

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Об основных результатах научно-квалификационной работы **ВЛИЯНИЕ ГАЛОПЕРИДОЛА НА ВЫРАЖЕННОСТЬ СТРЕССОРНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ НЕИЗБЕЖАЕМОГО СТРЕССА**

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре

По направлению подготовки кадров высшей квалификации

30.00.00 Фундаментальная медицина

Специальность 03.03.01 Физиология

Аспирант: Ступин Константин Николаевич

Научный руководитель: Рыбникова Елена Александровна, доктор
биологических наук

Работа выполнена в лаборатории: Регуляции функций нейронов мозга ИФ
РАН

Заведующий лабораторией: Рыбникова Елена Александровна, доктор
биологических наук

Допустить к представлению научного доклада _____ 2022 г.

Санкт-Петербург

2022

Оглавление

Актуальность темы исследования	3
Цель и задачи исследования	6
Научная новизна	6
Теоретическая и практическая значимость	6
Материалы и методы	7
Основные результаты	11
Заключение	22
Выводы	23
Апробация работы	23
Список публикаций по теме научно-квалификационной работы	23
Список литературы	24

Актуальность темы исследования

Несмотря на многолетние и многочисленные исследования, дофаминергическая система головного мозга и в настоящее время остается в центре внимания нейробиологов, занимающихся изучением механизмов развития аддикции, патогенеза болезни Паркинсона и шизофрении. Хорошо известно также, что дофаминовая система вовлечена в формирование стрессорного ответа организма[1]. Раскрытие роли дофаминергической системы головного мозга в механизмах запуска и интеграции стрессорных реакций необходимо для понимания процессов патогенеза постстрессорных психических расстройств.

Дофаминергические нейроны располагаются в среднем мозге в составе черной субстанции и области вентральной тегментальной покрышки (VTA). Аксоны этих нейронов формируют нигростриарный, мезолимбический и мезокортикальный дофаминергические пути. Нигростриарный путь соединяет нейроны чёрной субстанции с нейронами дорзального стриатума и участвует в экстрапирамидной регуляции двигательной активности, в особенности произвольных движений.

Мезолимбический путь соединяет VTA с прилежащим ядром и обонятельным бугорком которые располагаются в вентральном стриатуме. VTA содержит дофаминергические, ГАМК-ергические и глутаматергические нейроны. Дофаминергические нейроны получают импульсы от холинергических нейронов пендукулопонтинного ядра и латеродорзальных ядер покрышки, а также от глутаматергических нейронов префронтальной коры. Прилежащее ядро в основном состоит из тормозных средних шипиковых нейронов, подразделяется на моторную и лимбическую части, также известные как ядро и скорлупа. Средние шипиковые нейроны прилежащего ядра получают сигналы от дофаминергических нейронов VTA и глутаматергических нейронов гиппокампа, миндалина и префронтальной коры. Активация шипиковых нейронов приводит к торможению нейронов вентральной части бледного шара.

Мезокортикальный путь соединяет область вентральной покрышки с префронтальной корой. Медиальная префронтальная кора (mPFC) вовлечена в реализацию множества когнитивных и поведенческих функций, таких как: внимание, память, принятие решений, эмоциональный контроль и мотивация. Не смотря на то, что эти функции могут показаться в корне различными, все они относятся к когнитивному контролю, или, иными словами, способности координировать эмоции и действия для поддержания внутренних целей [2]. Повреждение mPFC приводит к нарушениям в выполнении заданий, в

которых требуется приспособление поведения к различным условиям, или заданий с динамически меняющимися или непредсказуемыми правилами [3-5]. Таким образом, mPFC играет значительную роль в поддержании уместного в конкретных условиях поведения. Не смотря на достаточно низкую плотность дофаминергических терминалей в mPFC, мотивационно значимые стимулы оказывают выраженное модулирующее влияние на дофаминергическую нейротрансмиссию в этой области [6,7], что в свою очередь влияет на активность mPFC [8]. Висследованиях с использованием метода внутримозгового микродиализа показано повышение уровня внеклеточного дофамина в mPFC в ответ на положительные стимулы [9-11]. Фазовый характер ответа дофаминергических терминалей в mPFC в ответ на вознаграждение обнаружен с помощью *in vivo* волоконной фотометрии. [12]. Помимо работ, демонстрирующих высвобождение дофамина в mPFC в ответ на положительные стимулы, существует немало исследований, в которых наблюдалось повышение уровня внеклеточного дофамина в ответ на аверсивные воздействия [13,14]. Стрессорные воздействия, как правило, являются мотивационно значимыми и оказывают негативное действие. Например, длительный стресс нарушает половое поведение самцов крыс [15]. Стрессовые воздействия приводят к снижению двигательной активности и увеличению времени неподвижности в тесте Порсолта [16]. Хронический стресс вызывает нарушение оборонительного поведения и снижение потребления раствора глюкозы [17]. Эти данные указывают на нарушения в распознавании мотивационно значимых стимулов в ответ на стрессорные воздействия, что является показателем дисфункции дофаминергической системы. В исследованиях с использованием *in vivo* микродиализа обнаружено изменение высвобождения дофамина в прилежащем ядре и mPFC в ответ на стресс. Важно отметить, что повторяющийся стресс способен изменять как тоническую (базальный уровень дофамина) так и фазовую (высвобождение в ответ на стимуляцию) активность дофаминергических нейронов [18,19]. При этом от длительности и интенсивности стрессовых воздействий зависит уровень внеклеточного дофамина в прилежащем ядре и mPFC. К примеру, острый стресс социального угнетения повышает уровень дофамина в прилежащем ядре, в то время как хроническое воздействие приводит к снижению дофамина в данной области [20]. Неизбегаемый стресс приводит к снижению уровня дофамина в прилежащем ядре [21], при этом в mPFC происходит повышение уровня дофамина [22].

