тест Манна-Уитни, $p = 0,04$, рисунок 43). Наблюдаемые изменения были более выражены у животных пассивной группы (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,07$, рисунок 43). Когнитивный тест на распознавание новых объектов, проведенный через 24 часа после ССП, показал значительное увеличение коэффициента распознавания новых объектов у пассивной группы самок крыс по сравнению с не стрессированным контролем (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,03$, рисунок 43) и активной группой (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,02$). Статистически значимых различий между группами по показателям общего времени исследования объектов не наблюдалось.

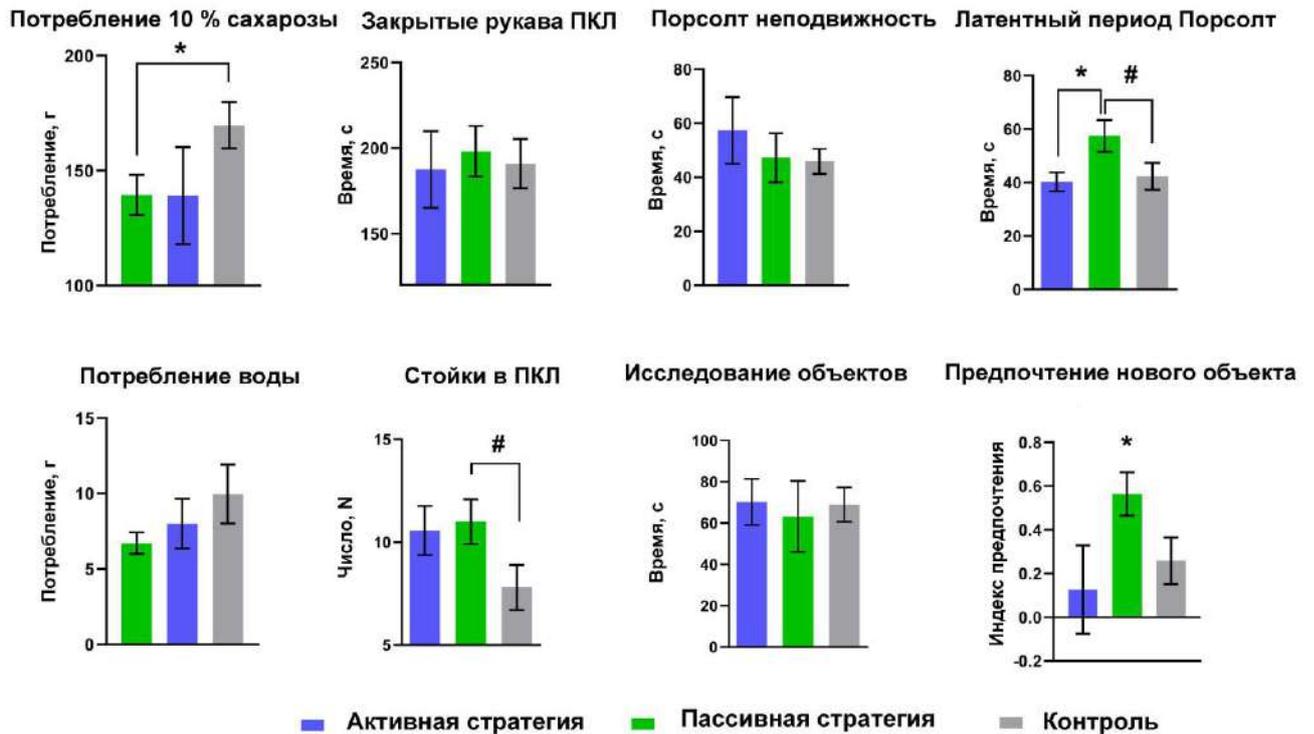


Рисунок 43. Поведение самок крыс через 24 ч после однократного стресса социального поражения. На рисунке показано: потребление воды и 10% сахарозы, поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте, тесте принудительного плавания и тесте распознавания новых объектов. (Активный ($n = 7$) на группу; Пассивный ($n = 8$) на группу; Контрольный ($n = 15$) на группу) ($n = 9$ на группу). Все данные представлены как среднее \pm SEM. Для сравнения стрех групп использовали критерий Крускала-Уолиса с тестом множественного сравнения, * - $P \leq 0,05$; # - $P \leq 0,08$.

Однако, стоит заметить, что была обнаружена тенденция к увеличению предпочтения сладких растворов (10% раствор сахарозы) воде у животных с пассивной стратегией поведения еще до ССП (критерий Крускала-Уолиса, $p = 0,07$, рисунок 44), что свидетельствует об индивидуальных фоновых различиях в потреблении растворов и может служить поведенческим предиктором обнаруженных в последствии постстрессорных нарушений.

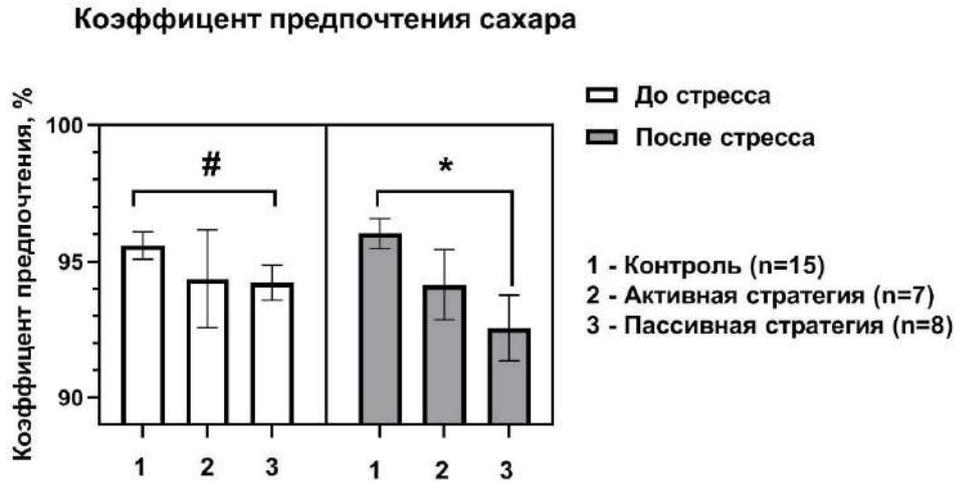


Рисунок 44. Предпочтение 10 % раствора сахарозы воде животными до и 24 ч после стресса социального поражения. Для сравнения стрех групп использовали критерий Крускала-Уолиса с тестом множественного сравнений, * - $P \leq 0,05$; # - $P \leq 0,08$.

Сравнительно низкая агрессивность самок ТРН2 КО (по сравнению с самцами ТРН2 КО) во время ССП дала возможность исследователем разделить животных на соответствующие группы (активные и пассивные). Во время ССП крысы с активной стратегией поведения подвергались в среднем $1 \pm 0,4$ атакам; пассивные - $0,6 \pm 0,3$ атакам, примечательно, что 62,5% самок с пассивной стратегией поведения по сравнению с 18% активными самками демонстрировали агрессивное поведение (агрессивные позы и атаки) по отношению к крысе-резиденту, однако высокий уровень замирания и низкий уровень общей исследовательской активности у «пассивных» крыс может свидетельствовать о высоком уровне стресса у таких животных, что напрямую коррелирует с уровнем ДА у них через 24 ч после ССП (рисунок 47).

Исследование процессов ДА нейротрансдачи в зоне НАс показало, что данный сигнал зависит от частотной характеристики тока (повторные измерения, двусторонний дисперсионный анализ; $F(6, 126) = 56,41$; $p < 0,0001$ рисунок 45) при электрической стимуляции VTA, так же показано статистически достоверное увеличение ДА ответа у стрессированных крыс в отличие от контроля через 24 ч после стресса (повторные измерения, двусторонний дисперсионный анализ; $F(1, 22) = 4473$, $p = 0,0460$), особенно значительными были различия в физическом ДА ответе, полученном после высокочастотной стимуляции VTA. Различий в процессах синтеза ДА после его истощения не наблюдалось, однако в обеих группах наблюдалось истощение ДА более чем на 50% от исходного значения.

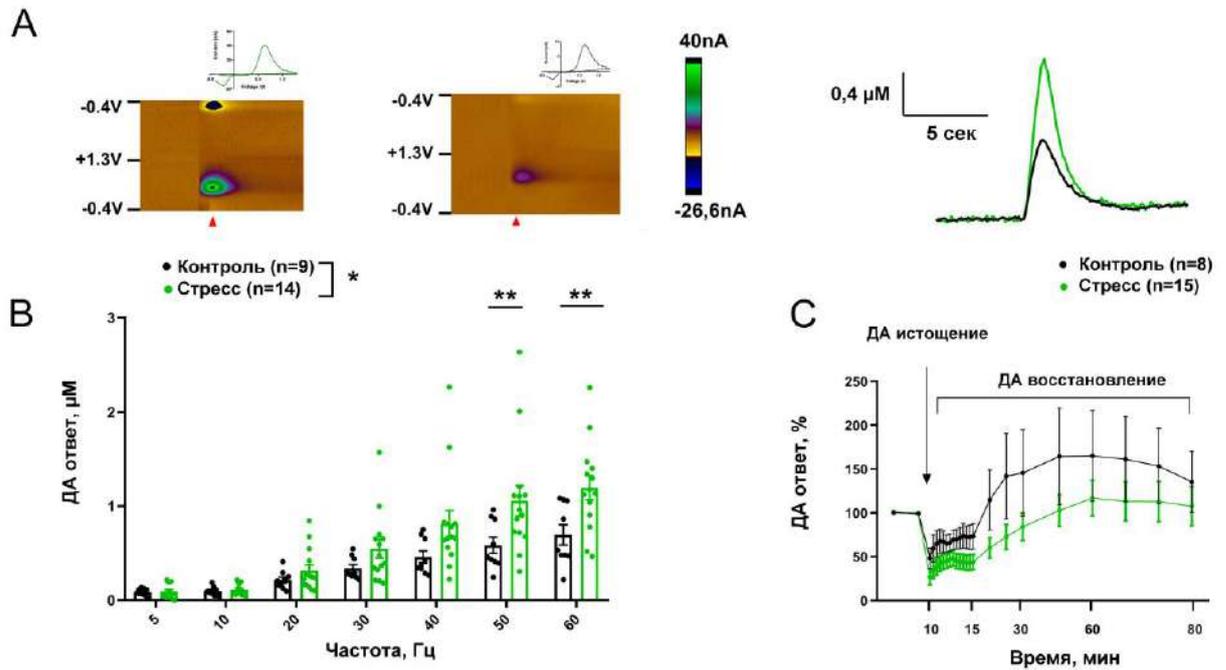


Рисунок 45. Изменение параметров ДА нейротрансдачи через 24 ч после однократного стресса социального поражения. А – Репрезентативная схема ДА ответа (μM) опытной и контрольной крысы, показанная в виде графика и цветовой схемы. Параметры электрической стимуляции VTA (1 сек, 60 Гц, 60 импульсов, 330 μA). В – Увеличение ДА ответа у животных после ССП по сравнению с группой контроля. С - ДА ответ, полученный с интервалами 1 мин, 5 мин и 10 мин после применения серии импульсов, предназначенных для истощения ДА в области NAc. Начало стимуляцией истощения показано стрелкой, далее показан процесс восстановления ДА сигнала, % в течение 80 мин. Данные представлены в виде \pm SEM.

Для исследования индивидуальных различий в действии ССП, самок крыс группы опыт разделили на подгруппы по стратегиям поведения (активная и пассивная стратегии). Помимо поведенческих изменений, наблюдаемых во время и после ССП, мы можем видеть (рисунок 46), что электрически-вызванный ДА ответ у животных пассивной и активной групп так же значительно отличался.

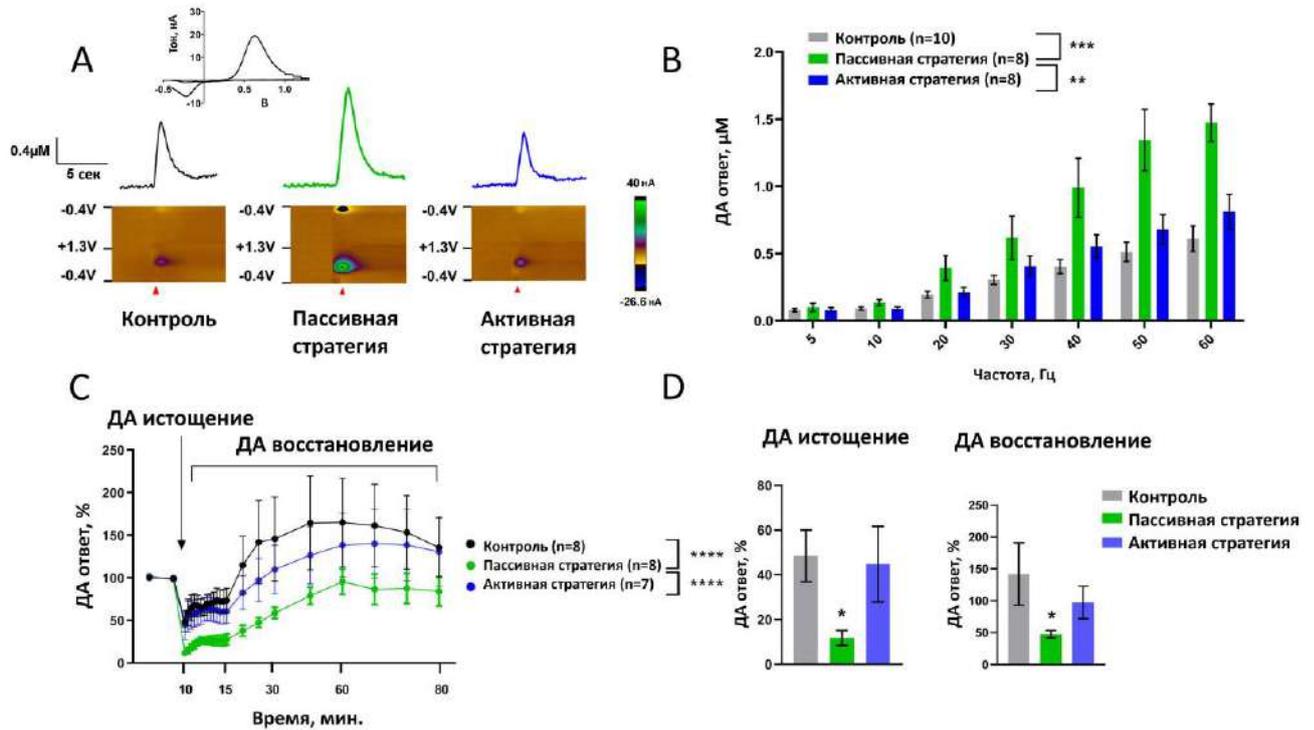


Рисунок 46. Изменения ДА нейротрансдачи у самок крыс с различной стратегией поведения, наблюдаемые через 24 ч после однократного ССП. (А) - репрезентативные сигналы ДА в ответ на стимуляцию (60 Гц, 60 импульсов, ток 330 мкА). (В) - ДА сигнал в НАс в зависимости от стимуляции VTA с различной частотой тока у крыс с различной стратегией поведения. Параметры электростимуляции VTA (1 с, 5–60 Гц, 5–60 импульсов, ток 330 мкА, интервал между стимуляциями 10 мин). (С, D) - Процедура ДА истощения/восстановления ДА у самок крыс с различной стратегией поведения через 24 часа после единичного ССП. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, двусторонний дисперсионный анализ с повторяющимися измерениями и непараметрический тест Крускала-Уолиса; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p = 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Наиболее выраженные изменения в поведении и в ДА нейротрансдачи в НАс мы можем наблюдать у самок крыс с пассивной стратегией поведения через 24 часа после ССП (Рисунок 46 А). У животных с пассивной стратегией поведения, значительно, по сравнению с контрольной группой, увеличен уровень электрически-вызванного ДА по сравнению с контрольной группой (Tukey multiple comparisons test, двусторонний дисперсионный анализ; $p = 0,0001$) и крысами активной группы (Tukey multiple comparisons test, двусторонний дисперсионный анализ; $p = 0,0055$). Так же, самки крыс с пассивной стратегией поведения демонстрируют значительное снижение времени восстановления ДА после истощения, по сравнению с крысами активной группы (критерий множественных сравнений Сидака, двусторонний дисперсионный анализ; $p < 0,0001$) и контролем (тест множественных сравнений Сидака, двусторонний дисперсионный

анализ; $p < 0,0001$) как в совокупных расчётах, так и при расчётах этих процессов (истощения и восстановления ДА) отдельно (непараметрический тест Крускала-Уолиса; * - $p < 0,05$).

Отрицательная корреляция, демонстрируемая между активным исследованием и пассивным замиранием у крыс, демонстрируемым непосредственно во время ССП, свидетельствует о том, что эти поведенческие индикаторы, наряду с другими показателями, могут служить для идентификации стратегии поведения (рисунок 47В)., так же тем. Примечательно, что была обнаружена так же отрицательная корреляция между исследовательским поведением (обнюхивание и стойки) у самок крыс во время единичного эпизода ССП, % и ДА сигналом (nA) в NAc, полученным через 24 часа после однократного ССП у самок крыс (рисунок 47А). Полученные изменения свидетельствуют о том, что ДА может быть надежным индикатором поведенческих изменений, связанных с ССП у крыс.

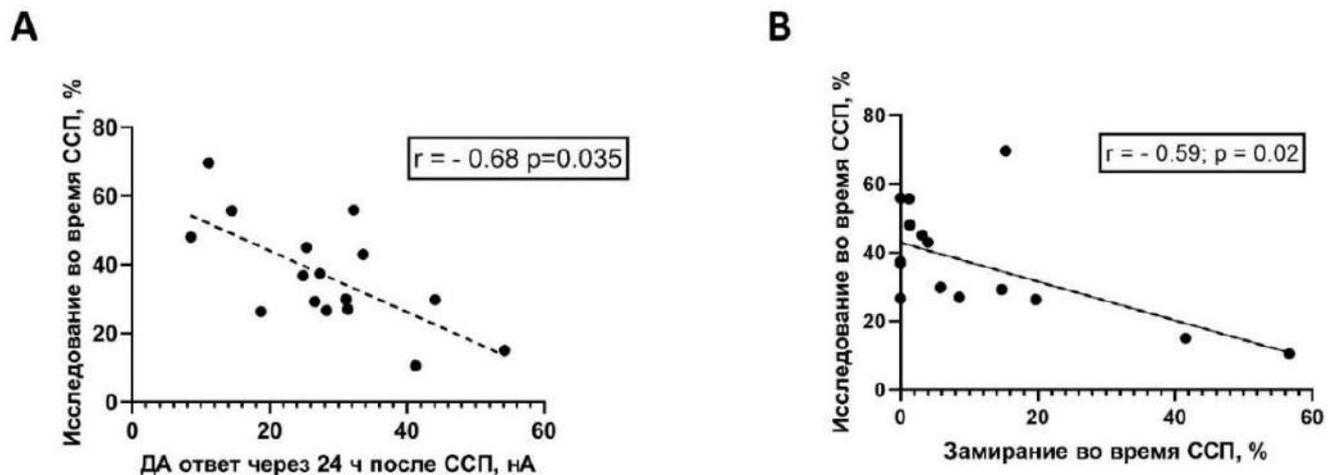


Рисунок 47. Корреляционный анализ. А - Отрицательная корреляция между исследовательским поведением (обнюхивание и стойки) у самок крыс во время единичного эпизода ССП, % и ДА сигналом (nA) в NAc, полученным через 24 часа после однократного ССП у самок крыс. В - Отрицательная корреляция между исследовательским и стрессорным (замирание) поведением у крыс во время ССП, %. Был использован двусторонний анализ Пирсона, доверительный интервал 95%.

В результате данного исследования, как и на самцах в предыдущей серии, было показано, что единичный стресс социального поражения привел к значимым нейрохимическим и поведенческим изменениям у подверженных стрессу животных. Самки TRH2 КО-резиденты демонстрировали высокий уровень агрессии по отношению к самкам- интродерам, тем самым обеспечивая высокий уровень стресса у опытных животных. Таким образом, крысы,

подвергаемые ССП, демонстрировали повышенный уровень замирания и пониженный – исследовательской активности во время ССП. Через 24 ч после ССП у таких животных наблюдались различные нейрохимические и поведенческие изменения, такие как: ангедония, однако наблюдалось так же повышение исследовательского поведения (стойки) и активация памяти. Состояние ангедонии – наиболее распространённый показатель, наблюдаемый при депрессивных расстройствах [352], однако повышение стереотипного/исследовательского поведения может отчасти объясняться наблюдаемыми нейрохимическими изменениями. В литературе показано, что введение ДА стимуляторов вызывает дозозависимое повышение стереотипии [246,278], так же показано, что существуют индивидуальные различия в данных показателях [353], однако стоит отметить, что возможно наблюдаемые изменения стоит считать адаптивными. Известно, что острый стресс по разному влияет на самцов и самок, в отличие от самцов, у самок наблюдается моторная и когнитивная активация в ответ на острое стрессорное воздействие [354–357], кроме того, существует несколько потенциальных механизмов, посредством которых половые гормоны у самок могут влиять на поведение, связанное со стрессом и тревогой, модулируя серотонинергическую, окситоцинергическую, ГАМК-ергическую системы и всю ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники (ГГАС) [358–361]. Фактически, все эти системы в некоторой степени взаимосвязаны с мезолимбической ДА нейротрансмиттерной системой.

Самки демонстрировали большой разброс индивидуальных ответов на стрессорное воздействие (ССП), что дало возможность исследователям разделить животных по стратегиям поведения (активная и пассивная). В результате, как показали исследования, животные с пассивной стратегией поведения продемонстрировали большую подверженность к единичному действию ССП, чем животные активной группы, то есть у «активных» животных, по сравнению с пассивной группой не наблюдалось выраженных поведенческих и нейрохимических изменений после единичной процедуры ССП. У животных пассивной стратегий поведения было обнаружено состояние ангедонии после ССП, признаки которого были так же показаны и до ССП (см. рисунок 44), что может свидетельствовать об предрасположенности к ангедонии у этих животных, ввиду их стратегии поведения. Активация стереотипного поведения и зрительной памяти была так же обнаружена у «пассивных» самок крыс. В литературе показано что индивидуальные поведенческие особенности (различный уровень исследовательской активности) могут свидетельствовать о различном уровне мезолимбического ДА у животных [353], что в свою очередь может стать причиной различного поведенческого ответа таких животных на стрессорное воздействие [1].

Как и было показано в предыдущей серии на самцах, самки продемонстрировали повышенные значения мезолимбического ДА ответа, однако наблюдались так же групповые различия, обусловленные различной стратегией поведения. Как и обсуждалось ранее, показанные изменения, вероятно, носят адаптивный характер, то есть вызванные стрессом изменения в механизмах ДА нейротрансмиссии, могут приводить к последующим пресинаптическим адаптациям (см. воздействие D2 антагониста раклоприда после ССП, рисунок 38), направленным на снижение уровня повышенного внеклеточного ДА. Для исследования механизмов выброса/обратного захвата использовали тест на истощение ДА с исследованием динамики восстановления значений ДА ответа. Было показано различия в данных значениях между животными с различным типом стрессорной реакции. Так у «пассивных», но не «активных» крыс наблюдалось более сильное истощение и более медленное восстановление ДА. Эти результаты согласуются с выводами, полученными у людей, что способность синтеза дофамина коррелирует с физиологической реакцией на острый психосоциальный стрессор [30]. Как обсуждалось ранее [30], снижение синтеза можно объяснить активацией механизма ингибиторной обратной связи через пресинаптические ауторецепторы. Однако мы не можем исключить другие возможные механизмы.

Таким образом, через 24 ч. после единичной процедуры ССП самки крыс реагировали с различной стратегией поведения (активной и пассивной). Единичный ССП вызвал состояние ангедонии и другие поведенческие отклонения у самок крыс, наиболее выраженное у крыс с пассивной стратегией поведения. Так же у животных с пассивной стратегией поведения было обнаружено значительное изменение в ДА нейротрансмиссии в НАс через 24 ч после стресса. Тот факт, что незначительные изменения в поведении ($p < 0,05$) или отсутствие этих изменений у животных через 24 ч после ССП могут сопровождаться значительными нейрхимическими изменениями ($p < 0,0001$), так же обнаружение корреляции между этими изменениями, доказывает, что мезолимбический дофамин может быть надежным индикатором отсроченных адаптивных изменений у крыс после действия ССП.

Глава 4. Исследование нейрохимических коррелятов стрессорного поведения у животных с различной стратегией поведения при действии хронических и субхронических стрессоров

Проведение корреляций поведенческих тестов для оптимального отбора крыс с активной и пассивной стратегиями поведения

В настоящее время существует множество подходов для выявления крыс с активной и пассивной стратегией поведения в состоянии стресса. Одни исследователи предпочитают тестирование социальной иерархии крыс [311], другие используют тест УРАИ [46] для изучения реакции крыс в состоянии электро-болевого воздействия, третьи используют тест Порсолта [292] или даже локомоторную активность [44]. Кортикостерон – является надежным показателем стрессорной реакции и активности ГГАС системы [93]. Мы решили исследовать все эти показатели для выявления корреляции с помощью программы GraphPad Prism 6 между вышеперечисленными тестами у самцов крыс Вистар, (n = 36).

Показана отрицательная достоверная (Таблица 3) корреляция между временем неподвижности в тесте Порсолта крыс Вистар и такими элементами как: количеством, «не уходов на ток» в 1-й день тестирования (R = - 0,3952), замираний в тесте УРАИ на 1-й день (R = - 0,4431), побежки в тесте ПКЛ (R = - 0,4847), так же положительная достоверная корреляция с количеством «уходов» на ток в тесте УРАИ (R = 0,4598) на второй день тестирования. Другие показатели в тесте ПКЛ, такие как: груминг, замирание, свешивания, покой, стойки, побежки, время в закрытых и открытых рукавах, пройденный квадраты, n/100 с достоверной корреляции со временем неподвижности в тесте Порсолта – не выявили. Так же не выявлена корреляция между фоновым уровнем кортикостерона, холестерина и поведенческими показателями во всех тестах (УРАИ, ПКЛ, Порсолт).

«Не уходы» на ток в тесте УРАИ в 1-й день, n	Замирания в тесте УРАИ в 1-й день, n	Уходы на ток в тесте УРАИ во 2-й день, n	«Побежки», в тесте ПКЛ, %
P = 0,0170*	P = 0,0098**	P = 0,0048**	P = 0,0049**
R = - 0,3952	R = - 0,4431	R = 0,4598	R = - 0,4847

Таблица 3 Корреляция между **временем неподвижности в тесте Порсолт (сек)** с другими параметрами в тесте ПКЛ и тесте УРАИ в 1-й и 2-й день тестирования. (n = 36). Корреляционный

анализ Пирсона. Данные представлены в виде среднего, % или $n \pm$ стандартная ошибка среднего. *,** - статистическая значимость изменений.