Приведённые выше данные демонстрируют повышение уровня дофамина в ответ на острое стрессорное воздействие. Импульсация

дофаминергических нейронов повышается при построении и реализации программ, направленных на достижение мотивационно значимых результатов. В условиях неизбежного стресса построение программ не может закончиться достижением результата, который заключается в прекращении стрессорного воздействия, ухода от него. При этом значительные выбросы дофамина в конечном счёте приводят к развитию дисбаланса в работе дофаминергической системы головного мозга, что сопровождается развитием тревожно-депрессивных дезадаптивных состояний, которые регистрируются у животных после неизбежного стресса. На этом основании было сделано предположение о том, что снижение активности дофаминовой системы или блокирование ее активации во время неизбежного стресса, может оказывать стресс-протективное действие.

Для снижения активности дофаминовой системы во время неизбежного стресса был выбран ингибитор дофаминовых рецепторов – галоперидол. На сегодняшний день известно пять видов дофаминовых рецепторов, которые подразделяются на два больших класса: D1-подобные рецепторы и D2-подобные рецепторы. К D1-подобным рецепторам относятся рецепторы D1 и D5. Характерной особенностью рецепторов этого класса является то, что они активируют G-белки семейства $G_{\alpha_{s/olf}}$, которые в свою очередь активируют аденилатциклазу. D1-подобные рецепторы обнаруживаются только на постсинаптических мембранах клеток, чувствительных к дофамину. К D2-подобным рецепторам относятся рецепторы D2, D3 и D4. Эти рецепторы связываются с G-белками семейства $G_{\alpha_{i/o}}$ и поэтому ингибируют аденилатциклазу. Галоперидол способен взаимодействовать как с D1 так и с D2 дофаминовыми рецепторами, однако аффинность галоперидола к D2 рецепторам в 10 раз превышает аффинность к D1 рецепторам. В отличие от D1-подобных, рецепторы D2 и D3 присутствуют не только на постсинаптических мембранах клеток, чувствительных к дофамину, но и на пресинаптических мембранах дофаминергических нейронов. В mPFC, ядрах стриопаллидарной системы и обонятельного бугорка D1-рецепторы преобладают над D2 [2,3]. В VTA обнаруживаются только D1-рецепторы, причём их плотность в данной структуре не велика [23].

Галоперидол известен своим антипсихотическим эффектом, который используется для подавления продуктивных психопатологических симптомов. Не смотря на то, что галоперидол не является анксиолитическим препаратом, на основе вышеописанных данных можно предположить, что применение антагонистов дофаминовых рецепторов в момент острого

стрессового воздействия может значительно снизить выраженность стрессовых реакций в ответ на неизбежный стресс и оказаться действенным способом профилактики постстрессорных дезадаптивных состояний.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось исследование возможного стресс-протективного действия галоперидола в модели неконтролируемого неизбежного аверсивного стресса у крыс.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние галоперидола на активность основной гормональной оси стрессорного ответа - гипоталамо-гипофизарно-адреноренальной системы (уровень кортикостерона в плазме крови) у интактных крыс и у крыс после неизбежного стресса.
2. Оценить влияние галоперидола на поведение интактных крыс и крыс после неизбежного стресса в тестах оценивания реакции бегства, «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».
3. Охарактеризовать отсроченные функциональные и морфологические параметры у интактных крыс и крыс после неизбежного стресса.

Научная новизна

В проведенном исследовании блокатор дофаминовых рецепторов - галоперидол применялся с целью снижения интенсивности стрессорной реакции в ответ на неизбежный стресс и предотвращения развития постстрессорных дезадаптивных состояний.

Впервые было показано, что инъекции галоперидола перед стрессовым воздействием предотвращают изменения уровня кортикостерона на 2-е сутки после неизбежного стресса.

Установлено, что угнетение поведения, направленного на поиск путей избегания стрессорного воздействия, возникающее в ответ на действие неизбежного стрессорного воздействия, не сопровождается стойкими функциональными дезадаптивными нарушениями и, по всей видимости, является механизмом адаптации к данному виду воздействий.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе выполнения исследования было установлено, что применение блокатора дофаминовых рецепторов – галоперидола во время неизбежного стресса снижает интенсивность стрессорного воздействия в условиях неизбежного стресса и выраженность патологических последствий. Таким образом, в дополнение к известному антипсихотическому эффекту данного препарата, было показано, что галоперидол также обладает стресс-протективным действием.

Материалы и методы

Работа была выполнена на взрослых самцах лабораторных крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar с массой тела 250-300 г из биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном чередовании суточной освещенности и с постоянным доступом к воде и пище.