Количество уходов на звуковой сигнал во второй день является главным показателем обучаемости крыс в тесте УРАИ, так же активности стратегии поведения [46]. Показана (Таблица 4) значительная ($P < 0,0001$, $R = - 0,7218$) отрицательная корреляция между количеством уходов на звуковой сигнал на 2 день в тесте УРАИ с уходами на ток, так же фоновыми показателями в тесте ПКЛ, такими как «груминг» ($R = - 0,4350$) и «свешивание» ($R = - 0,3548$).

«Уходы» на ток в УРАИ, n 2 день	«НЕ уходы» на ток в УРАИ, n 2 день	Груминг в ПКЛ, %	Свешивания, в ПКЛ, %
P = 0,0219*	P < 0,0001****	P = 0,0128*	P = 0,0463*
R = - 0,3810	R = - 0,7218	R = - 0,4350	R = - 0,3548

Таблица 4 Корреляция между количествами уходов на звуковой сигнал (тест УРАИ) во второй день, с и другими параметрами. ($n = 36$). Данные представлены в виде среднего, % или $n \pm$ стандартная ошибка среднего. Корреляционный анализ Пирсона. *,**** - статистическая значимость изменений.

Уходы на звук в УРАИ, n 1 день	Время в открытых рукавах ПКЛ, %	Время в закрытых рукавах ПКЛ, %	Груминг в ПКЛ, %	Кортикостерон (фон), нг/мл	Кортикостерон (стресс), нг/мл
P = 0,0358*	P = 0,0213*	P = 0,0209*	P = 0,0120*	P = 0,0333*	P = 0,0472*
R = - 0,3511	R = - 0,4056	R = 0,4067	R = 0,4390	R = 0,3772	R = 0,4606

Таблица 5 Корреляция между социальным статусом крысы и другими параметрами. ($n = 36$). Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Корреляционный анализ Пирсона. *,**** - статистическая значимость изменений. 1 – доминант, 2 – субдоминант, 3 – субординантный статус крысы.

Социальный статус является так же важным показателем стратегии поведения крыс, показана (Таблица 5) корреляция данного теста с такими тестами как ПКЛ, тест УРАИ, так же фоновой концентрацией кортикостерона в крови ($R = 0,3772$) и после 5-ти дневного иммобилизационного стресса ($R = 0,4606$).

Таким образом, большинство известных тестов на определение активности стратегии поведения (тест активного избегания, тест неизбежного плавания, тест на определение социального статуса в клетке) показали хорошую корреляцию друг с другом и с другими параметрами (тревожность, двигательная, смещенная активность, уровень кортикостерона до и после стресса). Однако, тест на социальный статус, выполненный 2 раза, показал хорошую корреляцию с другими тестом активного избегания (УРАИ), так же поведенческими параметрами и уровнем кортикостерона как до, так и после стресса, таким образом, наряду с другими тестами может быть рекомендован для использования определения типа стрессорной реакции животных. Стоит заметить, что для точного определения типа стрессорной реакции требуется комплексная оценка всех параметров, то есть сочетание других указанных тестов (Тест на социальный статус (конкуренция за воду) + УРАИ – тест активного избегания + тест Порсолта – тест неизбежного плавания) (рисунок 49).

Поведенческие и нейрохимические особенности животных с активной и пассивной стратегией поведения, выявленные до и после действия субхронического иммобилизационного стресса

В данном разделе будут рассмотрены результаты данные фоновых поведенческих и нейрохимических различий между животными активными доминантами (АД) и пассивными субординантами (ПС), отобранными с использованием различных поведенческих протоколов (УРАИ + конкуренция за витальный ресурс) и после действия субхронического неконтролируемого стресса (рисунок 48).

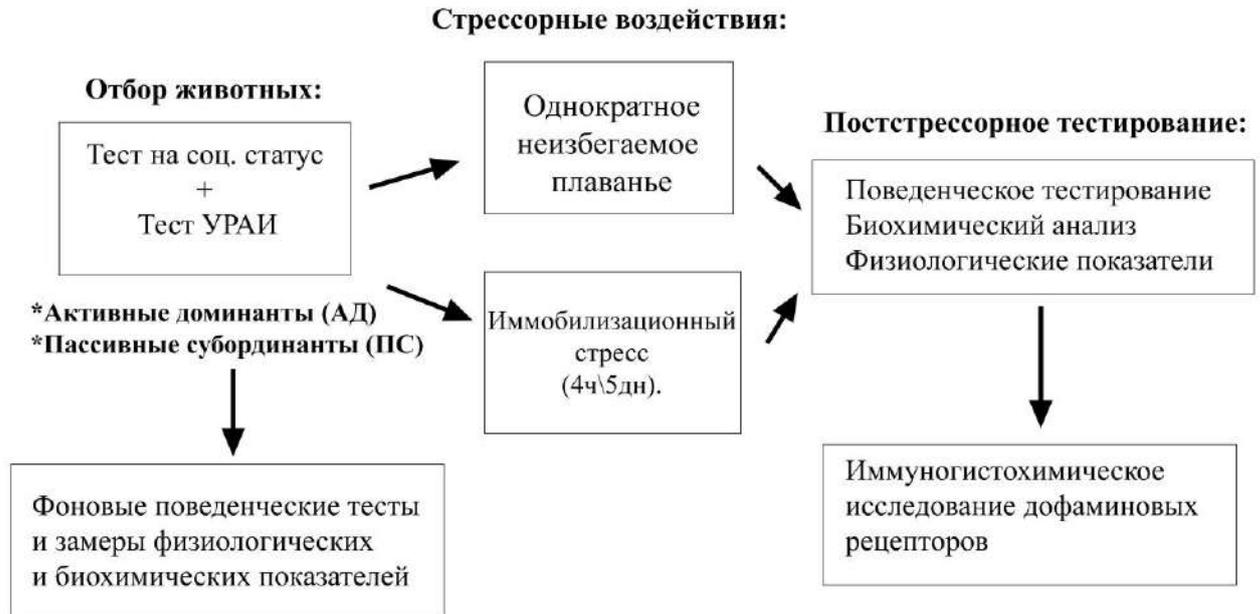


Рисунок 48. Схема эксперимента. На данном рисунке изображена схема эксперимента, включающая отбор животных по стратегиям поведения, фоновые и постстрессорные исследования.

Для реализации процедуры острого и длительного неконтролируемого стрессорного воздействия – использовали процедуру однократного (4ч.) и длительного иммобилизационного стресса (4 ч/ 5 дней, ежедневно (с 10.00 до 14:00)). Иммобилизацию производили в специальных пеналах. В экспериментах по воздействию субхронического (4 ч/ 5 дней) иммобилизационного стресса до и после процедуры производили оценку поведенческого и нейрохимического компонента стрессорного ответа [43].

Данные воздействия использовались для моделирования различных компонентов посттравматического стресса, таких как острое стрессорное расстройство – при однократном воздействии (acute stress disorder ASD [328] и депрессии – при многократном воздействии стресса [192,193].

На рисунке 49 показан **процесс отбора животных по стратегиям поведения с использованием комплексного подхода**, указанного в главе 4 + См. приложение 1.

В группе крыс-самцов Вистар ($n = 60$) с помощью теста «УРАИ» были выделены животные с высокой и низкой активностью в стрессогенных условиях, а при помощи теста «конкуренция за витальный ресурс» - воду был определен их социальный статус в клетке. В результате сопоставления данных двух тестов было показано, что 42% высоко активных животных, выявленных по тесту «УРАИ», являлись носителями доминантного социального статуса, а 75%

животных с пассивной стратегией поведения занимали субординантный социальный статус (рисунок 49+ приложение 1).

С использованием тестов: «УРАИ» и «конкуренция за витальный ресурс» (рисунок 49), были сформированы экспериментальные группы (рисунок 49) (по 17 животных в группе): «активные доминанты» и «пассивные субординанты». Критерий отбора - более 70% реакций «избегания» – «активные животные» (тест «УРАИ»), высокое количество агрессивных контактов, латентный период подхода к поилке - менее 10% от общего времени тестирования. В результате отбора количество доминантов в сформированной группе «активные доминанты» составило 84%, а субординантов в группе «пассивные субординанты» - 88% (рисунок 49 + приложение 1).

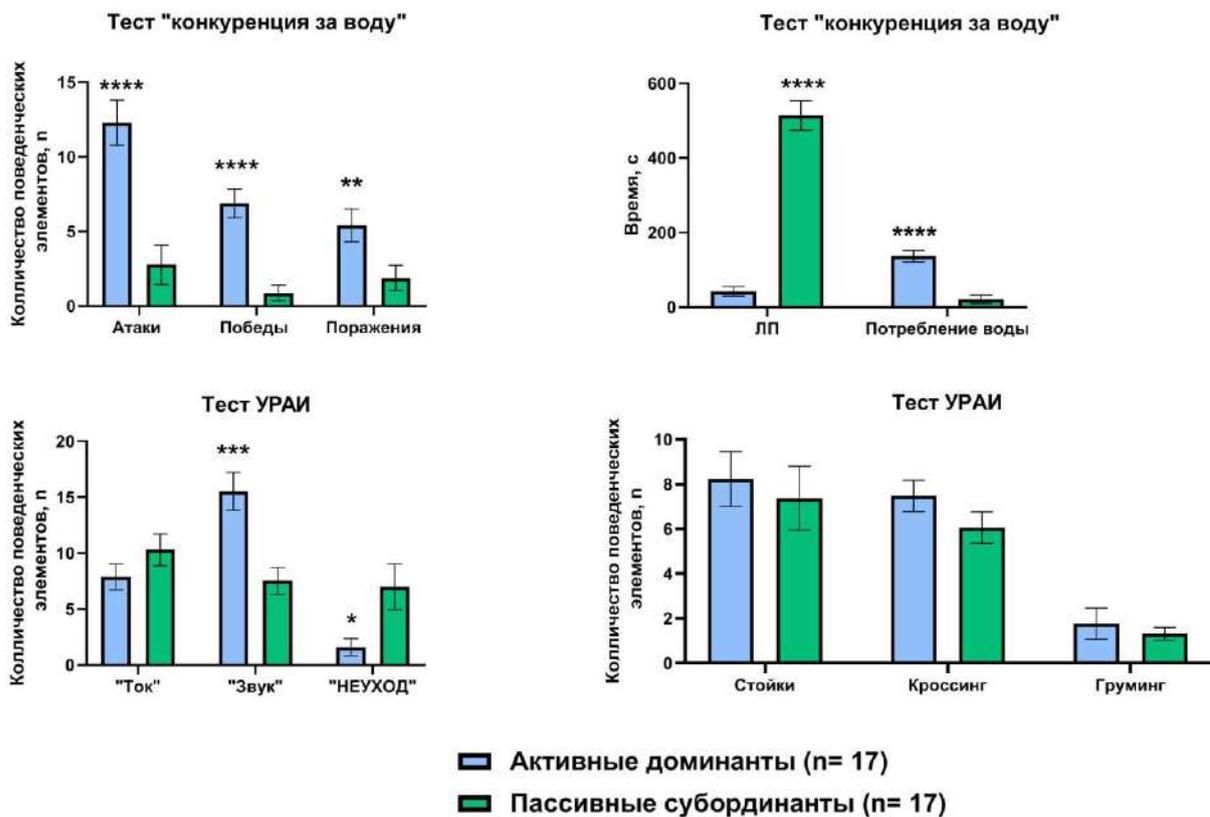


Рисунок 49. Поведенческие характеристики животных групп «активные доминанты» и «пассивные субординанты» в тестах «УРАИ» и «конкуренция за воду». ЛП – латентный период подхода к поилке. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего. * - $P = 0.0254$; ** - $P \leq 0.002$; **** - $P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный t-тест.

В результате такого отбора животные «активные доминанты» АД в отличие от «пассивных субординантов» ПС демонстрировали значительное количество ($P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни): атак, побед; так же поражений ($P = 0.0014$; непараметрический тест Манна

ПНО (предпочтение нового объекта) в течение 1 ч (кратковременная память) и 24 ч (долговременная память), ЧД (частота дыхания) за 60 секунд, болевой порог (тест tail flick или горячая пластинка, замер производили при температуре 20 градусов С), тест Порсолта. Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. # - $P = 0.080$; * - $P \leq 0.05$; непараметрический тест Манна Уитни.

В нашем исследовании мы использовали тест Порсолта в качестве неизбежного кратковременного стрессорного раздражителя (таблица 7). Исследование поведенческих показателей крыс АД и ПС после действия такого стрессора выявило достоверное снижение общей двигательной активности в тесте ПКЛ у крыс группы ПС ($P = 0.0048$; параметрический непарный т-тест) и сильную тенденцию к такому снижению в группе АД ($P = 0.0576$; параметрический непарный т-тест) после стресса по сравнению с фоновыми показателями группы. Достоверное увеличение груминга, как показателя смещенной реакции после действия стрессора было обнаружено в группе АД ($P = 0.023$; непараметрический тест Манна Уитни) по сравнению с фоновыми показателями группы. Статистически значимого изменения тревожности после действия неизбежного кратковременного стресса не было обнаружено.

Сроки	Группы животных	ПКЛ Количество пройденных квадратов	ПКЛ Длительность стоек, %	ПКЛ Длительность груминга, %	ПКЛ Время в открытых рукавах, %	ПКЛ Время в закрытых рукавах, %	ЧД за 60 с
До стресса	АД	26.4 \pm 3.4	3.5 \pm 0.9	7.2 \pm 1.6	29.4 \pm 6.2	70.6 \pm 6.2	182.4 \pm 4.4
	ПС	26.3 \pm 3.5	4.5 \pm 0.8	14.6 \pm 2.6	16.6 \pm 2.5	83.3 \pm 5.1	184.7 \pm 4.3
После стресса	АД	17.6\pm3.0#	4.0 \pm 1.0	20.3\pm4.0*	15.9 \pm 5.8	78.2 \pm 7.5	172.7 \pm 6.6
	ПС	13.8\pm2.1**	4.7 \pm 1.1	24.2 \pm 5.6	22.9 \pm 7.7	77.1 \pm 7.71	179.7 \pm 4.1

Таблица 7. Поведенческие показатели у крыс «активные доминанты» АД и «пассивные субординанты» ПС после однократного кратковременного стресса. Для создания кратковременного стрессорного воздействия (однократный стресс) использовалась процедура б-ти минутного неизбежного плаванья (тест Порсолта). Данные представлены в виде среднего, % \pm стандартная ошибка среднего. # - Тенденция по сравнению с фоновыми значениями в группе ($P < 0.1$); * - достоверность различий по сравнению с фоновыми значениями в группе; ** - $P \leq 0.05$; непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный т-тест.

В качестве субхронического 5-ти дневного неизбежного стрессорного воздействия использовали иммобилизацию (4ч\день\5дней). В результате такого воздействия у всех крыс опытных групп была обнаружена сильная стрессорная реакция, наблюдаемая в тесте ПКЛ, однако характер и выраженность данной реакции различалась между группами (таблица 8).

Сроки	Группы животных	ПКЛ Количество пройденных квадратов	ПКЛ Длительность стоек, %	ПКЛ Длительность груминга, %	ПКЛ Длительность «покоя», %	Время в открытых рукавах, %	Время в закрытых рукавах, %
До стресса	АД	26.4±3.4	3.5±0.9	7.2±1.6	47.3±5.5	29,4±6,2	70,6±6,2
	ПС	26.3±3.5	4.5±0.8	14.6±2.6	48.0±6.0	16,6±2,5	83,3±5,1
После стресса 1 день	АД	20.1±3.4	5.4±1.4	21.2±5.1**	40.1±5.4	11,7±3,2*	88.3±3.2*
	ПС	15.1±3.7*	8.4±1.2**	25.5±6.6	44.3±6.0	7.6±2.3*	92.2±2.3*
После стресса 5-й день	АД	14.2±2.8*	3.8±0.7	31.1±6.9*** *	42.1±5.6	11,7±6,2*	88,3±6,2* *
	ПС	13.4±3.1*	5.4±1.6	30.1±3,4**	48.6±6.9	3,7±1,2** *	96,3±3,7 ***

Таблица 8 Поведенческие показатели у крыс «активные доминанты» АД и «пассивные субординанты» ПС в тесте ПКЛ после 5-ти дневного иммобилизационного стресса. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего. # - Тенденция по сравнению с фоновыми значениями в группе ($P < 0.1$); * - достоверность различий по сравнению с фоновыми значениями в группе; ** - $P \leq 0.007$; **** - $P \leq 0.0005$ непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный t-тест.

На первый день стрессорного воздействия у животных группы ПС была обнаружена стрессорная реакция, выраженная в увеличении тревожности (достоверно увеличение времени нахождения в закрытых рукавах ПКЛ; $P = 0.0174$; параметрический непарный t-тест и снижение времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ по сравнению с фоном; $P = 0.0154$; параметрический непарный t-тест) и исследовательской активности в тесте ПКЛ ($P = 0.0067$; параметрический непарный t-тест), наряду со снижением двигательной активности (достоверное снижение количества пройденных квадратов по сравнению с фоном; $P = 0.045$, параметрический непарный t-тест). Напротив, у активных доминантов (АД), на первые сутки стресса, данная реакция выражалась в увеличении «груминга» по сравнению с фоном ($P = 0.0047$; непараметрический тест Манна Уитни) как показателя смещенной активности во время и после

стресса и так же в увеличении показателей тревожности (снижение времени нахождения в открытых рукавах по сравнению с фоном; $P = 0.0193$; непараметрический тест Манна Уитни; увеличение времени нахождения в закрытых рукавах по сравнению с фоном; $P = 0.0194$; непараметрический тест Манна Уитни).

На пятый день неизбежного стрессорного воздействия у животных обеих групп было обнаружено достоверное снижение двигательной активности, выражаемое в снижении количества пройденных квадратов в ПКЛ по сравнению с фоном (АД и ПС: $P = 0.016$, параметрический непарный т-тест). Длительность груминга, как компонента смещенной активности, в группе АД была значительно увеличена по сравнению с фоном ($P \leq 0.0001$; непараметрический тест Манна Уитни) на 5-е сутки стресса и сильно увеличена по сравнению с фоном ($P = 0.0010$; параметрический непарный т-тест). Время в открытых рукавах ПКЛ значительно уменьшилось на 5-й день стресса в группах АД ($P = 0.0035$; параметрический непарный т-тест) и ПС ($P = 0.0004$; параметрический непарный т-тест). Время в закрытых рукавах ПКЛ значительно уменьшилось в группах АД ($P = 0.0034$; непараметрический тест Манна Уитни) и ПС ($P = 0.0005$; параметрический непарный т-тест). Таким образом, у животных ПС в большей степени, чем у АД увеличились значения тревожности в тесте ПКЛ на 5-й день стресса.

Стресс неблагоприятно повлиял на динамику массы тела (рисунок 50) обеих групп животных, однако, наибольшее влияние он оказал на животных группы ПС ($P \leq 0.0001$), но стоит заметить, что разброс значений в группе ПС больше, чем у АД, кроме того, из графика видно, что 3-е сутки стресса оказали наиболее неблагоприятное влияние на животных обеих групп.

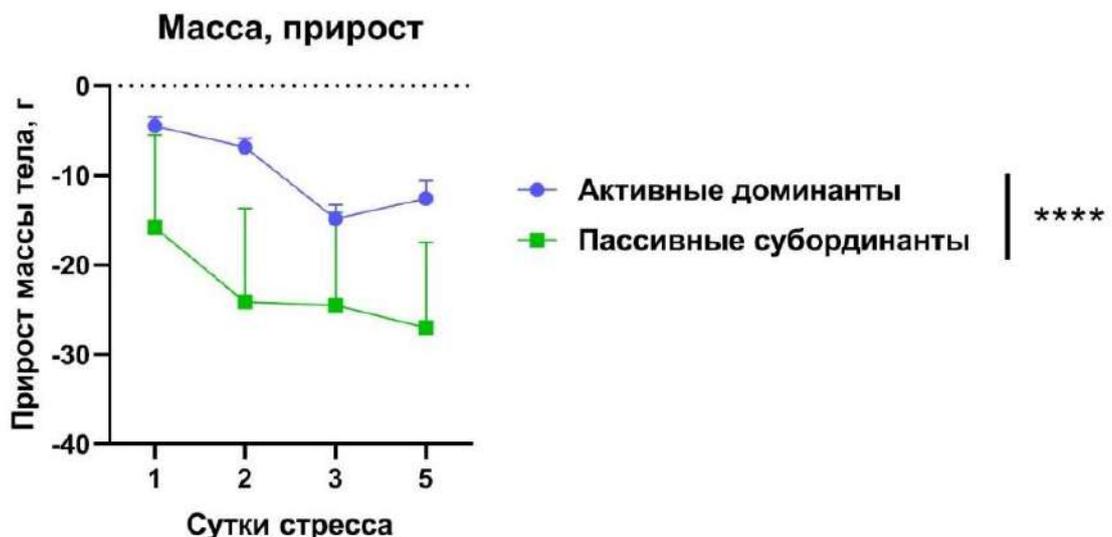


Рисунок 50. Изменение прироста массы тела у животных во время действия субхронического иммобилизационного стресса. По оси X – временная шкала стресса, сутках; по оси Y – прирост массы тела крыс, г. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего. **** - $P \leq 0.0001$; Two-Way ANOVA, повторяющиеся изменения.

В целом животные группы АД оказались наиболее подвержены стрессу, чем ПС, что мы можем наблюдать исходя из поведенческих экспериментов, проведенных до и после 5-ти дневного иммобилизационного стресса (рисунок 51). Так в группе АД, в отличие от ПС, наблюдалось достоверное снижение времени исследования обоих объектов ($P = 0.0010$; непараметрический тест Манна Уитни) по сравнению с фоном, без достоверных изменений в рейтинге предпочтении нового объекта через час после предъявления новых объектов (кратковременная память).

Кроме того, у АД в отличие от ПС наблюдалось снижение болевого порога под действием 5-ти дневного иммобилизационного стресса, что мы можем видеть в тесте «горячая пластинка», установленного на отметку $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, у животных группы АД наблюдалось достоверное уменьшение времени отдергивания хвоста по сравнению с фоном ($P = 0.0011$; непараметрический тест Манна Уитни). Так же, в группе АД обнаружено увеличение предпочтения 1% раствора сахара ($P = 0.0028$; непараметрический тест Манна Уитни) вместе со снижением потребления воды ($P = 0.0006$; непараметрический тест Манна Уитни) по сравнению с группами фона, в отличие от ПС (рисунок 51). Возможно, наблюдаемые изменения в группе АД могут быть следствием процессов дезадаптации.

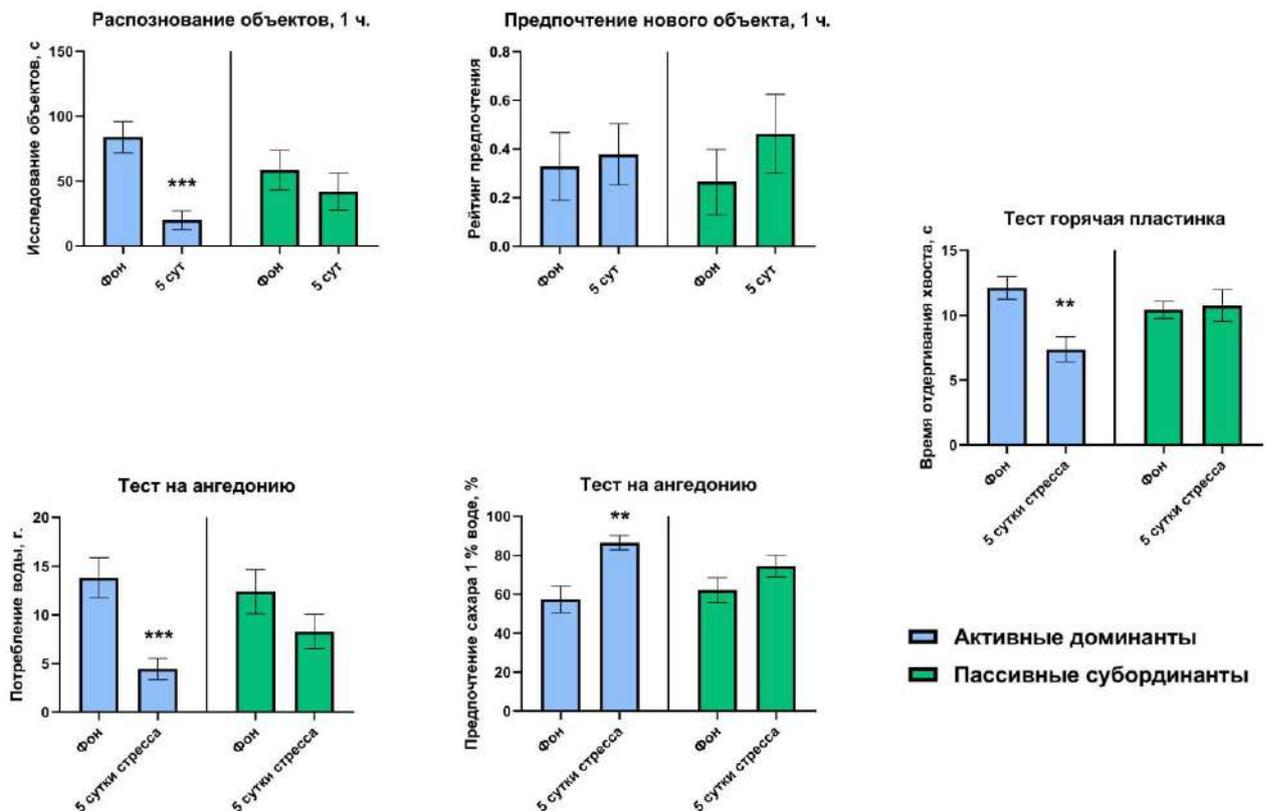


Рисунок 51. Поведенческие показатели у крыс в фоне и под действием субхронического иммобилизационного стресса. По оси X – временная шкала стресса в сутках; по оси Y – соответствующие показатели. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка

среднего. ** - достоверность различий по сравнению с фоновыми значениями в группе $P \leq 0.004$; **** - $P \leq 0.0010$ непараметрический тест Манна Уитни.

Стресс не повлиял на концентрацию липопротеидов, холестерина и др. (см приложение 1), однако обнаружено достоверное увеличение концентрации кортикостерона в крови у всех опытных крыс под действием 5-ти дневного иммобилизационного стресса (рисунок 52). Так на 1-е сутки стресса показано достоверное увеличение концентрации кортикостерона по сравнению с фоном ($P = 0.0159$; непараметрический тест Манна Уитни) и снижение на 5-е сутки стресса ($P = 0.0497$; непараметрический тест Манна Уитни), наиболее ярко проявляющееся в группе АД ($P = 0.0485$; параметрический непарный t-тест) в отличие от ПС, где достоверных изменений по сравнению с фоном не было показано.

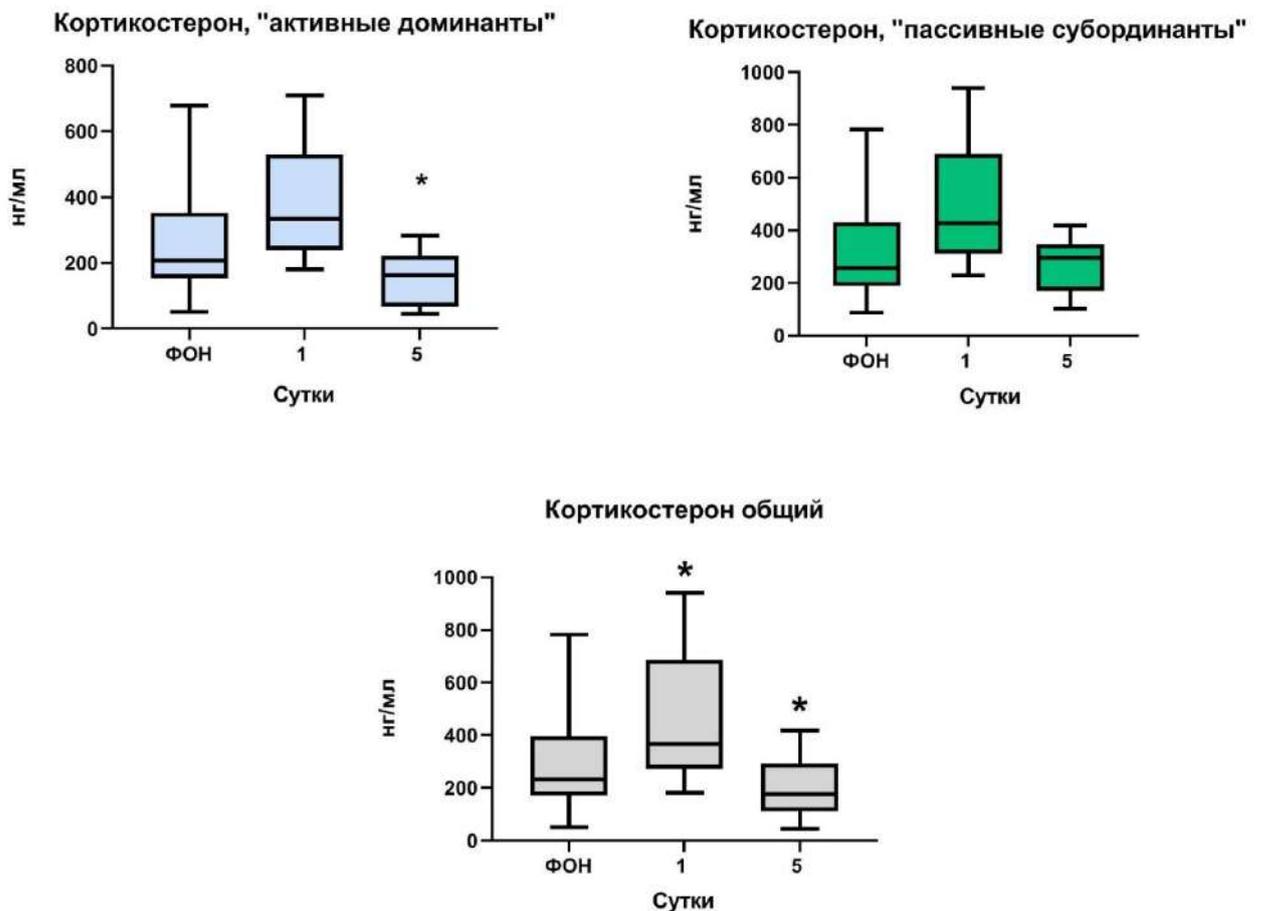


Рисунок 52. Изменения концентрации кортикостерона в крови у крыс «активные доминанты» и «пассивные субординанты» под действием субхронического иммобилизационного стресса. По оси X – временная шкала стресса в сутках; по оси Y – концентрация кортикостерона в плазме крови, нг/мл. График снизу отражает совокупные значения (АД+ПС), другие графики отражают значения по соответствующим группам. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная

ошибка среднего. * - достоверность различий по сравнению с фоновыми значениями в группе; $P < 0.05$; One-way ANOVA + непараметрический тест Манна Уитни или параметрический непарный t-тест.

Такое снижение концентрации кортикостерона может свидетельствовать о посттравматических изменениях в группе АД под действием 5-ти дневного иммобилизационного стресса.

Вклад ДА рецепторов в формирование депрессивно-подобного состояния у животных различной стратегии поведения после действия неконтролируемого субхронического иммобилизационного стресса.

Исследование количества Д1 и Д2 рецепторов в коре головного мозга (рисунок 53) контрольных и подверженных 5-ти дневному иммобилизационному стрессу крыс показало достоверное снижение ($P = 0.0031$; непараметрический тест Манна Уитни) Д1 и тенденцию ($P = 0.090$; непараметрический тест Манна Уитни) к снижению Д2 рецепторов у всех животных опытной группы по сравнению с интактным контролем. При групповом исследовании, было показано, что данная тенденция ярко выражена в группе ПС ($P = 0.0004$; непараметрический тест Манна Уитни) в отличие от АД, где достоверного изменения количества дофаминовых рецепторов под действием стресса не было обнаружено.

Таким образом, можно сказать, что данное изменение говорит о пластичности нейромедиаторных систем у ПС в отличие от АД, у которых и выше была показана явная дезадаптация под действием субхронического неизбежного стресса.

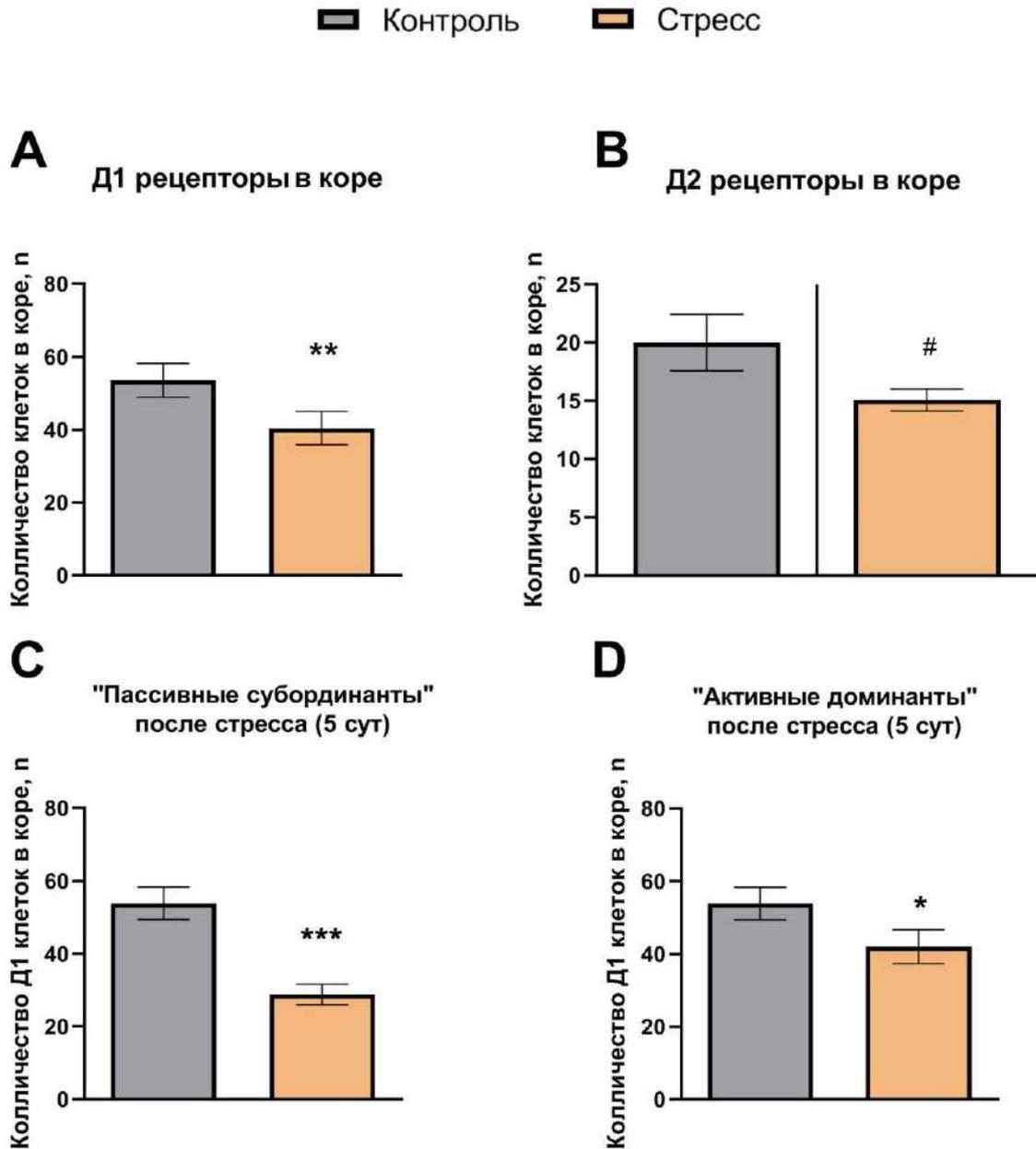


Рисунок 53. Снижение количества дофаминовых рецепторов в коре мозга крысы после 5-ти дневного иммобилизационного стресса. Данные представлены в виде среднего, $\% \pm$ стандартная ошибка среднего. # - Тенденция по сравнению с контролем ($P = 0.090$); * - достоверность различий по сравнению с контролем; ** - $P = 0.0031$; **** - $P = 0.0004$ непараметрический тест Манна Уитни.

- Является ли наблюдаемая в группе АД реакция – посттравматическим стрессом?

По данным литературы одной из важных характеристик посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР), отличающего его от депрессии является сниженный уровень кортикостерона, наблюдаемый вовремя или после стрессорного воздействия [362]. В нашем

эксперименте крысы подвергались действию иммобилизационного стресса 5-ть дней подряд. На первый день стресса, мы видим достоверное увеличение уровня кортикостерона у всех крыс, что явно говорит об активации ГГАС системы, однако, на 5-й же день мы видим достоверное снижение, наблюдаемое только в группе АД. Таким образом мы можем говорить о характерных посттравматических изменениях в группе АД по сравнению с ПС. Кроме того, неадекватное повышение предпочтения сахара в тесте на ангедонию, увеличение болевого порога, снижение исследовательской активности в тесте по исследованию объектов – все эти поведенческие изменения свидетельствуют о развитии ПТСР у крыс АД в ответ на неконтролируемый длительный стресс.

- Вклад DA рецепторов в формирование ПТСР у животных различной стратегии поведения после действия неконтролируемого субхронического иммобилизационного стресса

Обнаружено снижение D1 и тенденция к снижению D2 клеток в коре после действия 5-ти дневного иммобилизационного стресса. Однако, можно сказать, что данное изменение говорит о пластичности нейромедиаторных систем у ПС в отличие от АД, у которых и выше была показана явная дезадаптация под действием субхронического неизбежного стресса. Повышенная приспособляемость ПС в отличие от АД, была показана и в литературе [93], однако такое комплексное исследование с привлечением поведенческих и нейрохимических методик было проведено впервые.

Напротив, контролируемый крысой социальный стресс, где животное имеет возможность убежать или драться, приводит к меньшим поведенческим и нейрональным последствиям у «активных» самок Вистар, которых подвергали однократному социальному стрессу (см выше) или мы видим так же, небольшие изменения тревожности и активацию исследовательской активности у самцов ПС после однократного «Порсолта». Таким образом, стоит заметить, что не только характер, но и длительность стрессорного воздействия влияют на проявления стресса у животных разной стратегии поведения, что нельзя наблюдать до стрессорного воздействия, где различить животных с различной стратегией поведения невозможно ни на поведенческом ни на нейрохимическом уровне.

- Увеличение DA нейронпередачи как адаптивный процесс, наблюдаемый вовремя и после травмирующего стрессорного события

В процессе [19] и после стрессорного события [4,41] происходит повышение мезолимбического дофамина, данное увеличение обусловлено осмыслением стрессорной информации [1] и созданием мотивации для избавления от неблагоприятного стимула [363].

Было показано, что активация нейронов VTA ДА у крыс, подвергшихся воздействию неконтролируемого ХУС по П. Вилнеру, устраняет депрессивные симптомы у крыс, особенно ангедонию, напротив, ингибирование данных нейронов приводит к депрессии [21,364]. Таким образом, мы можем заключить, что наблюдаемое в нашей работе увеличение ДА концентраций играет адаптивную роль, незначительные изменения в тесте на ангедонию у самок и отсутствие этих изменений у самцов после единичного ССП, может так же свидетельствовать о положительном эффекте дофамина на эмоциональную сферу животного через 24 ч после стресса.

Пытаясь найти трансляционную значимость полученных данных для человека хотел бы упомянуть, что в литературе встречаются редкие упоминания о неспецифическом повышении настроения у людей после психотравмирующего воздействия [255]. Вероятно данное «повышение настроения» является следствием активации в том числе ДА системы, наряду с активацией ГГАС [30] и таким образом играет предиктивную роль, обеспечивая нормальное функционирование нервной системы в ответ на психотравмирующий стимул.

Однако, возможно и другое объяснение данного феномена. В литературе показано, что [17] существует различные типы реакции на стресс: «борьба и бегство» или «реакция затаивания». Реакцию «борьба и бегство» обеспечивает САС система, а реакцию затаивания – ГГАС. Выраженность действия данных систем и обеспечивает различный нейрохимических и поведенческий профиль наблюдаемых реакций. Однако исследования с помощью РЕТ у людей выявили положительную корреляцию между уровнем кортизола и дофамина [30,365].

Таким образом, в настоящее время сложно выявить определенную нейрональную цепочку, отражающую индивидуальные различия в стрессорной реакции, однако совершенно ясно что ДА нейротрансмиттерная передача играет важную роль в процессе реализации стрессорных реакций и адаптации.

- В результате, можно заключить, что субхронический иммобилизационный стресс неблагоприятно подействовал **на всех крыс**, вызывая у них разнонаправленные депрессивно-подобные изменения.
- Крысы «**активные доминанты**» (АД) демонстрируют пониженный адаптивный потенциал по сравнению с «**пассивными субординантами**» (ПС) к действию неконтролируемый иммобилизационный стресса.
- Крысы «**пассивные субординанты**» (ПС) демонстрируют больший адаптивный потенциал чем АД в ответ на неконтролируемый иммобилизационный стресс.

Эффективность антидепрессанта бупропиона для купирования симптомов, вызванных хроническим неконтролируемым стрессом у животных с различной стратегией поведения

Хронический умеренный неконтролируемый стресс считается наиболее адекватной моделью стресса повседневности. Для моделирования такого стресса у крыс Вистар использовали классическую схему П. Вилнера [10,169]. Для отбора крыс с активной и пассивной стратегиями стрессорного поведения использовался тест условного рефлекса активного избегания (УРАИ), который как показала предыдущая глава эффективен. Бупропион является селективным блокатором обратного захвата ДА и НА и эффективен как антидепрессант при хроническом и остром введении увеличивая уровень мезолимбического ДА в прилежащем ядре [366–368], в данном исследовании он используется после ХС в дозе 10 мг/кг. Схема эксперимента показана на рисунке 54.



Рисунок 54. Схема экспериментов 1-й и 2-й серии. В первой серии изучали действие стресса (ХС), во второй – после стресса половине крыс Вистар вводили физиологический раствор, второй половине – антидепрессант 10 мг/кг веса животного на протяжении 10 дней, далее проводили поведенческое тестирование. Те же поведенческие тесты, что и в III проводили после введения веществ. I, II, III – порядок поведенческих тестов и стрессорных процедур. ПКЛ – тест «приподнятый крестообразный лабиринт».

Известный факт, что крысы характеризуются постоянным приростом веса в течение жизни [369]. В наших результатах было показано, что за месяц в течение, которого осуществлялось стрессорное воздействие, не было обнаружено достоверного увеличения массы тела у животных, подверженных стрессу (рисунок 55), как в первой, так и во второй сериях экспериментов для животных активной и пассивной групп, так же под влиянием бупропиона (БУП). Было обнаружено достоверное ($P = 0.030$, непараметрический тест Манна Уитни)

снижение потребления раствора сахарозы у крыс активной и пассивной групп, что свидетельствует о состоянии ангедонии у всех крыс после месячной процедуры ХС.

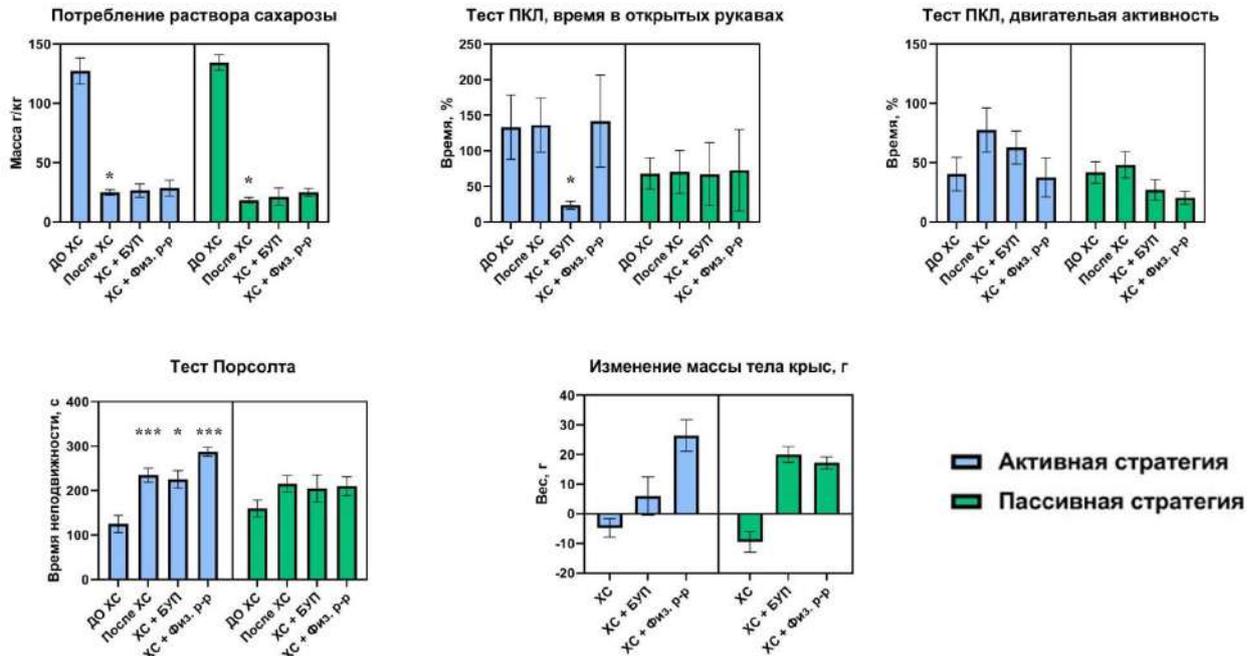


Рисунок 55. Поведенческие изменения, особенно выраженные у «активных» крыс после 28-ми дневного хронического неконтролируемого стресса (ХС) и последующего введения антидепрессанта бупропиона (БУП) в течение 10 дней в дозе 10 мг/кг. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. * - $P \leq 0.03$; ** - $P \leq 0.002$; *** - $P \leq 0.0005$, непараметрический тест Манна Уитни.

В тесте ПКЛ было обнаружено статистически значимое снижение времени нахождения крыс в открытых рукавах лабиринта ($P = 0.045$, непараметрический тест Манна Уитни), что может свидетельствовать дезадаптации крыс «активной группы» после действия ХС и снижения возможных посттравматических изменений, которые наблюдаются в «пассивной» группе. ХС не повлиял статистически значимо на показатели двигательной активности в ПКЛ ни в одной из групп.

По результатам теста Порсолта, мы можем видеть, что ХС значительно негативно повлиял на крыс с активной стратегией поведения, в отличие от «пассивных крыс». Время неподвижности в данном тесте достоверно снижено в группах: после ХС ($P = 0.0004$, непарный t -тест), ФИЗ ($P = 0.0007$, непараметрический тест Манна Уитни), так же, менее всего, в группе БУП ($P = 0.017$, непараметрический тест Манна Уитни).

Исходя из полученных данных можно заключить, что хронический умеренный неконтролируемый стресс, предъявляемый в течение 1 месяца, вызвал депрессивно-подобное поведение у крыс с активной стратегией поведения, тогда как на поведение крыс с пассивной стратегией поведения оказал более слабое влияние. Таким образом, эффект хронического умеренного неконтролируемого стресса на поведение крыс зависит от их стратегии поведения [46].

Нами показано, что антидепрессант бупропион, вводимый на протяжении 10 дней после месячного хронического умеренного неконтролируемого стресса (ХУС), не оказал влияние на тревожность крыс в ПКЛ, однако оказал выраженное антидепрессивное действие (снижение времени неподвижности в тесте Порсолта) на животных с активной стратегией поведения, то есть на животных у которых развилась депрессивно-подобное состояние после стресса. На животных с пассивной стратегией поведения антидепрессант не повлиял [47].

С помощью метода микродиализа на свободноподвижных крысах показано, что бупропион в большей степени при хроническом, в меньшей - при остром введении увеличивает концентрацию внеклеточного ДА в НАс и хвостатом ядре [370]. Таким образом, эффективность данного антидепрессанта, применяемого в клинической практике, может быть связано с его механизмом действия. Данная работа показывает избирательность действия данного препарата, что было нами опубликовано ранее [47].

Таким образом, антидепрессант бупропион показал свою эффективность для животных с **активной стратегией поведения.**

Глава 5. Поведенческие последствия эмоционального стресса, вызванного острым отравлением фосфорорганическими соединениями (новая модель ПТСР?)

Воздействие фосфорорганических соединений (ФОС) приводит к ингибированию ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и, как следствие, к неконтролируемому увеличению уровня синаптического ацетилхолина [371]. В зависимости от дозы и продолжительности воздействия ФОС, на протяжении нескольких часов после острого отравления наблюдаются параличи, судороги, сердечные аритмии, возможна остановка дыхания и гибель организма [371]. У людей, выживших при остром отравлении ФОС, отмечаются изменение настроения, депрессия, ухудшение когнитивных процессов и памяти, вследствие гибели нейронов фронтальной коры и гиппокампа [372], так же ухудшение координации движений и локомоции [373]. Когнитивные нарушения, связанные с принятием решений, вниманием и мотивацией у пациентов при этом могут сохраняться на протяжении нескольких лет после однократного отравления ФОС, что может свидетельствовать, по мнению авторов о развитии посттравматического стрессорного расстройства [373,374].

В модельных экспериментах на крысах при отравлении ФОС установлено снижение двигательной и стереотипической (груминг) активности, наблюдается моторный, эмоциональный и когнитивный дефицит, свидетельствующий о наличии депрессивно-подобного состояния [375,376]. Одной из причин развития депрессии на после воздействия ФОС может являться стресс. Сильное эмоциональное воздействие может вызывать серьезные длительные посттравматические изменения в организме (депрессия, повышенная реактивность, сниженная мотивация, апатия) даже через месяц после однократного воздействия [38,39,177,377].

В данной диссертации показано, что отравление ФОС может вызывать депрессивно-подобное состояние не только у переживающих воздействие ФОС животных, но и у животных находящихся в одной клетке с «отравленными». Такие животные постоянно подвергаются действию социального стресса, который, как показано в литературе, вызывает депрессивные расстройства и симптомы ПТСР при хроническом предьявлении [378–380].

С помощью системы круглосуточного мониторинга активности животного «Лаборас» и других поведенческих тестов удалось показать, что в ответ на однократное воздействие фосфорорганическими веществами (ФОС) животные испытывают значительные поведенческие изменения, которые сохраняются до 1 мес. (снижение двигательной, исследовательской-эмоциональной активности, увеличение депрессивности, снижение когнитивной активности). Значительные поведенческие депрессивно-подобные изменения наблюдаются так же у животных

группы «стресс», находящимися в одной клетке с опытными животными в течение 40-60 сут после интоксикации.

В течение нескольких часов после однократного введения параоксона в экспериментальных группах РОХ2х (крысам был введен параоксон в дозе 0,6ЛД50 через час после введения параоксона в дозе 0,45ЛД50) и СВРОХ (крысам был введен параоксон в дозе 0,6ЛД50 через час после введения СВDP в дозе 3,3 мг/кг) у животных наблюдались первичные клинические проявления отравления (судороги и возможная остановка дыхания), характерные для интоксикации ФОС. Через 24 ч после острого отравления ФОС у выживших крыс были обнаружены вторичные неврологические проявления отравления ФОС, проявляемые в повышенной реакции на звуковой стимул (хлопок) выраженная в интенсивном вздрагивании в группе РОХ2х у 62% крыс, а в группе СВРОХ – у 25% в отличие от фоновых показателей. Через неделю после отравления у 75% животных обеих групп показатели возбуждения ЦНС не отличались от фоновых показателей.

По сравнению с фоновыми показателями, вплоть до 4-й недели после отравления ФОС у всех крыс опытных групп наблюдалось снижение общей двигательной (примерно в 2 раза в первые сутки) и исследовательской активности (снижение на 15-20% в первые сутки), так же увеличение времени неподвижности (сна) ($P < 0.001$, Two-Way ANOVA) (рисунок 56).

Когнитивный дефицит (тест распознавания нового объекта) ($P < 0.05$; непараметрический тест Манна Уитни) и депрессивно-подобное состояние (тест Порсолта) сохранялось до 60-ти суток после отравления ФОС во всех опытных группах, особенно в группе СВРОХ ($P < 0.005$; непараметрический тест Манна Уитни) (Приложение 1).