В эксперименте участвовало 126 животных. Животные были распределены на следующие группы:

1. Контрольная группа (К) – получала инъекции физиологического раствора в течение 3 последовательных дней, не подвергалась неизбежному стрессу, не подвергалась тесту на оценивание реакции бегства.
2. Группа животных, которая подверглась неизбежному стрессу (С) - получала инъекции физиологического раствора в течение 3 последовательных дней, подвергалась тесту на оценивание реакции бегства после 3 дней неизбежного стресса.
3. Группа животных, которые получали инъекции галоперидола за 10 мин до сеансов неизбежного стресса (С+Г) - подвергалась тесту на оценивание реакции бегства после 3 дней неизбежного стресса.
4. Группа животных получавшая инъекции галоперидола в течение 3 последовательных дней (К+Г) - не подвергалась неизбежному стрессу, не подвергалась тесту на оценивание реакции бегства.
5. Группа животных, получившая инъекцию галоперидола за 10 мин перед тестом на оценивание реакции бегства. (Г) - получала инъекции физиологического раствора в течение 3 последовательных дней, не подвергалась неизбежному стрессу.

6. Группа животных которая подверглась тесту на оценивание реакции бегства (К+Из) - получала инъекции физиологического раствора в течение 3 последовательных дней, не подвергалась неизбежному стрессу.
7. Группа животных получавших инъекции галоперидола в течение 3 последовательных дней (Г+Из) - не подвергалась неизбежному стрессу, подвергалась тесту на оценивание реакции бегства.

Работа подразделялась на два блока.

Первый блок был направлен на изучение влияние галоперидола на стрессорные реакции организма, возникающие в ответ на острый неизбежный стресс. (рис. 1.)

Второй блок работы был направлен на изучение долговременных эффектов неизбежного стресса. (рис. 2.)

Модель стрессирования. Экспериментальные животные подвергались неконтролируемому неизбежному стрессу по 1 часу в течение 3 последовательных дней. Неизбежный стресс создавался путем электрокожной стимуляции (1 МА, 1 Гц) в замкнутом пространстве установки с токопроводящим полом, с временным интервалом случайной длительности от 1 до 15 сек, 60 стимуляций (1 час) [24].

Тест на оценивание реакции бегства. Экспериментальные животные помещались в камеру с токопроводящим полом и высотой стенок 15 см, крышка камеры оставалась открытой во время нанесения электрокожной стимуляции (1 МА, 1 Гц). Регистрировалось количество попыток бегства из камеры и продолжительность активных движений направленных на поиск выхода из камеры в течение 15 минут.

Галоперидол (5 мг/мл, амп.) вводился интраперитонеально в дозировке 0.1 мг/кг за 10 мин. до неизбежного стресса или теста активного избегания в соответствии с данными о фармакокинетики этого препарата.

Тест «Открытое поле» (ОП) [25], Тестирование проводили в установке круглой формы, площадью 0.71 м², разбитой на 20 квадратов. Испытуемое животное помещали на периферический квадрат открытого поля и в течение 5 минут фиксировали его активность. Регистрировалось количество пересеченных квадратов различных зон установки, время груминга, вертикальных стоек, неподвижности.

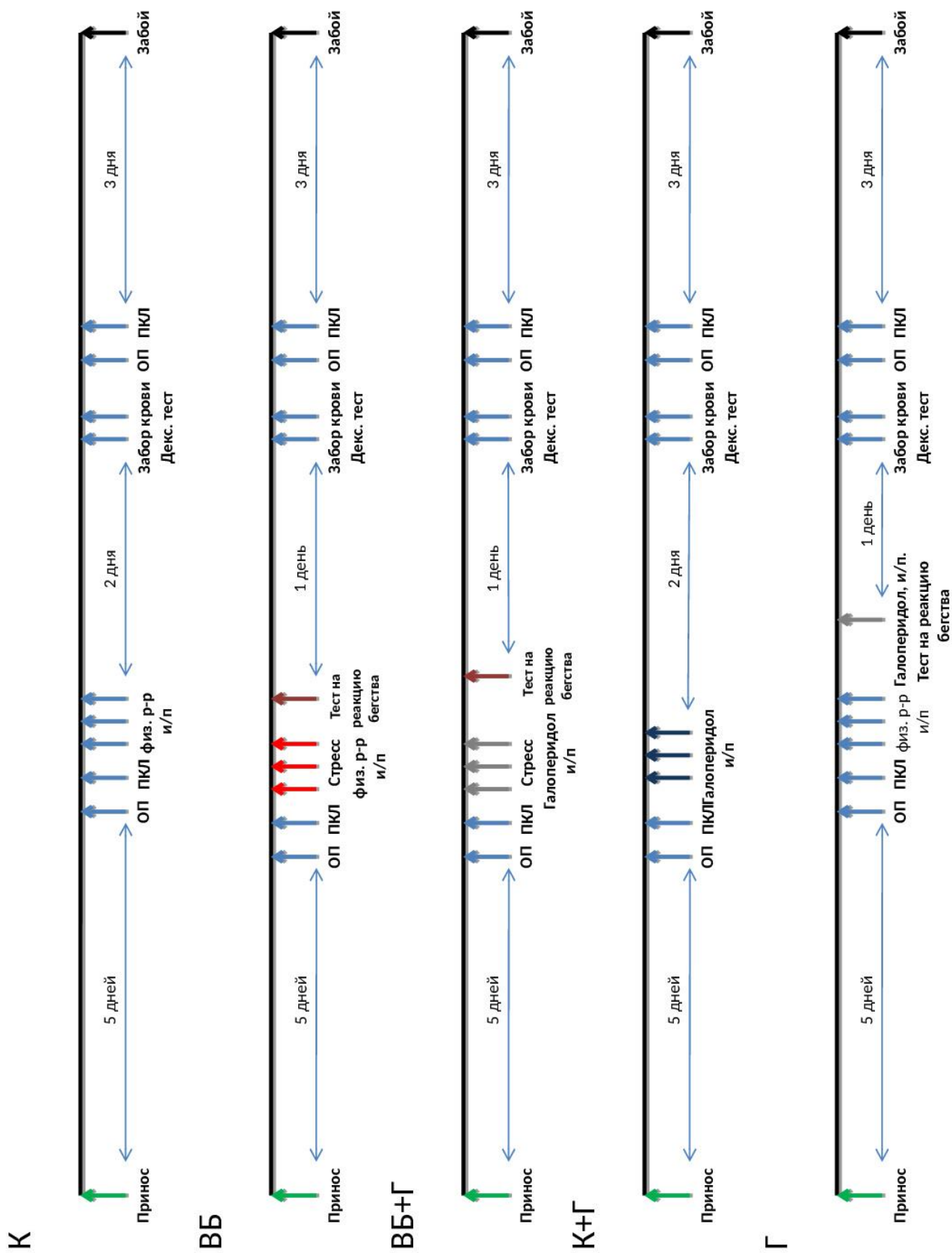


Рис 1. Дизайн первого блока экспериментов.

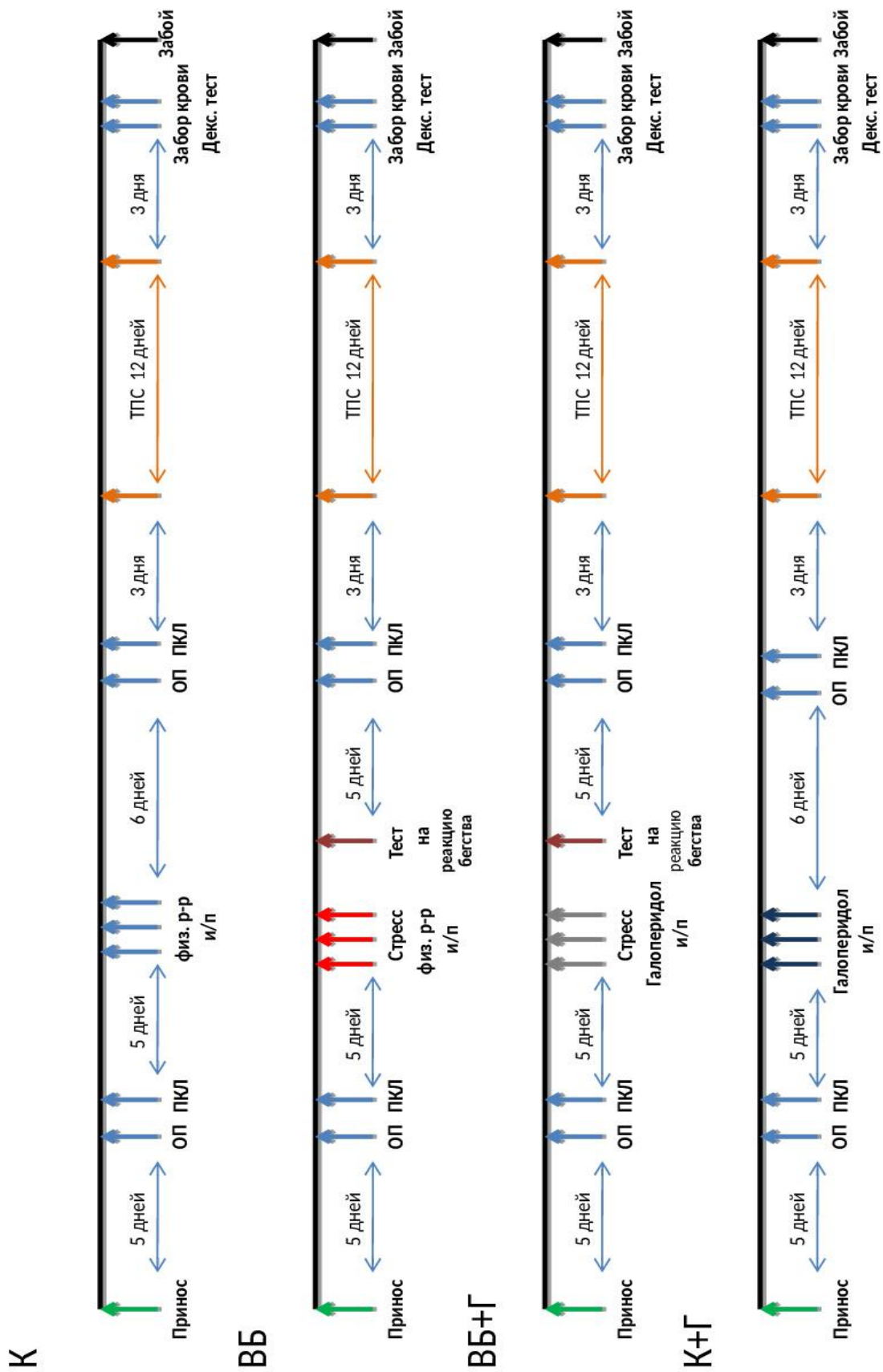


Рис 2. Дизайн второго блока экспериментов.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) [26]. Крыса помещалась в центре пересечения рукавов, в течение 5 минут регистрировался выбор рукавов, время, проведенное в них, а также в центральном участке, количество переходов между открытыми и закрытыми рукавами.