Примечательно, что у животных группы «стресс», находящегося в одной клетке с крысами, подвергшимися воздействию ФОС (Рисунок 56), были отмечены проявления депрессивного и посттравматического состояния (ПТСР). На первые сутки было обнаружено снижение двигательной ($P < 0.005$, Two-Way ANOVA) и исследовательской (тест распознавания объектов (* - $P < 0.05$; непараметрический Манн-Уитни тест) активности у животных группы «стресс» по сравнению с фоном. Но особенно значительные изменения, свидетельствующие о развитии ПТСР у этих крыс, были замечены через 27 дней после стресса: значительное снижение суточной двигательной ($P < 0,0001$, Two-Way ANOVA), исследовательской активности ($P < 0,005$, Two-Way ANOVA), увеличение времени неподвижности (сна) ($P < 0,001$, Two-Way ANOVA), снижение потребление еды ($P < 0,005$, Two-Way ANOVA).

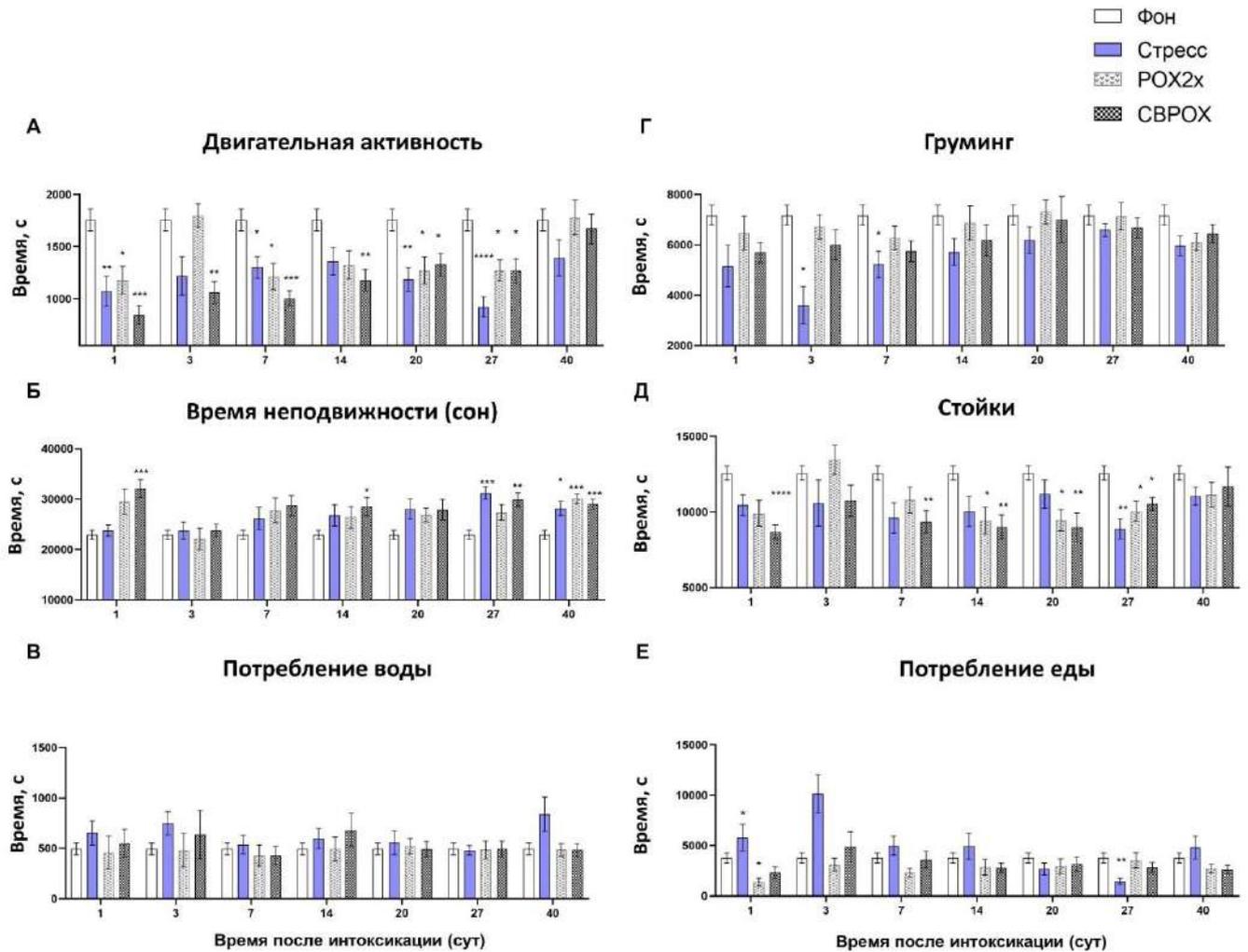


Рисунок 56. Угнетение поведенческой активности у крыс после острого отравления фосфорорганическими веществами РОХ и СВРОХ. Поведение животных (А – Е) в течение 40 суток в группах: РОХ2х (n=15) и СВРОХ (n=15), Стресс (n=15), Фон (n=30). По оси X – время после интоксикации, сут.; по оси Y – время, манифестации данного поведенческого элемента в течение 18 ч. Различия статистически значимы (* - $P < 0.05$; ** - $P < 0.005$, *** - $P < 0.001$, **** - $P < 0,0001$, Two-Way ANOVA) по сравнению с фоновыми показателями. Данные представлены как $M \pm m$.

Интоксикация ФОС приводит к значительному ухудшению неврологического состоянию крыс на первые сутки после интоксикации. Первичные клинические симптомы (судороги) связаны, по данным литературы, со стимуляцией холинергических мускариновых рецепторов головного мозга (mAХР), которые вызывает стойкие тонико-клонические судороги [381], так же с выбросом глутамата [382]. Возможная остановка дыхания может быть связана с торможением соответствующих отделов продолговатого мозга.

Дальнейшие поведенческие изменения связаны уже с гибелью нейронов различных отделов мозга ввиду интоксикации, оксидативного стресса, воспалительных процессов. Мишенью для таких изменений становятся различные отделы лимбической системы: миндалина, гиппокамп, таламус, кора и др. Таким образом, данные нарушения становятся причиной депрессивных и посттравматических изменений у крыс [382]. В нашей работе мы показали, что данные изменения сохраняются до 60-ти дней после однократного введения ФОС.

Так, в течение первых суток после отравления у крыс обеих экспериментальных групп снижается общая двигательная и исследовательская активность (в клетке и в процессе распознавания нового объекта), увеличивается время неподвижности, ухудшаются показатели мелкой моторики, уменьшается время потребления корма, снижается масса тела и развивается когнитивный дефицит. Снижение вертикальных стоек, равно как и исследования нового объекта, у отравленных животных в течение всего периода наблюдений после отравления свидетельствует о снижении мотивации к исследованию окружающего пространства [383], что также может служить одной из причин сниженного потребления корма и уменьшения массы тела в период до 2-х недель [384]. Депрессивно-подобное состояние у животных характеризуется снижением моторного, эмоционального и когнитивного компонентов [385]. Налицо развитие депрессивно-подобного состояния у крыс после интоксикации ФОС с признаками токсикологического отравления. Важно отметить, что после периода восстановления поведенческих и физиологических показателей на 3-7 сутки после отравления происходит ухудшение показателей в более поздние сроки (4-11 недель). Эти данные согласуются с данными [384], согласно которым, периодическое ухудшение состояния животных в отдаленные сроки характерно при остром отравлении ФОС.

Нами установлено, что совместное содержание животных группы «стресс» с животными, подвергавшимися интоксикации ФОС, приводит к значительным эмоциональным изменениям у данных крыс. Эти изменения свидетельствуют о развитии ПТСР у этих животных. По данным литературы [38,39,386] ПТСР именно 1 месяц является критическим периодом при котором наблюдаются характерные депрессивно-подобные признаки.

- В наших исследованиях показано, что даже бесконтактное эмоциональное воздействие может приводить к значительным и длительным изменениям в организме крысы

Основными критериями ПТСР при моделировании данного заболевания на животных являются: участник или свидетель психотравмирующего события (+), депрессивно-подобные симптомы (+), когнитивные нарушения (+), нарушения сна (+), симптомы сохраняются или

проявляются через месяц (+), не эффективность фармакологической коррекции (не знаем), сниженный уровень кортикостерона (не знаем) [38,177].

- Однократная интоксикация ФОС приводит к поведенческим и когнитивным нарушениям. У животных наблюдаются явные признаки и депрессивно-подобного состояния. Данные нарушения ярко выражены в первые сутки после интоксикации, с небольшим восстановлением на 3-7 сутки и ухудшением показателей на сроках 4 - 11 недель.
- Модель длительного бесконтактного психоэмоционального воздействия на крыс после однократного острого отравления ФОС крыс-соседей, может считаться еще одной моделью ПТСР и отвечает большинству валидационных критериев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) Однократный стресс социального поражения привел к значительным изменениям в ДА нейротрансмиттерной передаче и поведении у самцов и самок крыс через 24 ч после воздействия. Данные изменения более выражены у крыс с пассивной стратегией стрессорного поведения

Однократный стресс социального поражения (как и однократный стресс неизбежного плавания) оказал влияние на меньшее количество поведенческих параметров (увеличение тревожности, изменения в когнитивных способностях), чем другие виды стресса (субхронический, длительный и др.).

На животных с **активной стратегией поведения** кратковременный стресс не оказывал какого-либо значимого (статистически достоверного) воздействия на поведенческом или нейрохимическом уровнях.

Все наблюдаемые постстрессорные изменения были выражены преимущественно у животных с **пассивной стратегией поведения** (во время стресса). Стоит отдельно подчеркнуть, что в отличие от небольших, но статистически значимых поведенческих изменений у животных с пассивной стратегией наблюдались также значительные изменения в ДА нейротрансмиттерной передаче (увеличенный ДА ответ, сниженная скорость восстановления ДА после его принудительного истощения) по сравнению с животными с активной стратегией поведения и контролем.

2) Хронический умеренный и субхронический иммобилизационный стресс неблагоприятно повлиял на всех животных, однако выраженные депрессивно-подобные изменения были обнаружены только у животных с активной стратегией стрессорного поведения

По результатам проведенных исследований влияния хронических стрессоров, можно заключить, что в зависимости от длительности стрессорного воздействия у животных наблюдаются различные физиологические, нейрохимические и поведенческие реакции, которые также различаются в зависимости от стратегии поведения. Хронический стресс привел к увеличению показателей тревожности, снижению двигательной активности, массы тела и ухудшению когнитивных функций, кроме того, к изначальному снижению (1 сутки) и последующему увеличению (5 сутки) концентрации кортикостерона, изменению плотности ДА рецепторов и другим нарушениям у животных. Однако, не все животные оказались подвержены неблагоприятным последствиям от хронического стрессорного воздействия.

Длительные стрессорные воздействия вызывали у животных с **активной стратегией поведения** депрессивно-подобное состояние, наряду с физиологическими изменениями (массы тела, болевая чувствительность) и изменением биохимическими параметров крови (снижение концентрации кортикостерона). Некоторые из этих наблюдаемых изменений у «активных крыс» эффективно корректировались с помощью антидепрессанта бупропиона.

Несмотря на то, что у **животных с пассивной стратегией поведения** не наблюдалось депрессивно-подобного состояние, а были лишь обнаружены тревожные и поведенческие симптомы наряду с достоверными изменениями в количестве дофаминовых D1 рецепторов эти факты позволили сделать заключение о наличии повышенной нейрональной адаптации у животных с пассивной стратегией поведения в ответ на действие субхронического неизбежного стресса.

Можно заключить, что эффективность поведенческой (копинг) стратегии зависит от длительности и типа стрессорного воздействия в котором она реализуется (схема 1).



Схема 1 Различная подверженность животных с активной и пассивной стратегией поведения к стрессорным воздействиям различной длительности.

Животные TRH2 КО демонстрируют повышенную агрессивность, чувствительность к стрессу и повышенное алкогольное потребление в отличие от животных TRH2 WT.

Было обнаружено, что животные TRH2 КО демонстрируют повышенные показатели агрессивности и потребления алкоголя по сравнению с животными TRH2 WT. Кроме того, однократный иммобилизационный стресс, примененный после приучения животных к алкоголю в течение 3 мес., провоцировал дальнейшее повышение потребления алкоголя у данных животных. Сделано предположение, что нарушения в мотивационной сфере у таких крыс связаны с наблюдаемой нами дисрегуляцией в дофаминовой нейротрансмиссии у животных TRH2 КО. Полученные данные указывают на нарушение синтетических процессов в ДА системе, и как следствие, на увеличение потребления алкоголя и агрессивным действиям. Кроме того, самки и самцы TRH2 КО являются адекватными модельными объектами, которые могут быть использованы для создания агрессивной среды в исследованиях по моделированию стресса социального поражения.

3) Хронический психоэмоциональный стресс приводит к развитию выраженного посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) у крыс, которое сохраняется на протяжении минимум 60 дней.

Однократная интоксикация ФОС приводит к поведенческим и когнитивным нарушениям. У животных наблюдаются явные признаки депрессивно-подобного состояния. Модель хронического бесконтактного психоэмоционального воздействия на крыс после однократного острого отравления ФОС крыс-соседей, может считаться приемлемой моделью ПТСР и отвечает большинству валидационных критериев.

Таким образом, изменения в дофаминергической нейромедиаторной нейротрансмиссии (наряду с поведенческими, физиологическими и биохимическими изменениями) могут служить показателями адаптационных процессов в организме, направленными на преодоление стресса и приведение организма к гомеостазу.

ВЫВОДЫ

1. В результате применения комплекса поведенческих методов были сформированы базовые поведенческие различия между животными с активной или пассивной стратегией стрессорного поведения.
2. Через 24 часа после однократного стресса социального поражения у всех животных (у самцов и у самок) наблюдалась значительная активация мезолимбического ДА ответа, а также были обнаружены дезадаптивные изменения в Д2 ауторецепторной регуляции ДА у стрессированных самцов по сравнению с контрольными животными.
3. Самцы и самки демонстрировали различные поведенческие отклонения через 24 ч после однократного стресса социального поражения.
4. Единичный стресс социального поражения вызвал состояние ангедонии и другие поведенческие отклонения, также значительные изменения в мезолимбической ДА нейротрансмиссии у самок крыс через 24 ч, наиболее выраженные у крыс с пассивной стратегией поведения в отличие от животных с противоположной активной стратегией и контролем.
5. Единичный неизбежный стресс в большей степени повлиял на животных с пассивной стратегией поведения, у которых было показано значительное снижение двигательной активности по сравнению с фоновыми значениями в отличие от животных с активной стратегией поведения, демонстрирующих лишь увеличение смещенной активности в ответ на стресс.
6. Субхронический иммобилизационный стресс (5 дней) привел к значительным депрессивно-подобным изменениям у всех стрессированных животных, что проявлялось в характерных изменениях поведенческой активности и физиологических показателей, а также к увеличению, а затем к дезадаптивному снижению концентрации кортикостерона и плотности Д1 рецепторов в коре головного мозга.
7. Наблюдаемые значительные депрессивно-подобные поведенческие, физиологические, биохимические и нейрохимические изменения, вызванные действием субхронического иммобилизационного стресса, были ярко выражены лишь у животных с активной стратегией поведения. У животных с пассивной стратегией не было обнаружено выраженного депрессивно-подобного состояния, а лишь наблюдались признаки тревожного расстройства. Причиной данного феномена могут служить обнаруженные значительные адаптивные нейрональные ДА перестройки у «пассивных» животных (снижение плотности Д1 рецепторов в коре), по сравнению с «активными».

8. Дезадаптация и депрессивно-подобное состояние продемонстрированы у животных с активной стратегией поведения после действия хронического неизбежного стресса. Данный стресс не вызвал депрессивно-подобного состояния у животных с пассивной стратегией поведения.
9. Антидепрессант бупропион, эффективно корректировал поведенческие отклонения, вызванные действием хронического умеренного неконтролируемого стресса у животных с активной стратегией поведения.
10. У животных ТРН2 КО наблюдалась увеличение потребления сладких и алкоголь-содержащих растворов, так же наблюдались повышенные показатели агрессии и стресс-индуцированного потребления алкоголя по сравнению с животными WT. У животных ТРН2 КО в отличие от животных WT наблюдалось снижение параметров восстановления ДА после процедуры ДА истощения.
11. Хронический психоэмоциональный стресс привел к развитию выраженного посттравматического стрессорного расстройства (ПТСР) у животных, которое сохранялось на протяжении минимум 60 дней.

Список используемых сокращений

- АД – активные доминанты
- АХ – ацетилхолин
- ВЭЖХ (HPLC) – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАМК - гамма-аминомасляная кислота
- ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (НРА)
- ГЛУ – глутамат
- Д1, Д2, Д3 – дофаминовые рецепторы 1,2,3 типов
- ДА – дофамин
- ДА ОК – Дофамин ортокуинон
- ДАТ – дофаминовый транспортер
- ИГХ – иммуногистохимический анализ
- КРГ – кортиколебирин
- НА – норадреналин
- НВ – наркотические вещества
- НВ – наркотические вещества
- оФК – орбитофронтальная кора
- ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
- ПС – пассивные субординанты
- ПТСР - посттравматическое стрессорное расстройство
- пФК – префронтальная кора
- САС – симпато-адреналовая система (SAS)
- СЕР – серотонин
- УР – условный рефлекс
- УРАИ – условный рефлекс активного избегания
- ФОС – фосфоорганические соединения
- ХУС – хронический умеренный неконтрполируемый стресс
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- 5-НТ_{1А}– серотониновые рецепторы 1-го типа
- 5-НТ_{2В} – серотониновые рецепторы 2-го типа
- СВDP – ингибитор карбоксилэстеразы плазмы крови
- СВРОХ – параоксон + ингибитор карбоксилэстеразы плазмы крови
- DSM - диагностическое и статическое руководство психических расстройств
- FSCV in vivo – метод быстрой сканирующей вольтамметрии

НАВ – линия крыс с высоким уровнем избегания в УРАИ

КНА – линия крыс Roman High avoidance

КНА – линия крыс Koltushi High avoidance

КЛА – линия крыс Koltushi Low avoidance

ЛАВ – линия крыс с низким уровнем избегания в УРАИ

НАс – прилежащее ядро

РОХ – параоксон

Ref – электрод сравнения (Ag/Ag Cl)

RLA – линия крыс Roman Low avoidance

SE – стимулирующий электрод

TAAR 1 - рецептор следовых аминов первого типа

TRH1,2 – гены триптофан гидроксилазы TH 1-го и 2-го типов

VTA – вентральная область покрышки

WE – рабочий электрод.

Сведения об авторе диссертации**Всеволод Владимирович Немец****Должность:** Младший научный сотрудник Института трансляционной биомедицины СПбГУ

Дата рождения: 06.02.1988

Контакты: v.v.nemets@spbu.ru**Специализация:** нейрохимия, вольтамметрия in vivo, нейробиология поведения**Образование:** (01.09.2019 – 01.09.2023) Аспирантура (до этого бакалавриат и магистратура) СПбГУ.**Тематика в аспирантуре:** Изучение последствий стресса социального поражения и дофаминовой динамики в прилежащем ядре с помощью метода вольтамметрии in vivo и поведенческих методик.**Общая тематика исследований:** Применение метода вольтамметрии in vivo и поведенческих методик в нейробиологических исследованиях.**Навыки:** Внедрение и использование метода быстрой сканирующей вольтамметрии для детекции дофамина в мозге грызунов, изготовление и калибровка детектирующих электродов; поведенческие методы - (тесты на тревожность, локомоторную активность, когнитивные тесты, агрессивное поведение и т. д.), статистические методы с использованием GraphPad Prism 8; молекулярные методы - генетическая идентификация нокаутных крыс/мышей с использованием ПЦР, электрофореза и т. д., цитологические методы - идентификация эстрального цикла у крыс и мышей, экстракция образцов головного мозга крыс (NAc, Cortex, HS, Hypp и т. д.), преподавание.**Научные интересы:** Стресс, ПТСР, депрессия, тревожные расстройства, агрессия, нейрохимия, циклическая вольтамметрия, дофамин, индивидуальное поведения, алкогольная зависимость и др.**Языки:** русский, английский.**Международные школы:**

05.2021 – Научно-технологический университет Сириус, Россия. Школа «Нейробиология и трансляционная биомедицина», 150 часов.

03-06.2020 – Стажировка в Медицинской школе Университета Уэйк Форест, Кафедра нейробиологии, Северная Каролина, США.

12.2010г. – Международная школа нейробиологии ВЮН, участник. «Нейробиотехнология 2010» 28 сентября 2010 г. Москва (Бекасово).

Награды и достижения

- 2019 – настоящее время – Член гранта Санкт-Петербургского государственного университета.
- 07.2021 – Лучшие тезисы на международной конференции ECNP, Travel Grant
- 05.2021 – II место, лучший реферат на Биомедицинском форуме им. Алмазова, Россия, Санкт-Петербург
- 12.2020 – Лучшие тезисы на международной конференции ECNP.
- 2017 – 2018 гг. – Член гранта Российского научного фонда. Грант 16-15-00199
- 05.2010 – Лауреат стипендии 15-го съезда молодых ученых СПбГУ.

Список собственных публикаций

1. **Nemets, V.V.**; Deal, A.L.; Sobolev, V.E.; Grinevich, V.P.; Gainetdinov, R.R.; Budygin, E.A. Short-Term Consequences of Single Social Defeat on Accumbal Dopamine and Behaviors in Rats. *Biomolecules* 2023, 13, 35. <https://doi.org/10.3390/biom13010035>
2. **Nemets, V.V.**, Shmurak, V.I., Sobolev, V.E. et al. Effects of Transient and Prolonged Uncontrollable Stress on Animals of Dominant and Subordinate Social Status with Different Types of Stress Reactions. *Neurosci Behav Physi* 50, 618–624 (2020).
3. **Немец, В. В.**, Шмурак, В. И., Соболев, В. Е., Гарнюк, В. В., Рован, Е. Д., & Виноградова, Е. П. (2019). Влияние кратковременного и длительного неконтролируемого стресса на животных доминантного и субординантного социального статуса с различным типом стрессорной реакции. *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 105(5), 608-618. <https://rusjphysiol.org/index.php/rusjphysiol/article/view/108/187>
4. **Nemets V.V.**, Vinogradova E.P., Stress and neurobiology of coping styles. (in russ)/ *National Psychological Journal*, 2017. <https://npsyj.ru/en/articles/article/6892/>
5. **Немец В.В.**, Николаев А.И., Пшенов А.Б., Соболев В.Е., Виноградова Е.П. Новая модификация аппарата «челночная камера». *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;1(1):92-99. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-01-09>
6. Жуков, Д.А., **Немец, В.В.** & Виноградова, Е.П. 2019, 'Эффект бупропиона зависит от врожденной стратегии поведения крыс', *медицинский академический журнал*, Том. 19, № 2, 2, стр. 53-56. <https://doi.org/10.17816/maj19253-56>
7. Виноградова, Е.П., **Немец, В.В.** & Жуков, Д.А. 2013, 'Активная стратегия поведения как фактор риска депрессивноподобных нарушений после хронического умеренного стресса', *Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И.П. Павлова*, Том. 63, № 5, стр. 589-596. <https://doi.org/10.7868/S0044467713050109>

8. Гриневич В.П., **Немец В.В.**, Крупицкий Е.М., Гайнетдинов Р.Р., Будыгин Е.А. Роль дофамина и норадреналина в алкоголь-зависимом поведении: от корреляций к механизмам. Обзорение психиатрии и медицинской психологии имени В. М. Бехтерева. 2022;56(3):13-29. <https://doi.org/10.31363/2313-7053-2022-56-3-13-29>
9. **Nemets, V.V.**; Vinogradova, E.P., Zavialov, V.; Grinevich, V.P.; Budygin, E.A. Gainetdinov, R.R.; Accumbal dopamine responses are distinct between female rats with active and passive coping strategies. *Biomolecules* 2024, 14, 1280. <https://doi.org/10.3390/biom14101280>

Иные публикации по теме диссертации

10. **Nemets V.**, Zavyalov V., Chepik P., Gainetdinov R., Budygin E., P.0850 Different dopamine responses in female rats with aggressive and defensive stress coping, *European Neuropsychopharmacology*, Volume 53, Supplement 1, Page S622, ISSN 0924-977X, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.10.709>. (премия – лучшие тезисы на конференции ECNP, тревел грант).
11. **Nemets V.**, Deal A., Gainetdinov R. & Budygin E. 2020, 'Consequences of a single social defeat on accumbal dopamine measures: in vivo voltammetric study', *European Neuropsychopharmacology*, vol. 40, no. S1, pp. S479-480. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.709 (премия – лучшие тезисы на конференции ECNP).
12. **Nemets V.**, Zavyalov V., Budygin E., & Gainetdinov R. (2023). Influence of single social defeat stress on accumbal dopamine dynamics in female rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 455. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2023.122134>

Список докладов на международных конференциях

1. **Немец В.В.**, Виноградова Е.П., Жуков Д.А. «Влияние антидепрессанта бупропиона на депрессивно-подобное состояние, вызванное хроническим умеренным неконтролируемым стрессом». с. 20-21. Partisipate in Bion school “Neurobiotechnology 2010: Bioeconomy based on knowledge” September 28, 2010 Moscow Bekasovo (постерный доклад).
2. **Nemets V.V.**, Zavyalov VA, Chepik PA, Gainetdinov RR, Budygin EA, Exploring the consequences of a single social defeat stress on accumbal dopamine in male and female rats. //28th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior” – 2021. P. 21 (устный доклад)
3. **Немец В.В.**, Завьялов В.А., Чепик П.А., Гайнетдинов Р.Р. Определение дофаминового выброса у крыс методом быстрой сканирующей вольтамметрии/ Всероссийская

конференция с международным участием Алмазовский молодежный медицинский форум май 2021, (постерный доклад), 2 место в конкурсе постеров.

4. **Немец, В. В.** Завьялов В. А., Чепик П. А. Особенности дофаминового ответа у крыс после однократного стресса социального поражения / В. В. Немец, // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: Материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 года. Том XXV. – Санкт-Петербург: Общество с ограниченной ответственностью Издательский дом «Сциентиа», 2022. – С. 305-306. – EDN RMDEYA, (постерный доклад)
5. **Немец В.В.**, Завьялов В.А., Индивидуальные различия в дофаминовой нейротрансмиссии у самок крыс после действия стресса социального поражения// Конференция «Ломоносов-2023» (устный доклад).
6. **Немец В.В.**, Завьялов В.А., Чепик П.А., Куварзин С.Р. Нейрохимические особенности алкогольного потребления у крыс TRH2 нокаутов/VI ежегодная конференция ИТБМ СПбГУ с международным участием, Актуальные проблемы трансляционной биомедицины, (постерный доклад).
7. **Немец В.В.**, Куварзин С.Р., Завьялов В.А. Дисрегуляция дофаминовой нейротрансмиссии приводит к повышенной агрессии и алкоголизации у крыс TRH-2 нокаутов, Всероссийская конференция с международным участием Алмазовский молодежный медицинский форум 11-16 мая 2024. Трансляционная медицина, с 265. (постерный доклад).
8. **Немец В. В.**, Гайнетдинов Р. Р. Вольтамметрия *in vivo* как современный метод изучения дофаминергической системы в биомедицинских исследованиях. Десятая международная конференция по когнитивной науке: Тезисы докладов. Пятигорск, 26–30 июня 2024 г. В двух частях. Часть II. С 282. (постерный доклад).