«Тест потребления сахарозы» [27]. Тест проводился в течение 3 недель. Экспериментальные животные рассаживались в одиночные клетки. В каждую клетку устанавливались две поилки объемом 150 мл. Одна поилка наполнялась раствором сахарозы 50 г/л, другая обычной водой. Поилки ежедневно взвешивались и менялись местами для предотвращения привыкания к поилке и создания условий для поиска раствора сахарозы. В течение первой недели крысы адаптировались к эксперименту. В течение последующих двух недель велось взвешивание и регистрация выпитой воды и раствора сахарозы. Данные представлены в виде среднего потребления чистой глюкозы из раствора за 2 недели.

Дексаметазоновый тест [28]. В первый день в 10:00 производилась интраперитонеальная инъекция физиологического раствора в 16:00 производился забор хвостовой крови для определения базального уровня кортикостерона. Утром следующего дня в 10:00 интраперитонеально вводился дексаметазон (4 мг/мл, амп) в дозировке 0.025 мг/кг, через 6 часов в 16:00 производился забор хвостовой крови.

Исследование уровня глюкозы в крови выполнялось в 10:00 у крыс после голодания в течение 12 часов. Забиралась капиллярная кровь из хвоста. Уровень глюкозы измерялся с помощью электрохимического глюкометра Diacont Classic.

Забор материала и гистологическая проводка выполнялась по стандартной методике. Полученные срезы инкубировали с первичными моноклональными кроличьими антителами к белку маркеру синапсов синаптофизину (Syn (M), Abcam1:400). И белку маркеру тел белков (NeuN; Abcam1:400). После инкубации на стекла наносили вторичные биотинилированные антитела и раствор авидин-биотинового комплекса, из набора для детекции фирмы Vector Laboratories Inc. (UK, PK-4001, авидин-биотиновая система детекции). Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовался диаминобензидиновый набор (Peroxidase Substrate Kit DAB:SK-4100, Vector Laboratories, UK).

Иммуноферментный анализ для определения уровня глюкокортикоидных гормонов плазмы крови выполнялся с использованием коммерческого набора «Кортикостерон крыса/мышь» (K210R, Хема) по стандартной методике.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программы GraphPadPrism 8. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты по экспериментальным группам представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of the mean).

Основные результаты

Первая часть исследования была направлена на изучение влияния галоперидола на стрессорные реакции организма, возникающие в ответ на острый неизбежный стресс.

Введение галоперидола подавляет попытки избегания стрессорного воздействия в тесте оценивания реакции бегства

В тесте оценивания реакции бегства группа животных, которые получили инъекцию галоперидола за 10 мин до теста, имела достоверно сниженное количество попыток избегания ($p = 0.031$, t-тест, рис. 3), и сниженную продолжительность активных движений в установке ($p = 0.006$, t-тест, рис. 4).

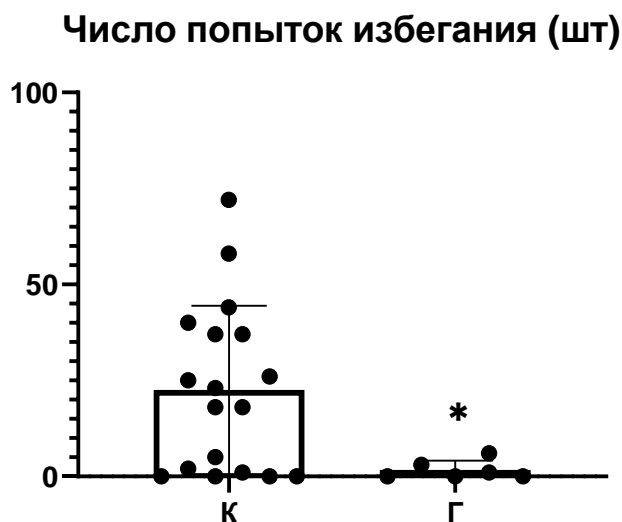


Рис 3. Результаты теста оценивания реакции бегства. Показано количество попыток избегания авersive воздействия крысами контрольной группы (К, $n=18$) и группой крыс получивших инъекцию галоперидола за 10 мин до теста (Г, $n=6$).

Активные движения (сек)

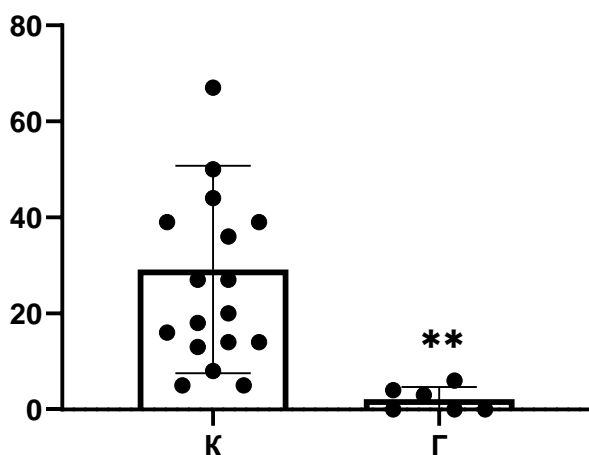


Рис 4. Результаты теста оценивания реакции бегства. Показана продолжительность активных движений у крыс контрольной группы (К, n=18) и группы крыс получивших инъекцию галоперидола за 10 мин до теста (Г, n=6).