Благодарности

Я благодарен очень большому количеству людей, прежде всего моим родителям, бабушкам, дедушке - за неоценимый вклад в мое становление как человека, моей жене Елене за огромную поддержку! Доценту кафедры ВНД СПбГУ Виноградовой Екатерине Павловне за большую поддержку и дружбу, Гриневичу Владимиру Павловичу за учебу о том, как надо писать статьи и демонстрировать себя как ученого, Валентине Гриневич и Алексу – за то, что учили меня вольтамметрии и были терпеливы и конечно же проф. Будыгину Евгению Александровичу за плечо помощи, мудрейшие слова, без него я бы не научился бы находить дофамин у крыс, писать статьи и т.д., конечно же проф. Гайнетдинову Раулю Радиковичу за то, что поддерживает, направляет меня в трудном пути становления как ученого и профессионала.

Так же, я хотел бы еще поблагодарить много людей: всю лабораторию ИТБМ за отличную и профессиональную атмосферу, отдельно Ефимову Евгению Викторовну за хорошие советы и навыки в выделении структур мозга, Юлию Симон за учебу об эстральных циклах у крыс, моего ученика Владислава Завьялова за готовность помочь и сотрудничество, Вольнову Анну Борисовну за мудрые наставления, Соболева Владислава Евгеньевича за помощь в гистологии и добрые слова, всю кафедру Высшей Нервной Деятельности СПбГУ и отдельно заведующего кафедры Александра Александра Алексеевича и Станкевич Людмилу Николаевну за хорошее отношение и учебу, проф. Жукова Дмитрия Александровича за базисный вклад в учение о типах стрессорной реакции и хорошее отношение, так же весь СПбГУ и его замечательных преподавателей за то, что я имел честь у них учиться и конечно же всем моим замечательным соавторам за большой труд и сотрудничество!

Список литературы

1. Cabib, S.; Puglisi-Allegra, S. The Mesoaccumbens Dopamine in Coping with Stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2012.
2. de Boer, S.F.; Buwalda, B.; Koolhaas, J.M. Untangling the Neurobiology of Coping Styles in Rodents: Towards Neural Mechanisms Underlying Individual Differences in Disease Susceptibility. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017, 74, 401–422.
3. Mällo, T.; Alttoa, A.; Kõiv, K.; Tõnissaar, M.; Eller, M.; Harro, J. Rats with Persistently Low or High Exploratory Activity: Behaviour in Tests of Anxiety and Depression, and Extracellular Levels of Dopamine. *Behav. Brain Res.* **2007**, 177, 269–281, doi:10.1016/J.BBR.2006.11.022.
4. Koolhaas, J.M.; Meerlo, P.; De Boer, S.F.; Strubbe, J.H.; Bohus, B. The Temporal Dynamics of the Stress Response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, 21, 775–782, doi:10.1016/S0149-7634(96)00057-7.
5. Holly, E.N.; Miczek, K.A. Ventral Tegmental Area Dopamine Revisited: Effects of Acute and Repeated Stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016, 233, 163–186.
6. Miczek, K.A.; Nikulina, E.M.; Shimamoto, A.; Covington, H.E. Escalated or Suppressed Cocaine Reward, Tegmental BDNF, and Accumbal Dopamine Caused by Episodic versus Continuous Social Stress in Rats. *J. Neurosci.* **2011**, 31, 9848–9857, doi:10.1523/JNEUROSCI.0637-11.2011.
7. Prabhu, V.V.; Nguyen, T.B.; Cui, Y.; Oh, Y.E.; Lee, K.H.; Bagalkot, T.R.; Chung, Y.C. Effects of Social Defeat Stress on Dopamine D2 Receptor Isoforms and Proteins Involved in Intracellular Trafficking. *Behav. Brain Funct.* **2018**, 14, 16, doi:10.1186/S12993-018-0148-5.
8. Denmark, A.; Tien, D.; Wong, K.; Chung, A.; Cachat, J.; Goodspeed, J.; Grimes, C.; Elegante, M.; Suci, C.; Elkhayat, S.; et al. The Effects of Chronic Social Defeat Stress on Mouse Self-Grooming Behavior and Its Patterning. *Behav. Brain Res.* **2010**, 208, 553–559, doi:10.1016/J.BBR.2009.12.041.
9. Xu, S.; Liu, Y.; Pu, J.; Gui, S.; Zhong, X.; Tian, L.; Song, X.; Qi, X.; Wang, H.; Xie, P. Chronic Stress in a Rat Model of Depression Disturbs the Glutamine–Glutamate–GABA Cycle in the Striatum, Hippocampus, and Cerebellum. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2020**, Volume 16, 557–570, doi:10.2147/NDT.S245282.
10. Willner, P. Validity, Reliability and Utility of the Chronic Mild Stress Model of Depression: A

- 10-Year Review and Evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. **1997**, *134*, 319–329.
11. D'Aquila, P.S.; Newton, J.; Willner, P. Diurnal Variation in the Effect of Chronic Mild Stress on Sucrose Intake and Preference. *Physiol. Behav.* **1997**, *62*, 421–426.
 12. Yang, L.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Liu, L.; Zhang, X.; Li, B.; Cui, R. The Effects of Psychological Stress on Depression. *Curr. Neuropharmacol.* **2015**, *13*, 494–504, doi:10.2174/1570159x1304150831150507.
 13. Kessler, R.C.; McGonagle, K.A.; Zhao, S.; Nelson, C.B.; Hughes, M.; Eshleman, S.; Wittchen, H.U.; Kendler, K.S. Lifetime and 12-Month Prevalence of DSM-III-R Psychiatric Disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch. Gen. Psychiatry* **1994**, *51*, 8–19, doi:10.1001/ARCHPSYC.1994.03950010008002.
 14. Shively, C.A.; Register, T.C.; Friedman, D.P.; Morgan, T.M.; Thompson, J.; Lanier, T. Social Stress-Associated Depression in Adult Female Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*). *Biol. Psychol.* **2005**, *69*, 67–84, doi:10.1016/J.BIOPSYCHO.2004.11.006.
 15. Nemets, V.V.; Vinogradova, E.P.; Zavialov, V.; Grinevich, V.P.; Budygin, E.A.; Gainetdinov, R.R. Accumbal Dopamine Responses Are Distinct between Female Rats with Active and Passive Coping Strategies. *Biomolecules* **2024**, *14*, 14.
 16. Ding, K.; Wang, F.; Wang, K.; Feng, X.; Yang, M.; Han, B.; Li, G.; Li, S. Environmental Stress during Adolescence Promotes Depression-like Behavior and Endocrine Abnormalities in Rats. *Behav. Brain Res.* **2024**, *457*, 114710, doi:10.1016/j.bbr.2023.114710.
 17. Жуков, Д.А. *Биологические Основы Поведения. Гуморальные Механизмы*; Юридический Центр Пресс: Санкт-Петербург, 2004;
 18. Anstrom, K.K.; Woodward, D.J. Restraint Increases Dopaminergic Burst Firing in Awake Rats. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *30*, doi:10.1038/sj.npp.1300730.
 19. Anstrom, K.K.; Miczek, K.A.; Budygin, E.A. Increased Phasic Dopamine Signaling in the Mesolimbic Pathway during Social Defeat in Rats. *Neuroscience* **2009**, *161*, 3–12, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.023.
 20. Holly, E.N.; Miczek, K.A. Repeated Stress. **2017**, *233*, 163–186, doi:10.1007/s00213-015-4151-3.Ventral.
 21. Belujon, P.; Grace, A.A. Regulation of Dopamine System Responsivity and Its Adaptive and

- Pathological Response to Stress. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015, 282.
22. Alcaro, A.; Huber, R.; Panksepp, J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: An Affective Neuroethological Perspective. *Brain Res. Rev.* **2007**, *56*, 283–321, doi:10.1016/j.brainresrev.2007.07.014.
 23. Grinevich, V.P.; Krupitsky, E.M.; Gainetdinov, R.R.; Budygin, E.A. Linking Ethanol-Addictive Behaviors With Brain Catecholamines: Release Pattern Matters. *Front. Behav. Neurosci.* **2021**, *15*, doi:10.3389/FNBEH.2021.795030.
 24. Silberman, Y.; Bajo, M.; Chappell, A.M.; Christian, D.T.; Cruz, M.; Diaz, M.R.; Kash, T.; Lack, A.K.; Messing, R.O.; Siggins, G.R.; et al. Neurobiological Mechanisms Contributing to Alcohol-Stress-Anxiety Interactions. *Alcohol* **2009**, *43*, 509, doi:10.1016/J.ALCOHOL.2009.01.002.
 25. Reguilón, M.D.; Montagud-Romero, S.; Ferrer-Pérez, C.; Roger-Sánchez, C.; Aguilar, M.A.; Miñarro, J.; Rodríguez-Arias, M. Dopamine D2 Receptors Mediate the Increase in Reinstatement of the Conditioned Rewarding Effects of Cocaine Induced by Acute Social Defeat. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *799*, 48–57, doi:10.1016/j.ejphar.2017.01.039.
 26. Grinevich, V.P.; Zakirov, A.N.; Berseneva, U. V.; Gerasimova, E. V.; Gainetdinov, R.R.; Budygin, E.A. Applying a Fast-Scan Cyclic Voltammetry to Explore Dopamine Dynamics in Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Cells* **2022**, *11*.
 27. Belujon, P.; Grace, A.A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2017**, *20*, 1036, doi:10.1093/IJNP/PYX056.
 28. Drury, S.S.; Theall, K.P.; Keats, B.J.B. The Role of the Dopamine Transporter (DAT) in the Development of PTSD in Preschool Children. *J. Trauma. Stress* **2009**, *22*, 534, doi:10.1002/JTS.20475.
 29. Seidemann, R.; Duek, O.; Jia, R.; Levy, I.; Harpaz-Rotem, I. The Reward System and Post-Traumatic Stress Disorder: Does Trauma Affect the Way We Interact With Positive Stimuli? *Chronic Stress* **2021**, *5*.
 30. Bloomfield, M.A.; McCutcheon, R.A.; Kempton, M.; Freeman, T.P.; Howes, O. The Effects of Psychosocial Stress on Dopaminergic Function and the Acute Stress Response. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/ELIFE.46797.
 31. Malikowska-Racia, N.; Sałat, K.; Nowaczyk, A.; Fijałkowski, Ł.; Popik, P. Dopamine D2/D3

- Receptor Agonists Attenuate PTSD-like Symptoms in Mice Exposed to Single Prolonged Stress. *Neuropharmacology* **2019**, *155*, 1–9, doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2019.05.012.
32. Meerlo, P.; Overkamp, G.J.F.; Koolhaas, J.M. Behavioural and Physiological Consequences of a Single Social Defeat in Roman High- and Low-Avoidance Rats. *Psychoneuroendocrinology* **1997**, *22*, doi:10.1016/S0306-4530(96)00047-9.
33. Miczek, K.A.; Thompson, M.L.; Tornatzky, W. Short and Long Term Physiological and Neurochemical Adaptations to Social Conflict. In *Psychobiology of Stress*; 1990.
34. Bohus, B.; Benus, R.F.; Fokkema, D.S.; Koolhaas, J.M.; Nyakas, C.; van Oortmerssen, G.A.; Prins, A.J.A.; de Ruiter, A.J.H.; Scheurink, A.J.W.; Steffens, A.B. Neuroendocrine States and Behavioral and Physiological Stress Responses. *Prog. Brain Res.* **1987**, *72*, doi:10.1016/S0079-6123(08)60196-X.
35. Гриневич, В.П.; Немец, В.В.; Крупицкий, Е.М.; Гайнетдинов, Р.Р.; Будыгин, Е.А.; Region, К. Роль Дофамина и Норадреналина в Алкоголь-Зависимом Поведении: От Корреляций к Механизмам. *Обзорение психиатрии и медицинской психологии им. В.М. Бехтерева* **2022**, *56*, 13–29.
36. Lesch, K.-P.; Waider, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* **2012**, *76*, 175–191, doi:10.1016/j.neuron.2012.09.013.
37. Pelosi, B.; Pratelli, M.; Migliarini, S.; Pacini, G.; Pasqualetti, M. Generation of a Tph2 Conditional Knockout Mouse Line for Time- and Tissue-Specific Depletion of Brain Serotonin. *PLoS One* **2015**, *10*, e0136422, doi:10.1371/journal.pone.0136422.
38. Verbitsky, A.; Dopfel, D.; Zhang, N. Rodent Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Behavioral Assessment. *Transl. Psychiatry* 2020, *10*.
39. Borghans, B. Animal Models for Posttraumatic Stress Disorder: An Overview of What Is Used in Research. *World J. Psychiatry* 2015, *5*, 387.
40. Yehuda, R.; Hoge, C.W.; McFarlane, A.C.; Vermetten, E.; Lanius, R.A.; Nievergelt, C.M.; Hobfoll, S.E.; Koenen, K.C.; Neylan, T.C.; Hyman, S.E. Post-Traumatic Stress Disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 1–22, doi:10.1038/nrdp.2015.57.
41. Nemets, V. V.; Deal, A.L.; Sobolev, V.E.; Grinevich, V.P.; Gainetdinov, R.R.; Budygin, E.A. Short-Term Consequences of Single Social Defeat on Accumbal Dopamine and Behaviors in

- Rats. *Biomolecules* **2023**, *13*, doi:10.3390/biom13010035.
42. Nemets, V. V.; Shmurak, V.I.; Sobolev, V.E.; Garnuk, V. V.; Rován, E.D.; Vinogradova, E.P. Effects of Transient and Prolonged Uncontrollable Stress on Animals of Dominant and Subordinate Social Status with Different Types of Stress Reactions. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2020**, *50*, 618–624, doi:10.1007/S11055-020-00943-W.
43. Немец, В.В.; Шмурак, В.И.; Соболев, В.Е.; Гарнюк, В.В.; Рован, Е.Д.; Виноградова, Е.П. Влияние Кратковременного И Длительного Неконтролируемого Стресса На Животных Доминантного И Субординантного Социального Статуса С Различным Типом Стрессорной Реакции. *Российский Физиологический Журнал Им И М Сеченова* **2019**, *105*, 608–618, doi:10.1134/s0869813919050066.
44. Немец, В.В.; Виноградова, Е.П.; Nemets, V. V.; Vinogradova, E.P. Стресс и Стратегии Поведения Stress and Neurobiology of Coping Styles. *Natl. Psychol. J.* **2017**, *2*, 59–72, doi:10.11621/npj.2017.0207.
45. Nemets, V. V.; Nikolaev, A.I.; Pshenov, A.B.; Sobolev, V.E. A New Modification Of The Shuttle Box Device. *Lab. Zhivotnye dlya nauchnykh Issled. (Laboratory Anim. Sci.)* **2018**, *1*, doi:10.29296/2618723X-2018-01-09.
46. Vinogradova, E.P.; Nemets, V. V.; Zhukov, D.A. Active Coping Style as a Risk Factor of Depressive-Like Disorders after Chronic Mild Stress. **2013**, *63*, 1–8, doi:10.7868/S0044467713050109.
47. Zhukov, D.A.; Nemets, V. V.; Vinogradova, E.P. Bupropion Effect Depends on Rats' Coping Style. *Med. Acad. J.* **2019**, *19*, 53–56, doi:10.17816/maj19253-56.
48. Selye, H. The General Adaptation Syndrome and the Diseases of Adaptation. *J. Clin. Endocrinol.* *6117-231, 1946* **1946**, 1977–1977.
49. Cannon, B. Y. W. B. The Emergency Function Medulla in Pain and The. *Exp. Biol.* **1913**.
50. Mason, J.W. A Re-Evaluation of the Concept of “Non-Specificity” in Stress Theory. *J. Psychiatr. Res.* **1971**, *8*, 323–333.
51. Miller, D.; Lieberman, M.A. The Relationship of Affect State and Adaptive Capacity to Reactions to Stress. *J. Gerontol.* **1965**, *20*, 492–497.
52. Mordvinkina, T.N. *Stress Ulcers in Gastrointestinal Tract*; 1977; pp. 73–75;.

53. Henrotte, J.G.; Franck, G.; Santarromana, M.; Nakib, S.; Dauchy, F.; Boulu, R.G. Effect of Pyridoxine on Mice Gastric Ulcers and Brain Catecholamines after an Immobilization Stress. *Ann. Nutr. Metab.* **1992**, *36*, 313–317.
54. Paré, W.P. Psychological Studies of Stress Ulcer in the Rat. *Brain Res. Bull.* **1980**, *5 Suppl 1*, 73–79.
55. Martínez Rodríguez, E. Stress Ulcers. *Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig.* **1972**, *37*, 201–210.
56. Mircea, N.; Jianu, E.; Constantinescu, C.; Constantinescu, N.; Daschievici, S.; Busu, G.; Nedelcu, A.; Leoveanu, A. Stress Ulcers in Intensive Care (Etiology, Symptomatology and Therapy). *Resuscitation* **1984**, *12*, 59–76.
57. Cahill, G.F. Starvation in Man. *Clin Endocrinol Metab* **1976**, *5*, 397–415.
58. Schweizer, M.C.; Henniger, M.S.H.; Sillaber, I. Chronic Mild Stress (CMS) in Mice: Of Anhedonia, “anomalous Anxiolysis” and Activity. *PLoS One* **2009**, *4*, e4326, doi:10.1371/journal.pone.0004326.
59. Cabib, S.; Puglisi-Allegra, S. Stress, Depression and the Mesolimbic Dopamine System. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996.
60. de Boer, S.F.; Buwalda, B.; Koolhaas, J.M. Untangling the Neurobiology of Coping Styles in Rodents: Towards Neural Mechanisms Underlying Individual Differences in Disease Susceptibility. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, *74*, 401–422, doi:10.1016/j.neubiorev.2016.07.008.
61. Tatar, P.; Kvetnansky, R. Plasma Catecholamines and Adenopituitary Hormones during Hyperthermia in Sauna in Man. *Gordon Breach Sci. Publ.* **1984**, 919–927.
62. Kanner, A.D.; Coyne, J.C.; Schaefer, C.; Lazarus, R.S. Comparison of Two Modes of Stress Measurement: Daily Hassles and Uplifts versus Major Life Events. *J. Behav. Med.* **1981**, *4*, 1–39.
63. Smelik, P.G. Adaptation and Brain Function. *Prog. Brain Res.* **1987**, *72*, 3–9.
64. Hennessy, J.W.; Levine, S. Stress, Arousal, and the Pituitary- Adrenal System: A Psychoendocrine Hypothesis. *Acad. Press* **1979**, 133–178.
65. Midgley, M. Human Ideals and Human Needs. *Philosophy* **1983**, *58*, 89–94.

66. Феофраст *Характеры*; Ладомир, 1993;
67. Eysenck, H.J. *Dimensions of Personality*; Transaction Publishers, 1998;
68. Nowacek, N. Character to Character. *Vis. Commun.* **2005**, *4*, 158–164, doi:10.1177/1470357205053393.
69. WAGNER, W. Medical Psychology of Ernst Kretschmer. *Nervenarzt* **1951**, *22*, 344–347.
70. Friedman, H.S.; Hall, J.A.; Harris, M.J. Type A Behavior, Nonverbal Expressive Style, and Health. *J. Pers. Soc. Psychol.* **1985**, *48*, 1299–1315.
71. Stevens, M.; Pudvah, M.; Nyitray, S.; Academy, W.M. Measurement of the Type A Behavior Pattern in Adolescents and Young Adults : Cross-Cultural Development of AATAB. *J. Behav. Med.* **1990**, *13*.
72. Forgays, D.K.; Forgays, D.G.; Bonaiuto, P.; Wrzesniewski, K. Measurement of the Type A Behavior Pattern from Adolescence through Midlife: Further Development of the Adolescent/Adult Type A Behavior Scale (AATABS). *J. Behav. Med.* **1993**, *16*, 523–537.
73. Nemets, V. V.; Vinogradova, E.P. Stress and Neurobiology of Coping Styles. *Natl. Psychol. J.* **2017**, *2*, 59–72, doi:10.11621/npj.2017.0207.
74. Haaga, D. Treatment of the Type a Behavior Pattern. *Clin. Psychol. Rev.* **1987**, *7*, 557–574, doi:10.1016/0272-7358(87)90044-4.
75. Bennett, P.; Wallace, L.; Carroll, D.; Smith, N. Treating Type A Behaviours and Mild Hypertension in Middle-Aged Men. *J. Psychosom. Res.* **1991**, *35*, 209–223.
76. Myrtek, M. Type A Behavior Pattern, Personality Factors, Disease, and Physiological Reactivity: A Meta-Analytic Update. *Pers. Individ. Dif.* **1995**, *18*, 491–502, doi:10.1016/0191-8869(94)00197-Z.
77. Okeeffe, J. Self-Regulation and Type A Behavior*1. *J. Res. Pers.* **1988**, *22*, 232–251, doi:10.1016/0092-6566(88)90017-7.
78. Jern, S.; Jern, C.; Wadenvik, H. “Polycythaemia of Stress” in Subjects with Type A and Type B Behaviour Patterns. *J. Psychosom. Res.* **1991**, *35*, 91–98.
79. Bass, C. Type A Behaviour: Recent Developments. *J. Psychosom. Res.* **1984**, *28*, 371–378.
80. Catipović-Veselica, K. The Type A-B Behavior Pattern in Urban and Rural Men and Women.

- Psychol. Rep.* **2001**, 88, 915–916.
81. Kanda, A.; Kawaguchi, T. A Study of School Children with Type A Behavior Pattern Association of “Competitiveness” and “Impatience-Aggression” with Lifestyle-Related Factors. *Nippon koshu eisei zasshi Japanese J. public Heal.* **2002**, 49, 167–177.
 82. Weidner, G.; Matthews, K.A. Reported Physical Symptoms Elicited by Unpredictable Events and the Type A Coronary-Prone Behavior Pattern. *J. Pers. Soc. Psychol.* **2007**.
 83. Thurman, C.W. Effectiveness of Cognitive–Behavioral Treatments in Reducing Type A Behavior Among University Faculty. *J. Couns. Psychol.* **1984**.
 84. Strube, M.J. Type A Behavior Pattern and the Judgment of Control. *J. Pers. Soc. Psychol.* **1985**.
 85. Rhodewalt, F. Strategic Self-Attribution and Type A Behavior*1. *J. Res. Pers.* **1988**, 22, 60–74, doi:10.1016/0092-6566(88)90024-4.
 86. SHEKELLE, R.B.; SCHOENRERGER, J.A.S. CORRELATES BEHAVIOR OF THE JAS TYPE PATTERN SCORE. **1976**, 29, 381–394.
 87. Keiko, N. OPERANT SELF-CONTROL PROCEDURE IN MOD BEHAVIOR. **1991**.
 88. Van IJzendoorn, M.H.; Bakermans-Kranenburg, M.J.; Falger, P.R.J.; De-Ruiter, C.; Cohen, L. Type A Behavior Pattern in Mothers of Infants : An Exploration of Associations with Attachment, Sensitive Caregiving, and Life-Events. *Psychol. Heal.* **1998**, 13, 515–526.
 89. Forgays, D.K. The Relationship between Type A Parenting and Adolescent Perceptions of Family Environment. *Adolescence* **1996**, 31, 841–862.
 90. File, S.E.; Vellucci, S. V Behavioural and Biochemical Measures of Stress in Hooded Rats from Different Sources. *Physiol. Behav.* **1979**, 22, 31–35.
 91. Angelucci, L.; Valeri, P.; Palmery, M.; Patacchioli, F.R.; Catalani, A. Brain Glucocorticoid Receptor: Correlation of in Vivo Uptake of Corticosterone with Behavioral, Endocrine, and Neuropharmacological Events. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1980**, 21, 391–406.
 92. LEVINE, S.; BROADHURST, P.L. Genetic and Ontogenetic Determinants of Adult Behavior in the Rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1963**, 56, 423–428.
 93. Жуков *Психогенетика Стресса*; Санкт-Петербург, 1977;
 94. Bignami, G. Selection for High Rates and Low Rates of Avoidance Conditioning in the Rat.

- Anim. Behav.* **1965**, *13*, 221–227.
95. Martin, J.R.; Oettinger, R.; Driscoll, P.; Buzzi, R.; Bättig, K. Effects of Chlordiazepoxide and Imipramine on Maze Patrolling within Two Different Maze Configurations by Psychogenetically Selected Lines of Rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **1982**, *78*, 58–62.
 96. Steimer, T.; Driscoll, P. Divergent Stress Responses and Coping Styles in Psychogenetically Selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance Rats: Behavioural, Neuroendocrine and Developmental Aspects. *Stress* **2003**, *6*, 87–100, doi:10.1080/1025389031000111320.
 97. Виноградова; Жуков Межполовые и Межлинейные Различия в Потреблении Сахарозы Крысами с Различной Стратегией Поведения. *Журнал ВНД* **2001**, с.545-551, doi:10.1016/j.jconhyd.2010.08.009.
 98. Zhukov, D.A. Strain-Dependent Escape Deficit in Two Rat Models of Learned Helplessness. *Physiol. Behav.* **1993**, *53*, 905–909.
 99. Zhukov, D.A.; Vinogradova, K.P. Inescapable Shock Induces the Opposite Changes of the Plus-Maze Test Behavior in Rats with Divergent Coping Strategy. *Physiol. Behav.* **1994**, *56*, 1075–1079.
 100. Fisher, H.E. Why Him? Why Her? **2009**, 305.
 101. de Boer, S.F.; Buwalda, B.; Koolhaas, J.M. Untangling the Neurobiology of Coping Styles in Rodents: Towards Neural Mechanisms Underlying Individual Differences in Disease Susceptibility. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, *74*, 401–422, doi:10.1016/j.neubiorev.2016.07.008.
 102. Mobini, S.; Body, S.; Ho, M.Y.; Bradshaw, C.; Szabadi, E.; Deakin, J.; Anderson, I. Effects of Lesions of the Orbitofrontal Cortex on Sensitivity to Delayed and Probabilistic Reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*. **2002**, *160*, 290–298, doi:10.1007/S00213-001-0983-0.
 103. Takahashi, A.; Nagayasu, K.; Nishitani, N.; Kaneko, S.; Koide, T. Control of Intermale Aggression by Medial Prefrontal Cortex Activation in the Mouse. *PLoS One* **2014**, *9*, e94657, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0094657.
 104. Tournier, B.B.; Steimer, T.; Millet, P.; Moulin-Sallanon, M.; Vallet, P.; Ibañez, V.; Ginovart, N. Innately Low D2 Receptor Availability Is Associated with High Novelty-Seeking and Enhanced Behavioural Sensitization to Amphetamine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2013**, *16*, 1819–1834, doi:10.1017/S1461145713000205.