Представленные данные демонстрируют способность галоперидола к подавлению реакции бегства. Каким образом данный эффект повлиял на развитие стрессорных реакций продемонстрировано в ходе дальнейшей работы.

Влияние галоперидолана показатели в тесте оценивания реакции бегства

Тест оценивания реакции бегства проводился на следующий день после последнего сеанса неизбежного стресса. Обнаружено что введение галоперидола за 10 минут перед сеансами неизбежного стресса приводило к статистически значимому снижению количества попыток избегания ($p=0.026$, Kruskal-Wallis тест, рис. 5) и продолжительности активных движений ($p<0.0001$, Kruskal-Wallis тест, рис. 6) по отношению к контролю.

У животных, которые подвергались неизбежному стрессу без введения галоперидола, отмечаются менее выраженные изменения в данном тестировании. А именно - количество попыток избегания не имеет достоверной разницы по отношению к контролю ($p=0.1$, Kruskal-Wallis тест, рис. 5), продолжительность активных движений достоверно снижена ($p=0.0002$, Kruskal-Wallis тест, рис. 6).

При этом животные, которые получали инъекции галоперидола, но не подвергались неизбежному стрессу имеют показатели, не отличающиеся от

контрольных значений. Это указывает на то, что галоперидол сам по себе не обуславливает выработку подобного поведения.

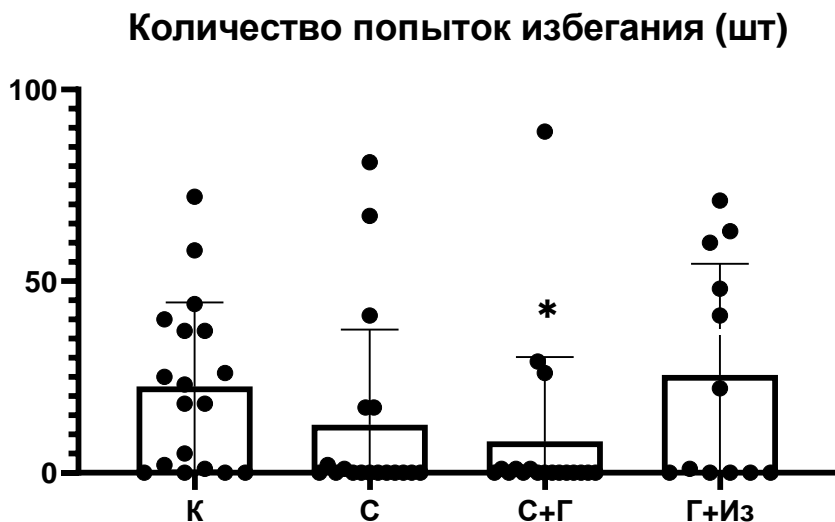


Рис 5. Результаты теста оценивания реакции бегства. Показано количество попыток избегания стрессорного воздействия крысами контрольной группы (К, n=18), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=18) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=18) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12).



Рис 6. Результаты теста оценивания реакции бегства. Показана продолжительность активных движений у крыс контрольной группы (К, n=18), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=18) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=18) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12)

Влияние галоперидола на состояние глюкокортикоидной системы на 2-е сутки после неизбежного стресса

Введение галоперидола перед сеансами неизбежного стресса способствует нормализации уровня кортикостерона на 2-е сутки после неизбежного стресса. У животных, которые подвергались неизбежному стрессу без введения галоперидола, отмечается пониженный уровень кортикостерона по отношению к контролю ($p=0.034$, Ordinary one-way ANOVA, рис. 7.).

В дексаметазоновом тесте, проведённом на 3-е сутки после неизбежного стресса, было обнаружено статистически достоверное снижение уровня кортикостерона через 6 часов после введения дексаметазона по сравнению с базальным значением кортикостерона во всех группах (К, $p<0.0001$; С, $p=0.001$; С+Г, $p<0.0001$; К+Г, $p<0.0001$, 2way ANOVA, рис 8.). Данный факт свидетельствует о нормальном функционировании механизма глюкокортикоидной отрицательной обратной связи у животных, которые подверглись неизбежному стрессу в независимости от введения галоперидола.

Снижение уровня кортикостерона на 2-е сутки после неизбежного стресса, по всей видимости, возникает как следствие резкого повышения уровня кортикостерона в ответ на стрессовое воздействие, в свою очередь запускающего процессы глюкокортикоидного торможения по механизму отрицательной обратной связи.

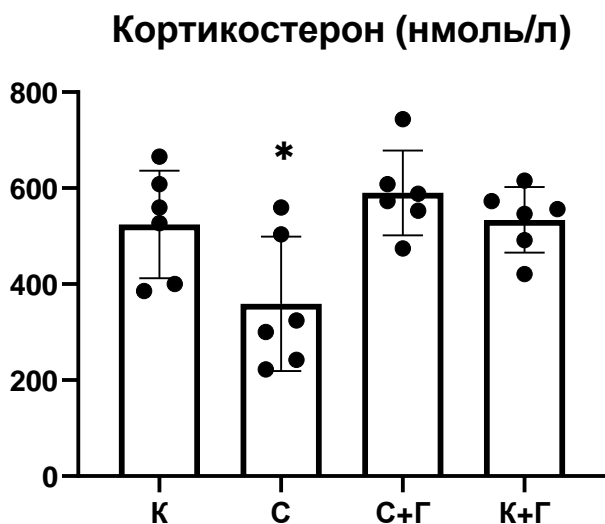


Рис. 7. Базальный уровень кортикостерона на 2-е сутки после неизбежного стресса. Показан уровень кортикостерона в хвостовой крови, взятой в 16:00 у крыс контрольной группы (К, $n=6$), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, $n=6$) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, $n=6$) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+ИЗ, $n=6$)

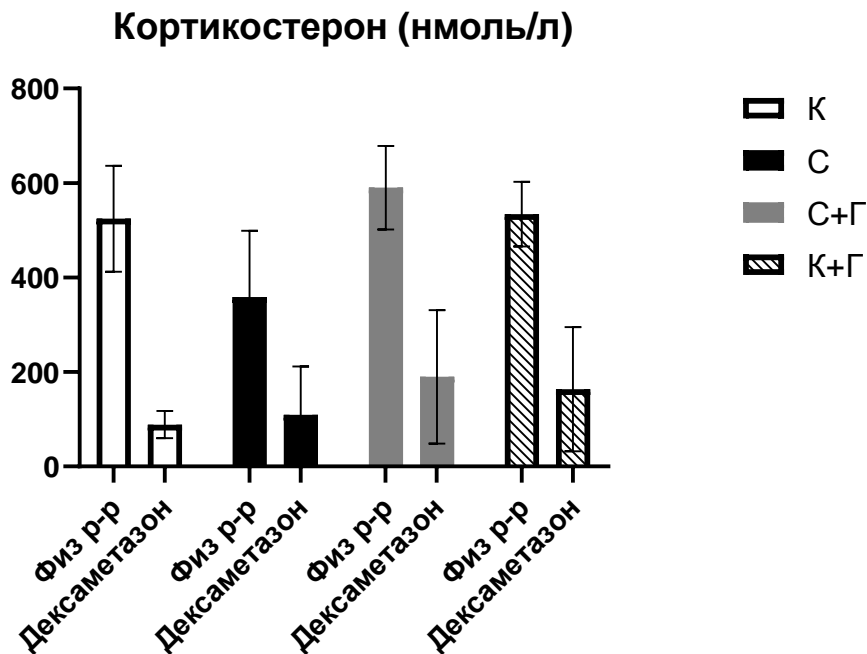


Рис. 8. Базальный уровень кортикостерона и уровень кортикостерона через 6 часов после введения дексаметазона на 3-и сутки после неизбежного стресса. Показан базальный уровень кортикостерона и уровень кортикостерона через шесть часов после введения дексаметазона у крыс контрольной группы (К, n=6), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=6) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=6) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=6).

Пониженный уровень кортикостерона на 2-е сутки после неизбежного стресса в совокупности с данными о нормально функционирующей отрицательной обратной связи, а также с данными теста оценивания реакции бегства указывает на то, что угнетение реакции бегства на следующие сутки после неизбежного стресса, очевидно, является механизмом физиологической адаптации к неизбежному стрессу.

В тоже время нормализация уровня кортикостерона у животных, получавших инъекции галоперидола во время сеансов неизбежного стресса, свидетельствует о снижении интенсивности стрессорной реакции организма в ответ на действие галоперидола.

Влияние галоперидола на поведение крыс, подвергавшихся неизбежному стрессу, в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Через сутки после последнего сеанса неизбежного стресса в тесте «Открытое поле» показатели поведения крыс, вне зависимости от

введения галоперидола во время неизбежного стресса, не отличались от контрольных значений. Периферическая активность (К vs С, $p=0.129$; К vs С+Г, $p=0.275$; К vs К+Г, $p=0.255$; Ordinary one-way ANOVA, рис. 9). Центральная активность (К vs С, $p>0.999$; К vs С+Г, $p>0.999$; К vs К+Г, $p>0.999$; Kruskal-Wallis тест, рис.10). Исследовательская активность (К vs С, $p=0.101$; К vs С+Г, $p=0.971$; К vs К+Г, $p=0.434$; Ordinary one-way ANOVA, рис. 11), Продолжительность полной неподвижности (К vs С, $p>0.999$; К vs С+Г, $p>0.999$; К vs К+Г, $p=0.307$, Kruskal-Wallis тест, рис. 12)

Через 7 суток после последнего сеанса неизбежного стресса в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» показатели поведения крыс, вне зависимости от введения галоперидола во время неизбежного стресса, не отличались от контрольных значений. Продолжительность времени проведенного в закрытых рукавах (К vs С, $p=0.893$; К vs С+Г, $p=0.674$; К vs К+Г, $p>0.999$; Ordinary one-way ANOVA, рис. 13). Продолжительность времени проведенного в открытых рукавах (К vs С, $p>0.999$; К vs С+Г, $p=584$; К vs К+Г, $p>0.999$; Kruskal-Wallis тест, рис. 14)

Полученные данные указывают на то, что к 6-м суткам после неизбежного стресса полностью нивелируются проявления тревожно-депрессивного поведения. При этом введение галоперидола за 6 суток до тестирования не имеет влияния на показатели поведения.