105. Yu, Q.; Teixeira, C.M.; Mahadevia, D.; Huang, Y.Y.; Balsam, D.; Mann, J.J.; Gingrich, J.A.; Ansorge, M.S. Optogenetic Stimulation of DAergic VTA Neurons Increases Aggression. *Mol. Psychiatry* **2014**, *19*, 635, doi:10.1038/MP.2014.45.
106. Cabib, S.; Puglisi-Allegra, S. The Mesoaccumbens Dopamine in Coping with Stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2012**, *36*, 79–89, doi:10.1016/j.neubiorev.2011.04.012.
107. Bangasser, D.A.; Reyes, B.A.S.; Piel, D.; Garachh, V.; Zhang, X.-Y.; Plona, Z.M.; Van Bockstaele, E.J.; Beck, S.G.; Valentino, R.J. Increased Vulnerability of the Brain Norepinephrine System of Females to Corticotropin-Releasing Factor Overexpression. *Mol. Psychiatry* **2013**, *18*, 166–173, doi:10.1038/mp.2012.24.
108. Bakshi, V.P.; Kalin, N.H. Corticotropin-Releasing Hormone and Animal Models of Anxiety: Gene-Environment Interactions. *Biol. Psychiatry* **2000**, *48*, 1175–1198.
109. Lemos, J.C.; Wanat, M.J.; Smith, J.S.; Reyes, B.A.S.; Hollon, N.G.; Van Bockstaele, E.J.; Chavkin, C.; Phillips, P.E.M. Severe Stress Switches CRF Action in the Nucleus Accumbens from Appetitive to Aversive. *Nat. 2012 4907420* **2012**, *490*, 402–406, doi:10.1038/nature11436.
110. Lemos, J.C.; Shin, J.H.; Alvarez, V.A. Striatal Cholinergic Interneurons Are a Novel Target of Corticotropin Releasing Factor. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, doi:10.1523/JNEUROSCI.0479-19.2019.
111. Henckens, M.J.A.G.; Deussing, J.M.; Chen, A. Region-Specific Roles of the Corticotropin-Releasing Factor-Urocortin System in Stress. *Nat. Rev. Neurosci.* **2016**, *17*, 636–651, doi:10.1038/NRN.2016.94.
112. Bruchas, M.R.; Land, B.B.; Lemos, J.C.; Chavkin, C. CRF1-R Activation of the Dynorphin/Kappa Opioid System in the Mouse Basolateral Amygdala Mediates Anxiety-Like Behavior. *PLoS One* **2009**, *4*, e8528, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008528.
113. Backström, T.; Winberg, S. Central Corticotropin Releasing Factor and Social Stress. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 117, doi:10.3389/fnins.2013.00117.
114. Nasushita, R. Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH). *Nippon Rinsho* **2005**, *63 Suppl 8*, 199–201.
115. Louis, J.C.; Anglard, P.; Vincendon, G. Neurotropic Action of Adrenocorticotrophic Hormone. *Presse Med.* **1986**, *15*, 157–160.
116. Shen, Y.; Li, R. The Role of Neuropeptides in Learning and Memory: Possible Mechanisms.

- Med. Hypotheses* **1995**, *45*, 529–538.
117. Wolkowitz, O.M.; Epel, E.S.; Reus, V.I. Stress Hormone-Related Psychopathology: Pathophysiological and Treatment Implications. *world J. Biol. psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* **2001**, *2*, 115–143.
 118. De Kloet, E.R. Brain Corticosteroid Receptor Balance and Homeostatic Control. *Front Neuroendocr.* **1991**, *12*, 95–164.
 119. Glavin, G. B.; Murison, R.; Overmier, J.B.; Pare, W.P.; Bakke, H.K.; Henke, P.G.; Hernandez, D.E. The Neurobiology of Stress Ulcers. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **1991**, *16*, 301–343.
 120. Cannon, B.Y.W.B. *The Wisdom of the Body*; Norton, 1932; ISBN 0393002055.
 121. Hall, J.L.; Gold, P.E. Adrenalectomy-Induced Memory Deficits: Role of Plasma Glucose Levels. *Physiol. Behav.* **1990**, *47*, 27–33.
 122. Armario, A.; Marti, O.; A, V.; S, D.-Z.; S, O. Long-Term Effects of a Single Exposure to Immobilization in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Neurobiologic Mechanisms. *AnnNYAcad Sci* **2004**, *1018*, 162–172.
 123. Short, K.R.; Maier, S.F. Stressor Controllability, Social Interaction, and Benzodiazepine Systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1993**, *45*, 827–835.
 124. Fischer, A.G.; Ullsperger, M. An Update on the Role of Serotonin and Its Interplay with Dopamine for Reward. *Front. Hum. Neurosci.* **2017**, *11*, 1–10, doi:10.3389/fnhum.2017.00484.
 125. Belujon, P.; Grace, A.A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2017**, *20*, 1036–1046, doi:10.1093/ijnp/pyx056.
 126. Kraepelin, E. *Psychiatrie.* **1915**, *7*, 1–4.
 127. Flint, J.; Kendler, K.S. The Genetics of Major Depression. *Neuron* **2014**, *81*, 484–503, doi:10.1016/J.NEURON.2014.01.027.
 128. De La Fuente, R. The Role of Depression in Human Pathology. *Bol. Estud. Med. Biol.* **1976**, *29*, 199–206.
 129. Overmier, J.B.; Seligman, M.E. Effects of Inescapable Shock upon Subsequent Escape and Avoidance Responding. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1967**, *63*, 28–33.
 130. Шенгер-Крестовникова, Н.Р. К вопросу о Дифференцировке Зрительных Раздражителей.

- Из-вестия Педагогического научного института им. П. Ф. Лесгафта* **1921**, 1–41.
131. Виноградова; Жуков Обратная Связь в Системе «стимул-Реакция» Определяет Особенности Стресса. *ВНД* **1996**.
 132. Bruhn, J.G. The Novelty of Stress. *South. Med. J.* **1987**, *80*, 1398–1406.
 133. Weiss, J.M. Effects of Coping Responses on Stress. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **1968**, *65*, 251–260.
 134. Grønli, J. Chronic Mild Stress Affects Sucrose Intake and Sleep in Rats. *Behav. Brain Res.* **2004**, *150*, 139–147, doi:10.1016/S0166-4328(03)00252-3.
 135. Short, K.R.; Maier, S.F. Stressor Controllability, Social Interaction, and Benzodiazepine Systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1993**, *45*, 827–835.
 136. Katz, R.J. Animal Models and Human Depressive Disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1981**, *5*, 231–246.
 137. Maier, S.F.; Seligman, M.E.P. Learned Helplessness: Theory and Evidence. *J. Exp. Psychol. Gen.* **1976**, *105*, 3–46.
 138. Panagiotaropoulos, T.; Papaioannou, A.; Pondiki, S.; Prokopiou, A.; Stylianopoulou, F.; Gerozissis, K. Effect of Neonatal Handling and Sex on Basal and Chronic Stress-Induced Corticosterone and Leptin Secretion. *Neuroendocrinology* **2004**, *79*, 109–118.
 139. Ito, C.; Shen, H.; Toyota, H.; Kubota, Y.; Sakurai, E.; Watanabe, T.; Sato, M. Effects of the Acute and Chronic Restraint Stresses on the Central Histaminergic Neuron System of Fischer Rat. *Neurosci. Lett.* **1999**, *262*, 143–145.
 140. Li, W.; Li, Q.-J.; An, S.-C. Preventive Effect of Estrogen on Depression-like Behavior Induced by Chronic Restraint Stress. *Neurosci. Bull.* **2010**, *26*, 140–146.
 141. Wang, Y.-T.; Tan, Q.-R.; Sun, L.-L.; Cao, J.; Dou, K.-F.; Xia, B.; Wang, W. Possible Therapeutic Effect of a Traditional Chinese Medicine, Sinisan, on Chronic Restraint Stress Related Disorders. *Neurosci. Lett.* **2009**, *449*, 215–219.
 142. Dunn, A.J.; Swiergiel, A.H. Effects of Acute and Chronic Stressors and CRF in Rat and Mouse Tests for Depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1148*, 118–126.
 143. Kemeny, M.E. Psychobiological Responses to Social Threat: Evolution of a Psychological

- Model in Psychoneuroimmunology. *Brain. Behav. Immun.* **2009**, *23*, 1–9,
doi:10.1016/j.bbi.2008.08.008.
144. Gilbert, M.M. Reactive Depression as a Model Psychosomatic Disease. *Psychosomatics* **1967**, *11*, 426–428.
 145. Kolesina, N.I. Reactive Depression in Patients with Slowly Progressive Schizophrenia. *Zhurnal Nevropatol. i psikiatrii Im. SS Korsakova Moscow Russ. 1952* **1981**, *81*, 561–567.
 146. Hauri, P. Dreams in Patients Remitted from Reactive Depression. *J. Abnorm. Psychol.* **1976**, *85*, 1–10.
 147. Paykel, E.S.; Prusoff, B.; Klerman, G.L. The Endogenous-Neurotic Continuum in Depression: Rater Independence and Factor Distributions. *J. Psychiatr. Res.* **1971**, *8*, 73–90.
 148. Reno, R.M.; Halaris, A.E. The Relationship between Life Stress and Depression in an Endogenous Sample. *Compr. Psychiatry* *31*, 25–33.
 149. Тополянский, В.Д.; Струковская, М.В. Психосоматические Растройства. **1986**.
 150. Saeki, T.; Asukai, N.; Miyake, Y.; Miguchi, M.; Yamawaki, S. Characteristics of Family Functioning in Patients with Endogenous Monopolar Depression. *Hiroshima J. Med. Sci.* **2002**, *51*, 55–62.
 151. Leonhard, K. Differential Diagnosis and Different Etiologies of Monopolar and Bipolar Phasic Psychoses. *Psychiatr. Neurol. und medizinische Psychol.* **1987**, *39*, 524–533.
 152. VAJDA, A. Relationship between Neuroses and Psychoses. *Ideggyogy. Sz.* **1960**, *13*, 276–283.
 153. Pflug, B. Sleep Deprivation in Ambulatory Therapy of Endogenic Depression. *Nervenarzt* **1972**, *43*, 614–622.
 154. Svendsen, K. Sleep Deprivation Therapy in Depression. *Acta Psychiatr. Scand.* **1976**, *54*, 184–192.
 155. Heller, R.; Fritzsche, M.; Hill, H.; Kick, H. *Sleep Deprivation as a Predictor of Response to Light Therapy in Major Depression*; 2001; Vol. 69;.
 156. Piérard-Franchimont, C.; Henry, F.; Piérard, G.E. Light Therapy. *Rev. Med. Liege* **2005**, *60 Suppl 1*, 109–117.
 157. Lesur, A. Phototherapy in Depression. *Rev. Prat.* **1990**, *40*, 1675–1676.

158. Robinson, O.J.; Roiser, J.P. The Role of Serotonin in Aversive Inhibition: Behavioural, Cognitive and Neural Perspectives. *J. Exp. Psychopathol.* **2016**, *3*, 29–40, doi:10.5127/PR.034013.
159. Winter, C.; von Rumohr, A.; Mundt, A.; Petrus, D.; Klein, J.; Lee, T.; Morgenstern, R.; Kupsch, A.; Juckel, G. Lesions of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra Pars Compacta and in the Ventral Tegmental Area Enhance Depressive-like Behavior in Rats. *Behav. Brain Res.* **2007**, *184*, 133–141, doi:10.1016/j.bbr.2007.07.002.
160. Friedman, A.; Friedman, Y.; Dremencov, E.; Yadid, G. VTA Dopamine Neuron Bursting Is Altered in an Animal Model of Depression and Corrected by Desipramine. *J. Mol. Neurosci.* **2008**, *34*, 201–209, doi:10.1007/s12031-007-9016-8.
161. Moncrieff, J.; Cooper, R.E.; Stockmann, T.; Amendola, S.; Hengartner, M.P.; Horowitz, M.A. The Serotonin Theory of Depression: A Systematic Umbrella Review of the Evidence. *Mol. Psychiatry* **2023**, *28*, 3243–3256, doi:10.1038/s41380-022-01661-0.
162. Jauhar, S.; Cowen, P.J.; Browning, M. Fifty Years on: Serotonin and Depression. *J. Psychopharmacol.* **2023**, *37*, 237–241, doi:10.1177/02698811231161813.
163. Nutt, D.J.; Baldwin, D.S.; Clayton, A.H.; Elgie, R.; Lecrubier, Y.; Montejo, A.L.; Papakostas, G.I.; Souery, D.; Trivedi, M.H.; Tylee, A. The Role of Dopamine and Norepinephrine in Depression and Antidepressant Treatment. *J. Clin. Psychiatry* **2006**, *67*, 46–49.
164. Herrington, J.D.; Mohanty, A.; Koven, N.S.; Fisher, J.E.; Stewart, J.L.; Banich, M.T.; Webb, A.G.; Miller, G.A.; Heller, W. Emotion-Modulated Performance and Activity in Left Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Emotion* **2005**, *5*, 200–207, doi:10.1037/1528-3542.5.2.200.
165. Rizvi, S.; Khan, A.M. Use of Transcranial Magnetic Stimulation for Depression. *Cureus* **2019**, *11*, e4736, doi:10.7759/cureus.4736.
166. Breslau, N.; Davis, G.C. Chronic Stress and Major Depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **1986**, *43*, 309–314.
167. Paladini, V.A.; Cusin, S.G.; Cattaruzza, I.; Vecchietti, E.; Longo, A.; Benvegnù, M.; Mocavero, G. Anxiety and Depression in Chronic Pain. *Minerva Anestesiol.* **1986**, *52*, 321–324.
168. Checkley, S. The Neuroendocrinology of Depression and Chronic Stress. *Br. Med. Bull.* **1996**, *52*, 597–617.

169. Willner, P.; Muscat, R.; Papp, M. Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1992**, *16*, 525–534.
170. Willner, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiology* **2005**, *52*, 90–110.
171. Krishnan, V.; Nestler, E.J. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **2011**, *7*, 121, doi:10.1007/7854_2010_108.
172. Whitaker, A.M.; Gilpin, N.W.; Edwards, S. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. *Behav. Pharmacol.* **2014**, *25*, 398, doi:10.1097/FBP.000000000000069.
173. Turnbull, G.J.; Ebbinghaus, R.; Bauer, M.; Priebe, S.; de Moraes Costa, G.; Zanatta, F.B.; Ziegelmann, P.K.; Soares Barros, A.J.; Mello, C.F.; Yehuda, R.; et al. Post-Traumatic Stress Disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 412–420, doi:10.1038/nrdp.2015.57.
174. Crocq, M.-A.; Crocq, L. From Shell Shock and War Neurosis to Posttraumatic Stress Disorder: A History of Psychotraumatology. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2000**, *2*, 47, doi:10.31887/DCNS.2000.2.1/MACROCQ.
175. Schneiderman, N.; Ironson, G.; Siegel, S.D. Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **2005**, *1*, 607–628, doi:10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141.
176. Patki, G.; Solanki, N.; Salim, S. Witnessing Traumatic Events Causes Severe Behavioral Impairments in Rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2014**, *17*, 2017–2029, doi:10.1017/S1461145714000923.
177. Tseilikman, V.E.; Tseilikman, O.B.; Pashkov, A.A.; Ivleva, I.S.; Karpenko, M.N.; Shatilov, V.A.; Zhukov, M.S.; Fedotova, J.O.; Kondashevskaya, M. V.; Downey, H.F.; et al. Mechanisms of Susceptibility and Resilience to PTSD: Role of Dopamine Metabolism and BDNF Expression in the Hippocampus. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/IJMS232314575.
178. Davis, M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* **1992**, *15*, 353–375, doi:10.1146/annurev.ne.15.030192.002033.
179. Inman, C.S.; Bijanki, K.R.; Bass, D.I.; Gross, R.E.; Hamann, S.; Willie, J.T. Human Amygdala Stimulation Effects on Emotion Physiology and Emotional Experience. *Neuropsychologia* **2020**, *145*, 106722, doi:10.1016/j.neuropsychologia.2018.03.019.

180. Nemets, V. V.; Vinogradova, E.P. Stress and Neurobiology of Coping Styles. *Natl. Psychol. J.* **2017**, *2*, 59–72, doi:10.11621/npj.2017.0207.
181. Kim, J.J.; Diamond, D.M. The Stressed Hippocampus, Synaptic Plasticity and Lost Memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 453–462, doi:10.1038/nrn849.
182. Pitman, R.K.; Rasmusson, A.M.; Koenen, K.C.; Shin, L.M.; Orr, S.P.; Gilbertson, M.W.; Milad, M.R.; Liberzon, I. Biological Studies of Post-Traumatic Stress Disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 769–787, doi:10.1038/nrn3339.
183. Enman, N.M.; Arthur, K.; Ward, S.J.; Perrine, S.A.; Unterwald, E.M. Anhedonia, Reduced Cocaine Reward, and Dopamine Dysfunction in a Rat Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Biol. Psychiatry* **2015**, *78*, 871, doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2015.04.024.
184. Belujon, P.; Grace, A.A. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2017**, *20*, 1036, doi:10.1093/IJNP/PYX056.
185. Tye, K.M.; Mirzabekov, J.J.; Warden, M.R.; Ferenczi, E.A.; Tsai, H.C.; Finkelstein, J.; Kim, S.Y.; Adhikari, A.; Thompson, K.R.; Andalman, A.S.; et al. Dopamine Neurons Modulate Neural Encoding and Expression of Depression-Related Behaviour. *Nature* **2013**, *493*, 537–541, doi:10.1038/nature11740.
186. Fadel, C.; Felício, A.; Calzavara, A.; Batista, I.; Reis, M.; Shih, I.; RK, P.; Andreoli, M.; Mello, S.; Mari, I.; et al. Higher Striatal Dopamine Transporter Density in PTSD: An in Vivo SPECT Study with [(99m)Tc]TRODAT-1. *Psychopharmacology (Berl)*. **2012**, *224*, 337–345, doi:10.1007/S00213-012-2755-4.
187. Torrisi, S.A.; Leggio, G.M.; Drago, F.; Salomone, S. Therapeutic Challenges of Post-Traumatic Stress Disorder: Focus on the Dopaminergic System. *Front. Pharmacol.* **2019**, *0*, 404, doi:10.3389/FPHAR.2019.00404.
188. Meyer, G.; Krüger, S.; Wilson, A.; Christensen, B.; Goulding, V.; Schaffer, A.; Minifie, C.; Houle, S.; Hussey, D.; Kennedy, J.L. Lower Dopamine Transporter Binding Potential in Striatum during Depression. *Neuroreport* **2001**, *12*, 4121–4125, doi:10.1097/00001756-200112210-00052.
189. VanItallie, T.B. Stress: A Risk Factor for Serious Illness. *Metabolism*. 2002, *51*.
190. Elzinga, B.M.; Schmahl, C.G.; Vermetten, E.; Van Dyck, R.; Bremner, J.D. Higher Cortisol Levels Following Exposure to Traumatic Reminders in Abuse-Related PTSD.

- Neuropsychopharmacol.* 2003 289 **2003**, 28, 1656–1665, doi:10.1038/sj.npp.1300226.
191. Wichmann, S.; Kirschbaum, C.; Böhme, C.; Petrowski, K. Cortisol Stress Response in Post-Traumatic Stress Disorder, Panic Disorder, and Major Depressive Disorder Patients. *Psychoneuroendocrinology* **2017**, 83, 135–141, doi:10.1016/J.PSYNEUEN.2017.06.005.
 192. Goswami, S.; Rodríguez-Sierra, S.; Cascardi, M.; Paré, D. Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Face Validity. *Front. Neurosci.* **2013**, 7, doi:10.3389/FNINS.2013.00089.
 193. Verbitsky, A.; Dopfel, D.; Zhang, N. Rodent Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Behavioral Assessment. *Transl. Psychiatry* 2020 101 **2020**, 10, 1–28, doi:10.1038/s41398-020-0806-x.
 194. Yohe, L.R.; Suzuki, H.; Lucas, L.R. Aggression Is Suppressed by Acute Stress but Induced by Chronic Stress: Immobilization Effects on Aggression, Hormones, and Cortical 5-HT1B/Striatal Dopamine D2 Receptor Density. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* **2012**, 12, 446–459, doi:10.3758/S13415-012-0095-9/FIGURES/8.
 195. Mitra, R.; Jadhav, S.; McEwen, B.S.; Vyas, A.; Chattarji, S. Stress Duration Modulates the Spatiotemporal Patterns of Spine Formation in the Basolateral Amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 9371–9376, doi:10.1073/pnas.0504011102.
 196. Björkqvist, K. Social Defeat as a Stressor in Humans. *Physiol. Behav.* **2001**, 73, 435–442, doi:10.1016/s0031-9384(01)00490-5.
 197. Kudryavtseva, N.N. Практика Исследования Агонистического Поведения : Методы , Методология , Интерпретации / Practice of Researching Agonistic Behavior: Methods, Methodology, Interpretation. **2020**.
 198. Holly, E.N.; Debold, J.F.; Miczek, K.A. Increased Mesocorticolimbic Dopamine during Acute and Repeated Social Defeat Stress: Modulation by Corticotropin Releasing Factor Receptors in the Ventral Tegmental Area. *Psychopharmacology (Berl)*. **2015**, 232, doi:10.1007/s00213-015-4082-z.
 199. Simonov, P. V. Soznanie i Mozg. *Zhurnal Vyss. Nervn. Deyatelnosti Im. I.P. Pavlov.* **1993**, 43.
 200. Доминанта. Статьи Разных Лет. 1887-1939 Available online: <http://filosof.historic.ru/books/item/f00/s00/z0000873/st000.shtml> (accessed on 31 July 2024).
 201. Schultz, W.; Tremblay, L.; Hollerman, J.R. Reward Prediction in Primate Basal Ganglia and

- Frontal Cortex. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 421–429.
202. Cohen, J.Y.; Haesler, S.; Vong, L.; Lowell, B.B.; Uchida, N. Neuron-Type-Specific Signals for Reward and Punishment in the Ventral Tegmental Area. *Nature* **2012**, *482*, 85–88, doi:10.1038/nature10754.
203. Bromberg-Martin, E.S.; Matsumoto, M.; Hikosaka, O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* **2010**, *68*, 815, doi:10.1016/J.NEURON.2010.11.022.
204. Naneix, F.; Marchand, A.R.; Pichon, A.; Pape, J.-R.; Coutureau, E. Adolescent Stimulation of D2 Receptors Alters the Maturation of Dopamine-Dependent Goal-Directed Behavior. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 1566–1574, doi:10.1038/npp.2013.55.
205. Zeeb, F.D.; Robbins, T.W.; Winstanley, C.A. Serotonergic and Dopaminergic Modulation of Gambling Behavior as Assessed Using a Novel Rat Gambling Task. *Neuropsychopharmacology* **2009**, *34*, 2329–2343, doi:10.1038/npp.2009.62.
206. Clark, L.; Averbeck, B.; Payer, D.; Sescousse, G.; Winstanley, C.A.; Xue, G. Pathological Choice: The Neuroscience of Gambling and Gambling Addiction. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 17617–17623, doi:10.1523/JNEUROSCI.3231-13.2013.
207. Sora, I.; Hall, F.S.; Andrews, A.; Itokawa, M.; Li, X.; Uhl, G.R. Molecular Mechanisms of Cocaine Reward: Combined Dopamine and Serotonin Transporter Knockouts Eliminate Cocaine Place Preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, doi:10.1073/PNAS.091039298.
208. Yan, Y.; Kong, H.; Wu, E.J.; Newman, a H.; Xu, M. Dopamine D3 Receptors Regulate Reconsolidation of Cocaine Memory. *Neuroscience* **2013**, *241*, 32–40, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.005.
209. Ioannou, A.; Anastassiou-Hadjicharalambous, X. Drug Sensitization. *Encycl. Evol. Psychol. Sci.* **2021**, 2137–2138, doi:10.1007/978-3-319-19650-3_1035.
210. Singer, B.F.; Bryan, M.A.; Popov, P.; Robinson, T.E.; Aragona, B.J. Rapid Induction of Dopamine Sensitization in the Nucleus Accumbens Shell Induced by a Single Injection of Cocaine. *Behav. Brain Res.* **2017**, *324*, 66–70.
211. Cheron, J.; Kerchoue d'Exaerde, A. de Drug Addiction: From Bench to Bedside. *Transl. Psychiatry* **2021**, *11*, 424, doi:10.1038/s41398-021-01542-0.

212. Volkow, N.D.; Fowler, J.S.; Wang, G.-J.; Swanson, J.M. Dopamine in Drug Abuse and Addiction: Results from Imaging Studies and Treatment Implications. *Mol. Psychiatry* **2004**, *9*, 557–569, doi:10.1038/sj.mp.4001507.
213. Müller, C.P.; Homberg, J.R. The Role of Serotonin in Drug Use and Addiction. *Behav. Brain Res.* **2015**, *277*, 146–192, doi:10.1016/j.bbr.2014.04.007.
214. Stein, D.J.; Hollander, E.; Liebowitz, M.R. Neurobiology of Impulsivity and the Impulse Control Disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **1993**, *5*, 9–17.
215. Kelsoe, J.R. Behavioural Neuroscience: A Gene for Impulsivity. *Nature* **2010**, *468*, 1049–1050.
216. Froböse, M.I.; Cools, R. Chemical Neuromodulation of Cognitive Control Avoidance. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **2018**, *22*, 121–127, doi:10.1016/j.cobeha.2018.01.027.
217. Winstanley, C. a; Theobald, D.E.H.; Dalley, J.W.; Robbins, T.W. Interactions between Serotonin and Dopamine in the Control of Impulsive Choice in Rats: Therapeutic Implications for Impulse Control Disorders. *Neuropsychopharmacology* **2005**, *30*, 669–682, doi:10.1038/sj.npp.1300610.
218. Ramey, T.; Regier, P.S. Cognitive Impairment in Substance Use Disorders. *CNS Spectr.* **2019**, *24*, 102–113, doi:10.1017/S1092852918001426.
219. Wang, W.; Zeng, F.; Hu, Y.; Li, X.; Froböse, M.I.; Cools, R.; Bourdy, R.; Barrot, M.; Tang, Y.Y.; Posner, M.I.; et al. Circuitry of Self-Control and Its Role in Reducing Addiction. *Trends Cogn. Sci.* **2015**, *22*, 439–444, doi:10.1016/j.tins.2012.06.007.
220. Cox, S.M.L.; Benkelfat, C.; Dagher, A.; Delaney, J.S.; Durand, F.; Kolivakis, T.; Casey, K.F.; Leyton, M. Effects of Lowered Serotonin Transmission on Cocaine-Induced Striatal Dopamine Response: PET [¹¹ C]Raclopride Study in Humans. *Br. J. Psychiatry* **2011**, *199*, 391–397, doi:10.1192/bjp.bp.110.084178.
221. Budygin, E.A.; Bass, C.E.; Grinevich, V.P.; Deal, A.L.; Bonin, K.D.; Weiner, J.L. Opposite Consequences of Tonic and Phasic Increases in Accumbal Dopamine on Alcohol-Seeking Behavior. *iScience* **2020**, *23*, doi:10.1016/J.ISCI.2020.100877.
222. Wu, P.; Hoven, C.W.; Liu, X.; Cohen, P.; Fuller, C.J.; Shaffer, D. Substance Use, Suicidal Ideation and Attempts in Children and Adolescents. *Suicide Life. Threat. Behav.* **2004**, *34*, 408–420, doi:10.1521/suli.34.4.408.53733.

223. Naneix, F.; Marchand, A.R.; Di Scala, G.; Pape, J.-R.; Coutureau, E. Parallel Maturation of Goal-Directed Behavior and Dopaminergic Systems during Adolescence. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 16223–16232, doi:10.1523/JNEUROSCI.3080-12.2012.
224. Steinberg, L. A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking. *Dev. Rev.* **2008**, *28*, 78–106, doi:10.1016/j.dr.2007.08.002.
225. Mena-Moreno, T.; Testa, G.; Mestre-Bach, G.; Miranda-Olivos, R.; Granero, R.; Fernández-Aranda, F.; Menchón, J.M.; Jiménez-Murcia, S. Delay Discounting in Gambling Disorder: Implications in Treatment Outcome. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, doi:10.3390/jcm11061611.
226. Sinha, R. Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1141*, 105–130, doi:10.1196/annals.1441.030.
227. Koob, G.F. Neurobiology of Opioid Addiction: Opponent Process, Hyperkatifeia, and Negative Reinforcement. *Biol. Psychiatry* **2020**, *87*, 44–53, doi:10.1016/j.biopsych.2019.05.023.
228. Elvig, S.K.; McGinn, M.A.; Smith, C.; Arends, M.A.; Koob, G.F.; Vendruscolo, L.F. Tolerance to Alcohol: A Critical yet Understudied Factor in Alcohol Addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2021**, *204*, 173155, doi:10.1016/j.pbb.2021.173155.
229. Beck, A.; Heinz, A. Alcohol-Related Aggression-Social and Neurobiological Factors. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2013**, *110*, 711–715, doi:10.3238/arztebl.2013.0711.
230. Nutt, D.; King, L.A.; Saulsbury, W.; Blakemore, C. Development of a Rational Scale to Assess the Harm of Drugs of Potential Misuse. *Lancet (London, England)* **2007**, *369*, 1047–1053, doi:10.1016/S0140-6736(07)60464-4.
231. Fitzgerald, P.J. Elevated Norepinephrine May Be a Unifying Etiological Factor in the Abuse of a Broad Range of Substances: Alcohol, Nicotine, Marijuana, Heroin, Cocaine, and Caffeine. *Subst. Abuse* **2013**, *7*, 171–183, doi:10.4137/SART.S13019.
232. Roberts, J.G.; Sombers, L.A. Fast-Scan Cyclic Voltammetry: Chemical Sensing in the Brain and Beyond. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 490–504, doi:10.1021/acs.analchem.7b04732.
233. Millar, J.; Stamford, J.A.; Kruk, Z.L.; Wightman, R.M. Electrochemical, Pharmacological and Electrophysiological Evidence of Rapid Dopamine Release and Removal in the Rat Caudate Nucleus Following Electrical Stimulation of the Median Forebrain Bundle. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *109*, 341–348, doi:10.1016/0014-2999(85)90394-2.

234. Park, J.; Takmakov, P.; Wightman, R.M. In Vivo Comparison of Norepinephrine and Dopamine Release in Rat Brain by Simultaneous Measurements with Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 932–944, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07494.x.
235. Puthongkham, P.; Venton, B.J. Recent Advances in Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Analyst* **2020**, *145*, 1087–1102, doi:10.1039/c9an01925a.
236. Adams, R.N. Probing Brain Chemistry with Electroanalytical Techniques. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1126A-1138A, doi:10.1021/AC50008A001.
237. Fang, H.; Pajski, M.L.; Ross, A.E.; Venton, B.J. Quantitation of Dopamine, Serotonin and Adenosine Content in a Tissue Punch from a Brain Slice Using Capillary Electrophoresis with Fast-Scan Cyclic Voltammetry Detection. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 2704–2711, doi:10.1039/C3AY40222C.
238. Jones, S.R.; Mickelson, G.E.; Collins, L.B.; Kawagoe, K.T.; Mark Wightman, R. Interference by PH and Ca²⁺ Ions during Measurements of Catecholamine Release in Slices of Rat Amygdala with Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *J. Neurosci. Methods* **1994**, *52*, 1–10, doi:10.1016/0165-0270(94)90048-5.
239. Stamford, J.A.; Palij, P.; Davidson, C.; Jorm, C.M.; Millar, J. Simultaneous “Real-Time” Electrochemical and Electrophysiological Recording in Brain Slices with a Single Carbon-Fibre Microelectrode. *J. Neurosci. Methods* **1993**, *50*, 279–290, doi:10.1016/0165-0270(93)90035-P.
240. Deal, A.L.; Konstantopoulos, J.K.; Weiner, J.L.; Budygin, E.A. Exploring the Consequences of Social Defeat Stress and Intermittent Ethanol Drinking on Dopamine Dynamics in the Rat Nucleus Accumbens. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-017-18706-y.
241. Deal, A.L.; Park, J.; Weiner, J.L.; Budygin, E.A. Stress Alters the Effect of Alcohol on Catecholamine Dynamics in the Basolateral Amygdala. *Front. Behav. Neurosci.* **2021**, *15*, 1–10, doi:10.3389/fnbeh.2021.640651.
242. Rodeberg, N.T.; Sandberg, S.G.; Johnson, J.A.; Phillips, P.E.M.; Wightman, R.M. Hitchhiker’s Guide to Voltammetry: Acute and Chronic Electrodes for in Vivo Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 221–234, doi:10.1021/ACSCHEMNEURO.6B00393/ASSET/IMAGES/LARGE/CN-2016-00393M_0005.JPEG.
243. Heien, M.L.A.V.; Khan, A.S.; Ariansen, J.L.; Cheer, J.F.; Phillips, P.E.M.; Wassum, K.M.;

- Wightman, R.M. Real-Time Measurement of Dopamine Fluctuations after Cocaine in the Brain of Behaving Rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10023–10028, doi:10.1073/pnas.0504657102.
244. Chefer, V.I.; Thompson, A.C.; Zapata, A.; Shippenberg, T.S. Overview of Brain Microdialysis. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2009**, CHAPTER, Unit7.1, doi:10.1002/0471142301.NS0701S47.
245. Kita, J.M.; Kile, B.M.; Parker, L.E.; Wightman, R.M. In Vivo Measurement of Somatodendritic Release of Dopamine in the Ventral Tegmental Area. **2009**, *960*, 951–960, doi:10.1002/syn.20676.
246. Budygin, E.A.; Kilpatrick, M.R.; Gainetdinov, R.R.; Wightman, R.M. Correlation between Behavior and Extracellular Dopamine Levels in Rat Striatum: Comparison of Microdialysis and Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Neurosci. Lett.* **2000**, *281*, 9–12, doi:10.1016/S0304-3940(00)00813-2.
247. Tidey, J.W.; Miczek, K.A. Social Defeat Stress Selectively Alters Mesocorticolimbic Dopamine Release: An in Vivo Microdialysis Study. *Brain Res.* **1996**, doi:10.1016/0006-8993(96)00159-X.
248. Oleson, E.B.; Talluri, S.; Childers, S.R.; Smith, J.E.; Roberts, D.C.S.; Bonin, K.D.; Budygin, E.A. Dopamine Uptake Changes Associated with Cocaine Self-Administration. *Neuropsychopharmacol.* **2009**, *34*, 1174–1184, doi:10.1038/npp.2008.186.
249. Phillips, P.E.M.; Stuber, G.D.; Helen, M.L.A.V.; Wightman, R.M.; Carelli, R.M. Subsecond Dopamine Release Promotes Cocaine Seeking. *Nature* **2003**, *422*, 614–618, doi:10.1038/NATURE01476.
250. Bergstrom B.P.; Sanberg; Andersson; Mithyantha; Carroll; Garris, P.A. Functional Reorganization of the Presynaptic Dopaminergic Terminal in Parkinsonism. *Neuroscience* **2011**, *193*, doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.07.029.
251. Rutigliano, G.; Accorroni, A.; Zucchi, R. The Case for TAAR1 as a Modulator of Central Nervous System Function. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 987, doi:10.3389/fphar.2017.00987.
252. Gainetdinov, R.R.; Hoener, M.C.; Berry, M.D. Trace Amines and Their Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 549–620, doi:10.1124/pr.117.015305.
253. Heffernan, M.; Herman, L.; Brown, S.M.; Jones, P.G.; Shao, L.; MC, H.; Campbell; N, D.; S, H.; Koblan; et al. Ulotaront: A TAAR1 Agonist for the Treatment of Schizophrenia. *ACS Med.*

Chem. Lett. **2021**, *13*, doi:10.1021/ACSMEDCHEMLETT.1C00527.

254. Leo, D.; Mus, L.; Espinoza, S.; Hoener, M.C.; Sotnikova, T.; Gainetdinov, R.R. Taar1-Mediated Modulation of Presynaptic Dopaminergic Neurotransmission: Role of D2 Dopamine Autoreceptors. *Neuropharmacology* **2014**, *81*, doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2014.02.007.
255. Seidemann, R.; Duek, O.; Jia, R.; Levy, I.; Harpaz-Rotem, I. The Reward System and Post-Traumatic Stress Disorder: Does Trauma Affect the Way We Interact With Positive Stimuli? *Chronic Stress (Thousand Oaks, Calif.)* **2021**, *5*, 2470547021996006, doi:10.1177/2470547021996006.
256. Bertolucci-D'Angio, M.; Serrano, A.; Scatton, B. Mesocorticolimbic Dopaminergic Systems and Emotional States. *J. Neurosci. Methods* **1990**, *34*, 135–142, doi:10.1016/0165-0270(90)90051-g.
257. Lesch, K.P.; Araragi, N.; Waider, J.; van den Hove, D.; Gutknecht, L. Targeting Brain Serotonin Synthesis: Insights into Neurodevelopmental Disorders with Long-Term Outcomes Related to Negative Emotionality, Aggression and Antisocial Behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 2426–2443, doi:10.1098/rstb.2012.0039.
258. Angoa-Pérez, M.; Kane, M.J.; Sykes, C.E.; Perrine, S.A.; Church, M.W.; Kuhn, D.M.; M., A.-P.; M.J., K.; C.E., S.; S.A., P.; et al. Brain Serotonin Determines Maternal Behavior and Offspring Survival. *Genes, Brain Behav.* **2014**, *13*, 579–591, doi:10.1111/gbb.12159.
259. Chen, G.L.; Miller, G.M. Advances in Tryptophan Hydroxylase-2 Gene Expression Regulation: New Insights into Serotonin-Stress Interaction and Clinical Implications. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2012**, *159 B*, 152–171.
260. Lovinger, D.M. Serotonin's Role in Alcohol's Effects on the Brain. *Alcohol Res. Heal.* **1997**, *21*, 114–120.
261. King, A.; Munisamy, G.; De Wit, H.; Lin, S. Attenuated Cortisol Response to Alcohol in Heavy Social Drinkers. *Int. J. Psychophysiol.* **2006**, *59*, 203–209, doi:10.1016/j.ijpsycho.2005.10.008.
262. Virkkunen, M.; Linnoila, M. Serotonin in Early Onset, Male Alcoholics with Violent Behaviour. *Ann. Med.* **1990**, *22*, 327–331, doi:10.3109/07853899009147915.
263. Pylayeva-Gupta, Y. Alcoholics Have More Tryptophan Hydroxylase 2 mRNA and Protein in the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Bone* **2011**, *23*, 1–7, doi:10.1038/jid.2014.371.

264. Gacek, P.; Conner, T.S.; Tennen, H.; Kranzler, H.R.; Covault, J. Tryptophan Hydroxylase 2 Gene and Alcohol Use among College Students. *Addict. Biol.* **2008**, *13*, 440–448, doi:10.1111/j.1369-1600.2008.00118.x.
265. Kendall, R.E. Alcohol and Suicide. *Subst. Alcohol Actions. Misuse.* **1983**, *4*, 121–127.
266. Zupanc, T.; Pregelj, P.; Tomori, M.; Komel, R.; Paska, A.V. TPH2 Polymorphisms and Alcohol-Related Suicide. *Neurosci. Lett.* **2011**, *490*, 78–81, doi:10.1016/j.neulet.2010.12.030.
267. Brivio, P.; Sbrini, G.; Peeva, P.; Todiras, M.; Bader, M.; Alenina, N.; Calabrese, F. TPH2 Deficiency Influences Neuroplastic Mechanisms and Alters the Response to an Acute Stress in a Sex Specific Manner. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*.
268. Strekalova, T.; Svirin, E.; Waider, J.; Gorlova, A.; Cespuglio, R.; Kalueff, A.; Pomytkin, I.; Schmitt-Boehrer, A.G.; Lesch, K.P.; Anthony, D.C. Altered Behaviour, Dopamine and Norepinephrine Regulation in Stressed Mice Heterozygous in TPH2 Gene. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2021**, *108*, 110155, doi:10.1016/J.PNPBP.2020.110155.
269. Savchenko, A.; Targa, G.; Fesenko, Z.; Leo, D.; Gainetdinov, R.R.; Sukhanov, I. Dopamine Transporter Deficient Rodents: Perspectives and Limitations for Neuroscience. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1–20, doi:10.3390/biom13050806.
270. Adinolfi, A.; Zelli, S.; Leo, D.; Carbone, C.; Mus, L.; Illiano, P.; Alleva, E.; Gainetdinov, R.R.; Adriani, W. Behavioral Characterization of DAT-KO Rats and Evidence of Asocial-like Phenotypes in DAT-HET Rats: The Potential Involvement of Norepinephrine System. *Behav. Brain Res.* **2019**, *359*, 516–527, doi:10.1016/j.bbr.2018.11.028.
271. Efimova, E.V.; Gainetdinov, R.R.; Budygin, E.A.; Sotnikova Dopamine Transporter Mutant Animals: A Translational Perspective. *J. Neurogenet.* **2016**, *30*, doi:10.3109/01677063.2016.1144751.
272. Jones, S.R.; Gainetdinov, R.R.; Wightman, R.M.; Caron, M.G. Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, doi:10.1523/JNEUROSCI.18-06-01979.1998.
273. Jones, S.R.; Gainetdinov, R.R.; Wightman, R.M.; Caron, M.G.; Benoit-Marand, M.; Jaber, M.; Gonon, F. Release and Elimination of Dopamine in Vivo in Mice Lacking the Dopamine Transporter: Functional Consequences. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 2985–2992, doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00155.x.

274. Jones, S.R.; Gainetdinov, R.R.; Jaber, M.; Giros, B.; Wightman, R.M.; Caron, M.G. Profound Neuronal Plasticity in Response to Inactivation of the Dopamine Transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, doi:10.1073/PNAS.95.7.4029.
275. Giros, B.; Jones, S.R.; Wightman, R.M.; Caron, M.G. Hyperlocomotion and Indifference to Cocaine and Amphetamine in Mice Lacking the Dopamine Transporter. *Nature* **1996**, *379*, doi:10.1038/379606A0.
276. Leo, D.; Gainetdinov, R.R. Transgenic Mouse Models for ADHD. *Cell Tissue Res.* **2013**, *354*, 259–271, doi:10.1007/s00441-013-1639-1.
277. Thomsen, M.; Hall, F.S.; Uhl, G.R.; Caine, S.B. Dramatically Decreased Cocaine Self-Administration in Dopamine but Not Serotonin Transporter Knock-out Mice. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, doi:10.1523/JNEUROSCI.4037-08.2009.
278. Kelley, A.E. Measurement of Rodent Stereotyped Behavior. *Curr. Protoc. Neurosci.* **1998**, *4*, 1–13, doi:10.1002/0471142301.ns0808s04.
279. Council, N.R. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. *Guid. Care Use Lab. Anim.* **2010**, doi:10.17226/12910.
280. Strelakova, T.; Spanagel, R.; Bartsch, D.; Henn, F. a; Gass, P. Stress-Induced Anhedonia in Mice Is Associated with Deficits in Forced Swimming and Exploration. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29*, 2007–2017, doi:10.1038/sj.npp.1300532.
281. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. Validation of Open:Closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat. *J. Neurosci. Methods* **1985**, *14*, 149–167, doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7.
282. Griebel, G.; Holmes, A. 50 Years of Hurdles and Hope in Anxiolytic Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 667–687, doi:10.1038/NRD4075.
283. Inglis, J.J.; Notley, C.A.; Essex, D.; Wilson, A.W.; Feldmann, M.; Anand, P.; Williams, R. Collagen-Induced Arthritis as a Model of Hyperalgesia: Functional and Cellular Analysis of the Analgesic Actions of Tumor Necrosis Factor Blockade. *Arthritis Rheum.* **2007**, doi:10.1002/art.23063.
284. Acero-Castillo, M.C.; Ardila-Figueroa, M.C.; Botelho de Oliveira, S. Anhedonic Type Behavior and Anxiety Profile of Wistar-UIS Rats Subjected to Chronic Social Isolation. *Front. Behav. Neurosci.* **2021**, *15*, 103, doi:10.3389/FNBEH.2021.663761/BIBTEX.

285. He, L.W.; Zeng, L.; Tian, N.; Li, Y.; He, T.; Tan, D.M.; Zhang, Q.; Tan, Y. Optimization of Food Deprivation and Sucrose Preference Test in SD Rat Model Undergoing Chronic Unpredictable Mild Stress. *Anim. Model. Exp. Med.* **2020**, *3*, 69, doi:10.1002/AME2.12107.
286. Porsolt, R.D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M. Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments. *Nature* **1977**, *266*, 730–732, doi:10.1038/266730A0.
287. Vestring, S.; Serchov, T.; Normann, C. Animal Models of Depression-Chronic Despair Model (Cdm). *J. Vis. Exp.* **2021**, *2021*, doi:10.3791/62579.
288. Yankelevitch-Yahav, R.; Franko, M.; Huly, A.; Doron, R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J. Vis. Exp.* **2015**, *2015*, 52587, doi:10.3791/52587.
289. Jefferys, D.; Funder, J. The Effect of Water Temperature on Immobility in the Forced Swimming Test in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *253*, 91–94, doi:10.1016/0014-2999(94)90761-7.
290. Nadeau, B.G.; Marchant, E.G.; Amir, S.; Mistlberger, R.E. Thermoregulatory Significance of Immobility in the Forced Swim Test. *Physiol. Behav.* **2022**, *247*, doi:10.1016/J.PHYSBEH.2022.113709.
291. G. Modrak, C.; S. Wilkinson, C.; L. Blount, H.; Schwendt, M.; A. Knackstedt, L. The Role of MGlu Receptors in Susceptibility to Stress-Induced Anhedonia, Fear, and Anxiety-like Behavior. *Int. Rev. Neurobiol.* **2023**, *168*, 221–264, doi:10.1016/BS.IRN.2022.10.006.
292. De Kloet, E.R.; Molendijk, M.L. Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/6503162.
293. Gorman-Sandler, E.; Hollis, F. The Forced Swim Test: Giving up on Behavioral Despair (Commentary on Molendijk & de Kloet, 2021). *Eur. J. Neurosci.* **2022**, *55*, 2832–2835, doi:10.1111/EJN.15270.
294. Mathiasen, J.R.; DiCamillo, A. Novel Object Recognition in the Rat: A Facile Assay for Cognitive Function. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2010**, *Chapter 5*, Unit 5.59, doi:10.1002/0471141755.ph0559s49.
295. Bevins, R.A.; Besheer, J. Object Recognition in Rats and Mice: A One-Trial Non-Matching-to-Sample Learning Task to Study “Recognition Memory.” *Nat. Protoc.* *2006 13* **2006**, *1*, 1306–1311, doi:10.1038/nprot.2006.205.

296. Robinson, J.; Bonardi, C. An Associative Analysis of Object Memory. *Behav. Brain Res.* **2015**, *285*, 1–9, doi:10.1016/j.bbr.2014.10.046.
297. Spanswick, S.C.; Sutherland, R.J. Object/Context-Specific Memory Deficits Associated with Loss of Hippocampal Granule Cells after Adrenalectomy in Rats. *Learn. Mem.* **2010**, *17*, 241–245, doi:10.1101/LM.1746710.
298. Langston, R.F.; Wood, E.R. Associative Recognition and the Hippocampus: Differential Effects of Hippocampal Lesions on Object-Place, Object-Context and Object-Place-Context Memory. *Hippocampus* **2010**, *20*, 1139–1153, doi:10.1002/HIPO.20714.
299. Nelson, A.J.D.; Cooper, M.T.; Thur, K.E.; Marsden, C.A.; Cassaday, H.J. The Effect of Catecholaminergic Depletion within the Prelimbic and Infralimbic Medial Prefrontal Cortex on Recognition Memory for Recency, Location, and Objects. *Behav. Neurosci.* **2011**, *125*, 396–403, doi:10.1037/A0023337.
300. Barker, G.R.I.; Bird, F.; Alexander, V.; Warburton, E.C. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2948–2957, doi:10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007.
301. Spanswick, S.C.; Dyck, R.H. Object/Context Specific Memory Deficits Following Medial Frontal Cortex Damage in Mice. *PLoS One* **2012**, *7*, e43698, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0043698.
302. Liu, P.; Bilkey, D.K. The Effect of Excitotoxic Lesions Centered on the Hippocampus or Perirhinal Cortex in Object Recognition and Spatial Memory Tasks. *Behav. Neurosci.* **2001**, *115*, 94–111, doi:10.1037/0735-7044.115.1.94.
303. Jones, P.M.; Whitt, E.J.; Robinson, J. Excitotoxic Perirhinal Cortex Lesions Leave Stimulus-Specific Habituation of Suppression to Lights Intact. *Behav. Brain Res.* **2012**, *229*, 365–371, doi:10.1016/J.BBR.2012.01.033.
304. Zoccolan, D. Invariant Visual Object Recognition and Shape Processing in Rats. *Behav. Brain Res.* **2015**, *285*, 10–33, doi:10.1016/J.BBR.2014.12.053.
305. Sivakumaran, M.H.; Mackenzie, A.K.; Callan, I.R.; Ainge, J.A.; O'Connor, A.R. The Discrimination Ratio Derived from Novel Object Recognition Tasks as a Measure of Recognition Memory Sensitivity, Not Bias. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/S41598-018-30030-

- 7.
306. Antunes, M.; Biala, G. The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications. *Cogn. Process.* **2012**, *13*, 93–110, doi:10.1007/s10339-011-0430-z.
307. Nemets, V.V.; Nikolaev, A.I.; Pshenov, A.B.; Sobolev, V.E. A New Modification Of The Shuttle Box Device. *Lab. Zhivotnye dlya nauchnykh Issled. (Laboratory Anim. Sci.* **2018**, *1*, doi:10.29296/2618723X-2018-01-09.
308. Ghafarimoghadam, M.; Mashayekh, R.; Gholami, M.; Fereydani, P.; Shelley-Tremblay, J.; Kandezi, N.; Sabouri, E.; Motaghinejad, M. A Review of Behavioral Methods for the Evaluation of Cognitive Performance in Animal Models: Current Techniques and Links to Human Cognition. *Physiol. Behav.* **2022**, *244*, 113652, doi:10.1016/J.PHYSBEH.2021.113652.
309. McALLISTER, W.R.; McALLISTER, D.E. Behavioral Measurement of Conditioned Fear. *Aversive Cond. Learn.* **1971**, 105–179, doi:10.1016/B978-0-12-137950-6.50007-9.
310. Heffner, Henry E; Heffner, R.S. Hearing Ranges of Laboratory Animals - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17203911/> (accessed on 12 July 2023).
311. Иванов, Д. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЦИАЛЬНОГО СТАТУСА САМЦОВ КРЫС В ТРИАДАХ - Успехи Современного Естествознания (Научный Журнал) Available online: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=34185>.
312. Social, Maternal and Aggressive Behaviors in Rodents | Research at Penn State Available online: <https://www.research.psu.edu/newanimal/experimental-guidelines/rodent-behavioral-tests-1/social-and-aggressive-behaviors-in-rodents> (accessed on 1 August 2024).
313. Carter, M.; Shieh, J. Guide to Research Techniques in Neuroscience, Second Edition. *Guid. to Res. Tech. Neurosci. Second Ed.* **2015**, 1–388, doi:10.1016/C2013-0-06868-5.
314. Tseng, L.L.F.; Tang, R. Differential Actions of the Blockade of Spinal Opioid, Adrenergic and Serotonergic Receptors on the Tail-Flick Inhibition Induced by Morphine Microinjected into Dorsal Raphe and Central Gray in Rats. *Neuroscience* **1989**, *33*, 93–100.
315. Lata, H.; Ahuja, G.K.; Narang, A.P.S.; Walia, L. Effect of Immobilisation Stress on Lipid Peroxidation and Lipid Profile in Rabbits. *Indian J. Clin. Biochem.* **2004**, doi:10.1007/BF02894248.
316. Jameel, M.; Joshi, A. Effect of Acute Stress on Serum Cortisol Level in Female Wistar Rats.

2015.

317. Cora, M.C.; Kooistra, L.; Travlos, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol. Pathol.* **2015**, *43*, 776–793, doi:10.1177/0192623315570339.
318. Котельников, А. Характеристика Эстрального Цикла Белых Крыс На Разных Этапах Онтогенеза При Введении Витамина Е. *Вестник ТГТУ* **2005**, *3*, 215–218.
319. Lovick, T.A.; Jr, H.Z. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. **2021**, *12*, 1–20, doi:10.3389/fpsy.2021.711065.
320. Byers, S.L.; Wiles, M. V; Dunn, S.L.; Taft, R.A. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS One* **2012**, *7*, 35538, doi:10.1371/journal.pone.0035538.
321. Goldman, J.M.; Murr, A.S.; Cooper, R.L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* **2007**, *80*, 84–97, doi:10.1002/BDRB.20106.
322. Butcher, R.L.; Collins, W.E.; Fugo, N.W. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17beta throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology* **1974**, *94*, 1704–1708, doi:10.1210/ENDO-94-6-1704.
323. Smith, M.S.; Freeman, M.E.; Neill, J.D. The Control of Progesterone Secretion during the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy. *Endocrinology* **1975**, *96*, 219–226, doi:10.1210/ENDO-96-1-219.
324. Paxinos, G.; Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. *J. Anat.* **2006**, *6th Edition*.
325. Rosene, D.I.; Mesulam, M.M. Fixation Variables in Horseradish Peroxidase Neurohistochemistry. I. The Effect of Fixation Time and Perfusion Procedures upon Enzyme Activity. <http://dx.doi.org/10.1177/26.1.413864> **1978**, *26*, 28–39, doi:10.1177/26.1.413864.
326. Robinson, D.L.; Venton, B.J.; Heien, M.L.A.V.; Wightman, R.M. Detecting Subsecond Dopamine Release with Fast-Scan Cyclic Voltammetry in Vivo. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1763–1773, doi:10.1373/49.10.1763.
327. Cahill, P.S.; Walker, Q.D.; Finnegan, J.M.; Mickelson, G.E.; Travis, E.R.; Wightman, R.M.

- Microelectrodes for the Measurement of Catecholamines in Biological Systems. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3180–3186, doi:10.1021/AC960347D/ASSET/IMAGES/LARGE/AC960347DF00005.JPEG.
328. Fanai, M.; Khan, M.A. *Acute Stress Disorder*; StatPearls Publishing, 2023;
329. Pourghobadi, Z.; Neamatollahi, D. Voltammetric Determination of Dopamine Using Modified Glassy Carbon Electrode by Electrografting of Catechol. *J. Serbian Chem. Soc.* **2017**, *82*, 1053–1061, doi:10.2298/JSC161219076P.
330. Huang, D.Q.; Chen, C.; Wu, Y.M.; Zhang, H.; Sheng, L.Q.; Xu, H.J.; Liu, Z. Di The Determination of Dopamine Using Glassy Carbon Electrode Pretreated by a Simple Electrochemical Method. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 5510–5520, doi:10.1016/s1452-3981(23)19638-6.
331. Kelley, A.E.; Lang, C.G. Effects of GBR 12909, a Selective Dopamine Uptake Inhibitor, on Motor Activity and Operant Behavior in the Rat. *Eur. J. Pharmacol.* **1989**, *167*, 385–395, doi:10.1016/0014-2999(89)90447-0.
332. Park, J.; Aragona, B.J.; Kile, B.M.; Carelli, R.M.; Wightman, R.M. In Vivo Voltammetric Monitoring of Catecholamine Release in Subterritories of the Nucleus Accumbens Shell. *Neuroscience* **2010**, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.076.
333. España, R.A.; Roberts, D.C.S.; Jones, S.R. Short-Acting Cocaine and Long-Acting GBR-12909 Both Elicit Rapid Dopamine Uptake Inhibition Following Intravenous Delivery. *Neuroscience* **2008**, *155*, 250–257, doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.022.
334. Aguilar, M.A.; Miñarro, J.; Pérez-Iranzo, N.; Simón, V.M. Behavioral Profile of Raclopride in Agonistic Encounters between Male Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 753–756, doi:10.1016/0091-3057(94)90185-6.
335. Vengeliene, V.; Vollmayr, B.; Henn, F.A.; Spanagel, R. Voluntary Alcohol Intake in Two Rat Lines Selectively Bred for Learned Helpless and Non-Helpless Behavior. *Psychopharmacology (Berl.)* **2005**, *178*, 125–132, doi:10.1007/s00213-004-2013-5.
336. Dongju Seo; Christopher J. Patrick; Patrick J. Kennealy Role of Serotonin and Dopamine System Interactions in the Neurobiology of Impulsive Aggression and Its Comorbidity with Other Clinical Disorders. *Curr. Opin. Psychiatry* **2008**, *13*, 585–588, doi:10.1097/00001504-199208000-00022.

337. Lesch, K.-P.; Araragi, N.; Waider, J.; van den Hove, D.; Gutknecht, L. Targeting Brain Serotonin Synthesis: Insights into Neurodevelopmental Disorders with Long-Term Outcomes Related to Negative Emotionality, Aggression and Antisocial Behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2012**, *367*, 2426–2443, doi:10.1098/rstb.2012.0039.
338. Keeney, A.; Jessop, D.S.; Harbuz, M.S.; Marsden, C.A.; Hogg, S.; Blackburn-Munro, R.E. Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice. *J. Neuroendocrinol.* **2006**, *18*, 330–338, doi:10.1111/J.1365-2826.2006.01422.X.
339. Montagud-Romero, S.; Reguilón, M.D.; Rodríguez-Arias, M. TWO INTERCONNECTED WORLDS How Exposure to Social Stress Makes Us More Vulnerable to Drug Use. *Metode* **2022**, *2022*, 63–69, doi:10.7203/METODE.12.18316.
340. Miczek, K.A.; Yap, J.J.; Covington, H.E. Social Stress, Therapeutics and Drug Abuse: Preclinical Models of Escalated and Depressed Intake. *Pharmacol. Ther.* **2008**, *120*.
341. Meerlo, P.; Sgoifo, A.; De Boer, S.F.; Koolhaas, J.M. Long-Lasting Consequences of a Social Conflict in Rats: Behavior during the Interaction Predicts Subsequent Changes in Daily Rhythms of Heart Rate, Temperature, and Activity. *Behav. Neurosci.* **1999**, *113*, 1283–1290, doi:10.1037//0735-7044.113.6.1283.
342. Graziane, N.M.; Polter, A.M.; Briand, L.A.; Pierce, R.C.; Kauer, J.A. Kappa Opioid Receptors Regulate Stress-Induced Cocaine Seeking and Synaptic Plasticity. *Neuron* **2013**, *77*, doi:10.1016/j.neuron.2012.12.034.
343. Niehaus, J.L.; Murali, M.; Kauer, J.A. Drugs of Abuse and Stress Impair LTP at Inhibitory Synapses in the Ventral Tegmental Area. *Eur. J. Neurosci.* **2010**, *32*, 108–117, doi:10.1111/J.1460-9568.2010.07256.X.
344. Saal, D.; Dong, Y.; Bonci, A.; Malenka, R.C. Drugs of Abuse and Stress Trigger a Common Synaptic Adaptation in Dopamine Neurons. *Neuron* **2003**, *37*, 577–582, doi:10.1016/S0896-6273(03)00021-7.
345. Daftary, S.S.; Panksepp, J.; Dong, Y.; Saal, D.B. Stress-Induced, Glucocorticoid-Dependent Strengthening of Glutamatergic Synapse Transmission in Midbrain Dopamine Neurons. *Neurosci. Lett.* **2009**, *452*, 273, doi:10.1016/J.NEULET.2009.01.070.
346. Holly, E.N.; Boyson, C.O.; Montagud-Romero, S.; Stein, D.J.; Gobrogge, K.L.; DeBold, J.F.;

- Miczek, K.A. Episodic Social Stress-Escalated Cocaine Self-Administration: Role of Phasic and Tonic Corticotropin Releasing Factor in the Anterior and Posterior Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 4093–4105, doi:10.1523/JNEUROSCI.2232-15.2016.
347. Hostetler, C.M.; Ryabinin, A.E. The CRF System and Social Behavior: A Review. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, doi:10.3389/FNINS.2013.00092.
348. Michael, A.C.; Ikeda, M.; Justice, J.B. Dynamics of the Recovery of Releasable Dopamine Following Electrical Stimulation of the Medial Forebrain Bundle. *Neurosci. Lett.* **1987**, *76*, doi:10.1016/0304-3940(87)90196-0.
349. Michael, A.C.; Ikeda, M.; Justice, J.B. Mechanisms Contributing to the Recovery of Striatal Releasable Dopamine Following MFB Stimulation. *Brain Res.* **1987**, *421*, doi:10.1016/0006-8993(87)91302-3.
350. Yavich, L. Two Simultaneously Working Storage Pools of Dopamine in Mouse Caudate and Nucleus Accumbens. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *119*, doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15753.x.
351. Suzuki, H.; Lucas, L.R. Neurochemical Correlates of Accumbal Dopamine D2 and Amygdaloid 5-HT 1B Receptor Densities on Observational Learning of Aggression. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* **2015**, *15*, 460–474, doi:10.3758/S13415-015-0337-8.
352. Moreau, J.L. Simulating the Anhedonia Symptom of Depression in Animals. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2002**, *4*, 351, doi:10.31887/DCNS.2002.4.4/JLMOREAU.
353. Althoa, A.; Seeman, P.; Kõiv, K.; Eller, M.; Harro, J. Rats with Persistently High Exploratory Activity Have Both Higher Extracellular Dopamine Levels and Higher Proportion of D2High Receptors in the Striatum. *Synapse* **2009**, *63*, 443–446, doi:10.1002/syn.20620.
354. Sandi, C.; Pinelo-Nava, M.T. Stress and Memory: Behavioral Effects and Neurobiological Mechanisms. *Neural Plast.* **2007**, *2007*, doi:10.1155/2007/78970.
355. Schaack, A.K.; Mocchi, M.; Przybyl, K.J.; Redei, E.E. Immediate Stress Alters Social and Object Interaction and Recognition Memory in Nearly Isogenic Rat Strains with Differing Stress Reactivity. *Stress* **2021**, *24*, 911–919, doi:10.1080/10253890.2021.1958203.
356. Penka, L.-L.; Bond, T.L.Y.; Heinrichs, S.C. Non-Specific Effect of Fear Conditioning and Specific Effect of Social Defeat on Social Recognition Memory Performance in Female Rats. *Stress* **2004**, *7*, 63–72, doi:10.1080/10253890410001677231.

357. Bangasser, D.A.; Eck, S.R.; Telenson, A.M.; Salvatore, M. Sex Differences in Stress Regulation of Arousal and Cognition. *Physiol. Behav.* **2018**, *187*, 42–50, doi:10.1016/j.physbeh.2017.09.025.
358. Oyola, M.G.; Handa, R.J. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axes: Sex Differences in Regulation of Stress Responsivity. *Stress* **2017**, *20*, 476–494, doi:10.1080/10253890.2017.1369523.
359. Borrow, A.P.; Handa, R.J. Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior. *Vitam. Horm.* **2017**, *103*, 27–52, doi:10.1016/bs.vh.2016.08.004.
360. Chen, S.; Gao, L.; Li, X.; Ye, Y. Allopregnanolone in Mood Disorders: Mechanism and Therapeutic Development. *Pharmacol. Res.* **2021**, *169*, 105682, doi:10.1016/j.phrs.2021.105682.
361. Kundakovic, M.; Rocks, D. Sex Hormone Fluctuation and Increased Female Risk for Depression and Anxiety Disorders: From Clinical Evidence to Molecular Mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* **2022**, *66*, 101010, doi:10.1016/j.yfrne.2022.101010.
362. Yehuda, R. Neuroendocrine Aspects of PTSD. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2005**, *169*, 371–403, doi:10.1007/3-540-28082-0_13.
363. Bromberg-Martin, E.S.; Matsumoto, M.; Hikosaka, O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* **2010**, *68*, 815–834, doi:10.1016/j.neuron.2010.11.022.
364. Tye, K.M.; Mirzabekov, J.J.; Warden, M.R.; Ferenczi, E.A.; Tsai, H.C.; Finkelstein, J.; Kim, S.Y.; Adhikari, A.; Thompson, K.R.; Andalman, A.S.; et al. Dopamine Neurons Modulate Neural Encoding and Expression of Depression-Related Behaviour. *Nature* **2013**, doi:10.1038/nature11740.
365. Suridjan, I.; Boileau, I.; Bagby, M.; Rusjan, P.M.; Wilson, A. a; Houle, S.; Mizrahi, R. Dopamine Response to Psychosocial Stress in Humans and Its Relationship to Individual Differences in Personality Traits. *J. Psychiatr. Res.* **2012**, *46*, 890–897, doi:10.1016/j.jpsychires.2012.03.009.
366. Vassout, A.; Bruinink, A.; Krauss, J.; Waldmeier, P.; Bischoff, S. Regulation of Dopamine Receptors by Bupropion: Comparison with Antidepressants and CNS Stimulants. *J. Recept. Res.* **1993**, *13*, 341–354, doi:10.3109/10799899309073665.

367. Cryan, J.F.; Bruijnzeel, A.W.; Skjei, K.L.; Markou, A. Bupropion Enhances Brain Reward Function and Reverses the Affective and Somatic Aspects of Nicotine Withdrawal in the Rat. *Psychopharmacology (Berl)*. **2003**, *168*, 347–358, doi:10.1007/s00213-003-1445-7.
368. Ascher, J.A.; Cole, J.O.; Colin, J.N.; Feighner, J.P.; Ferris, R.M.; Fibiger, H.C.; Golden, R.N.; Martin, P.; Potter, W.Z.; Richelson, E.; et al. Bupropion: A Review of Its Mechanism of Antidepressant Activity. *J. Clin. Psychiatry* **1995**, *56*, 395–401.
369. Huang, C.-C. Rattus, R. Norvegicus. *Vet. Res.* **2004**, *35*, 292–292, doi:10.1051/vetres:2004010.
370. Nomikos, G.G.; Damsma, G.; Wenkstern, D.; Fibiger, H.C. Effects of Chronic Bupropion on Interstitial Concentrations of Dopamine in Rat Nucleus Accumbens and Striatum. *Neuropsychopharmacology* **1992**, *7*.
371. Гончаров, Н.В.; Прокофьева, Д.С.; Войтенко, Н.Г.; Бабаков, В.Н.; Глашкина, Л.М. Молекулярные Механизмы Холинергической Регуляции и Дисрегуляции. *Токсикологический вестник* **2010**.
372. Rosenstock, L.; Keifer, M.; Daniell, W.E.; McConnell, R.; Claypoole, K. Chronic Central Nervous System Effects of Acute Organophosphate Pesticide Intoxication. The Pesticide Health Effects Study Group. *Lancet (London, England)* **1991**, *338*, 223–227, doi:10.1016/0140-6736(91)90356-T.
373. Reidy, T.J.; Bowler, R.M.; Rauch, S.S.; Pedroza, G.I. Pesticide Exposure and Neuropsychological Impairment in Migrant Farm Workers. *Arch. Clin. Neuropsychol.* **1992**, *7*, 85–95, doi:10.1093/ARCLIN/7.1.85.
374. Yokoyama, K.; Araki, S.; Murata, K.; Nishikitani, M.; Okumura, T.; Ishimatsu, S.; Takasu, N.; White, R.F. Chronic Neurobehavioral Effects of Tokyo Subway Sarin Poisoning in Relation to Posttraumatic Stress Disorder. *Arch. Environ. Health* **1998**, *53*, 249–256, doi:10.1080/00039899809605705.
375. Phillips, K.F.; Deshpande, L.S. Repeated Low-Dose Organophosphate DFP Exposure Leads to the Development of Depression and Cognitive Impairment in a Rat Model of Gulf War Illness. *Neurotoxicology* **2016**, *52*, 127–133, doi:10.1016/J.NEURO.2015.11.014.
376. Deshpande, L.S.; Carter, D.S.; Blair, R.E.; DeLorenzo, R.J. Development of a Prolonged Calcium Plateau in Hippocampal Neurons in Rats Surviving Status Epilepticus Induced by the Organophosphate Diisopropylfluorophosphate. *Toxicol. Sci.* **2010**, *116*, 623–631,

doi:10.1093/TOXSCI/KFQ157.

377. Pitman, R.K.; Rasmusson, A.M.; Koenen, K.C.; Shin, L.M.; Orr, S.P.; Gilbertson, M.W.; Milad, M.R.; Liberzon, I. Biological Studies of Post-Traumatic Stress Disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 769–787, doi:10.1038/NRN3339.
378. Tafet, G.E.; Bernardini, R. Psychoneuroendocrinological Links between Chronic Stress and Depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2003**, *27*, 893–903, doi:10.1016/S0278-5846(03)00162-3.
379. Siegrist, J. Chronic Psychosocial Stress at Work and Risk of Depression: Evidence from Prospective Studies. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2008**, *258 Suppl 5*, 115–119, doi:10.1007/S00406-008-5024-0.
380. Wilkinson, M.B.; Xiao, G.; Kumar, A.; LaPlant, Q.; Renthal, W.; Sikder, D.; Kodadek, T.J.; Nestler, E.J. Imipramine Treatment and Resiliency Exhibit Similar Chromatin Regulation in the Mouse Nucleus Accumbens in Depression Models. *J. Neurosci.* **2009**, doi:10.1523/JNEUROSCI.0932-09.2009.
381. Savolainen, K.M.; Hirvonen, M.R. Second Messengers in Cholinergic-Induced Convulsions and Neuronal Injury. *Toxicol. Lett.* **1992**, *64-65 Spec No*, 437–445, doi:10.1016/0378-4274(92)90217-8.
382. Chen, Y. Organophosphate-Induced Brain Damage: Mechanisms, Neuropsychiatric and Neurological Consequences, and Potential Therapeutic Strategies. *Neurotoxicology* **2012**, *33*, 391–400, doi:10.1016/J.NEURO.2012.03.011.
383. Alves, R.; Gilberto, J.; Carvalho, B. De; Antonio, M.; Venditti, C.; Al, E.T. High- and Low-Rearing Rats Differ in the Brain Excitability Controlled by the Allosteric Benzodiazepine Site in the GABA A Receptor. **2012**, *2012*, 315–325.
384. Wright, L.K.M.; Liu, J.; Nallapaneni, A.; Pope, C.N. Behavioral Sequelae Following Acute Diisopropylfluorophosphate Intoxication in Rats: Comparative Effects of Atropine and Cannabinomimetics. *Neurotoxicol. Teratol.* **2010**, *32*, 329–335, doi:10.1016/J.NTT.2009.12.006.
385. Жуков, Д.А. Изменение Тревожности После Введения Кортизола у Крыс, Селектированных По Способности к Выработке Активного Избегания. *ВНД* **2007**.
386. Ferland-Beckham, C.; Chaby, L.E.; Daskalakis, N.P.; Knox, D.; Liberzon, I.; Lim, M.M.;

- McIntyre, C.; Perrine, S.A.; Risbrough, V.B.; Sabban, E.L.; et al. Systematic Review and Methodological Considerations for the Use of Single Prolonged Stress and Fear Extinction Retention in Rodents. *Front. Behav. Neurosci.* 2021, 15.
387. Nemets, V.; Deal, A.; Gainetdinov, R.; Budygin, E. P.865 Consequences of a Single Social Defeat on Accumbal Dopamine Measures: In Vivo Voltammetric Study. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2020**, 40, doi:10.1016/j.euroneuro.2020.09.623.
388. Nemets, V.; Zavyalov, V.; Budygin, E.; Gainetdinov, R. Influence of Single Social Defeat Stress on Accumbal Dopamine Dynamics in Female Rats. *J. Neurol. Sci.* **2023**, 455, 122134, doi:10.1016/j.jns.2023.122134.
389. Nemets, V.; Zavyalov, V.; Chepik, P.; Gainetdinov, R.; Budygin, E. P.0850 Different Dopamine Responses in Female Rats with Aggressive and Defensive Stress Coping. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2021**, 53, S622, doi:10.1016/j.euroneuro.2021.10.709.

Приложение 1**А - Биохимические показатели крыс после действия субхронического иммобилизационного стресса**

Группы животных по стратегии поведения	Экспериментальные группы животных	TRIG	CREA	HDL	LDL	CHOL
АД	Контроль (n=5)	1.01±0.20	62.68±1.23	0.59±0.11	0.30±0.06	1.23±0.14
	Стресс (n=11)	0.93±0.06	61.95±1.01	0.64±0.05	0.19±0.01	1.33±0.10
ПС	Контроль (n=5)	0.93±0.08	61.88±0.77	0.60±0.01	0.23±0.04	1.18±0.33
	Стресс (n=10)	1.19±0.23	60.32±0.91	0.67±0.08	0.21±0.22	1.31±0.15

Изменения различных биохимических показателей крови у крыс, измеренные в ммоль/л. Группы: «активные доминанты» (АД) и «пассивные субординанты» (ПС) под действием субхронического иммобилизационного стресса. Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего. TRIG – Триглицериды; CREA - Креатинин; HDL;LDL – Холестерин липопротеинов высокой и низкой плотности; CHOL – Холестерин общий.

В – Анализ к кортикостерона в плазме крови крыс до действия субхронического иммобилизационного стресса

Группы животных по стратегии поведения	Значения концентрации кортикостерона, нг/мл
АД (ФОН)	261,13±39,4
ПС (ФОН)	339,06±48,7

Фоновые изменения концентрации кортикостерона в крови у крыс. Группы: «активные доминанты» (АД) и «пассивные субординанты» (ПС). Данные представлены в виде среднего, % ± стандартная ошибка среднего

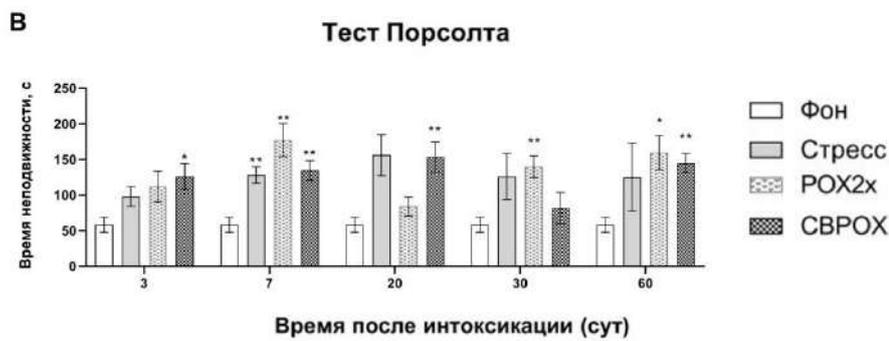
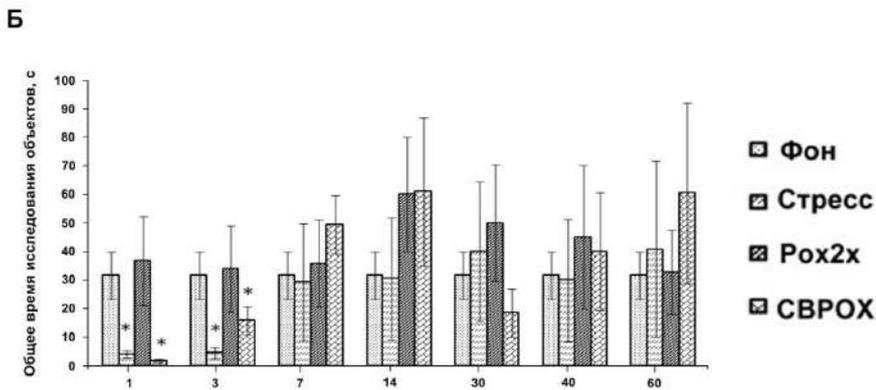
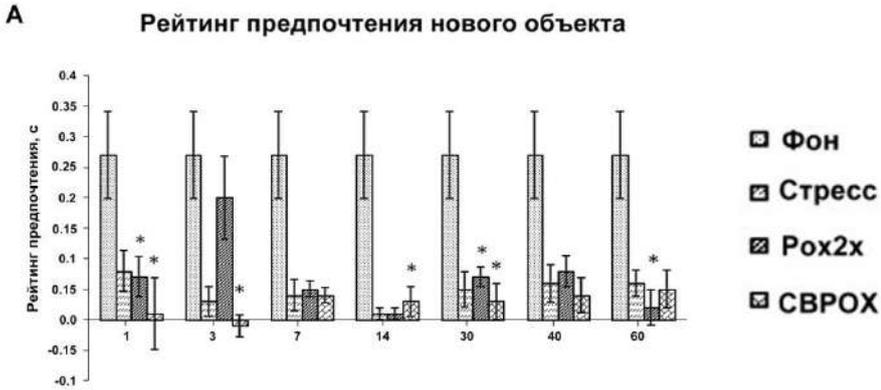
С - Соотношение животных различного социального статуса в группах «активных» и «неактивных» животных в популяции крыс

Стратегия поведения в стрессорной ситуации	Социальные группы
«Высоко активные животные» (n=21)	42% доминанты
	28 % субдоминанты
	28 % субординанты
«Низко активные животные» (n=37)	5% доминанты
	20 % субдоминанты
	75 % субординанты

Для выявления стратегии поведения в стрессорной ситуации здесь и далее использовали тест «УРАИ». Социальный статус животного в клетке определяли с помощью теста «конкуренция за витальный ресурс».

Д - Соотношение животных различного социального статуса и стратегий поведения

Группы животных	Результаты теста «УРАИ», %	Результаты теста «водная депривация», %
Высоко активные доминанты (n = 17)	100% Высоко активные животные	84% доминанты
		6 % субдоминанты
		10 % субординанты
Низко активные субординанты (n = 17)	100% Низко активные животные	0% доминанты
		12 % субдоминанты
		88 % субординанты



Е - Снижение показателей когнитивной активности и увеличение депрессивности у крыс после острого отравления ФОС (РОХ и СВРОХ), так же крыс-соседей (группа «стресс»)

Поведение животных (А – В) в течение 60 суток в группах: РОХ2х (n=6) и СВРОХ (n=6), Стресс (n=6), Фон (n=11).

По оси У – рейтинг предпочтения нового объекта ранее предъявляемому (А); общее время исследования всех объектов за 3 мин., с (Б); время неподвижности за 6 мин исследования, с (В).

По оси Х – время после интоксикации, сут. Различия статистически значимы (* - $P < 0.05$; ** - $P < 0.005$, *** - $P < 0.0001$, непараметрический Манн-Уитни тест) по сравнению с фоновыми показателями.

Данные представлены как $M \pm SEM$.