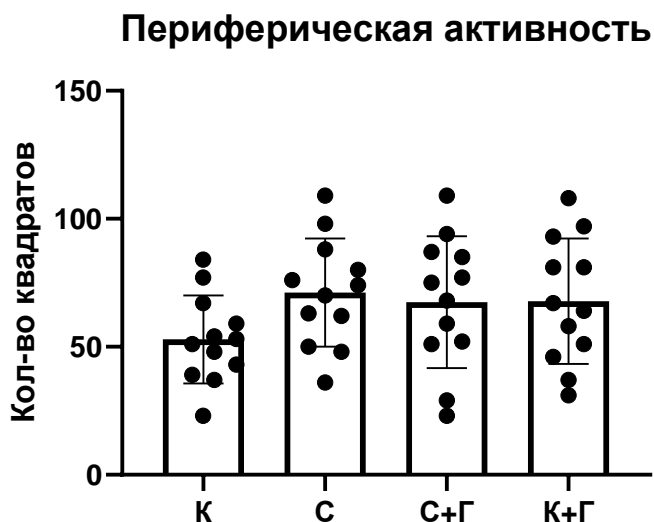


Рис 9. Результаты теста «Открытое поле». Показана периферическая активность у крыс контрольной группы (К, $n=12$), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, $n=12$) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, $n=12$) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола, но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, $n=12$)

Центральная активность

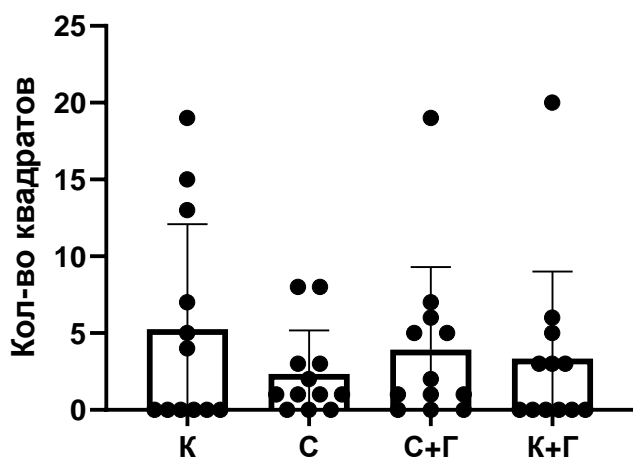


Рис 10. Результаты теста «Открытое поле». Показана центральная активность у крыс контрольной группы (К, n=12), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=12) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=12) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12)

Исследовательская активность (сек)

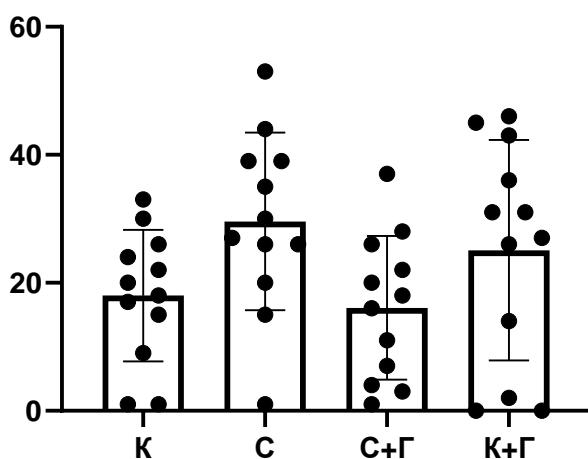


Рис 11. Результаты теста «Открытое поле». Показана исследовательская активность у крыс контрольной группы (К, n=12), группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=12) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=12) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12)

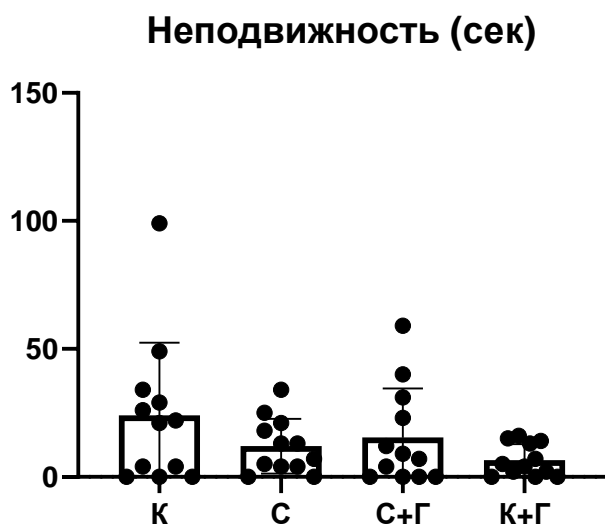


Рис 12. Результаты теста «Открытое поле». Показана продолжительность полной неподвижности у крыс контрольной группы (К, n=12), группы крыс, которая подверглись неизбежному стрессу (С, n=12) группы крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=12) и группы крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12).

Время проведённое в закрытых рукавах (сек)

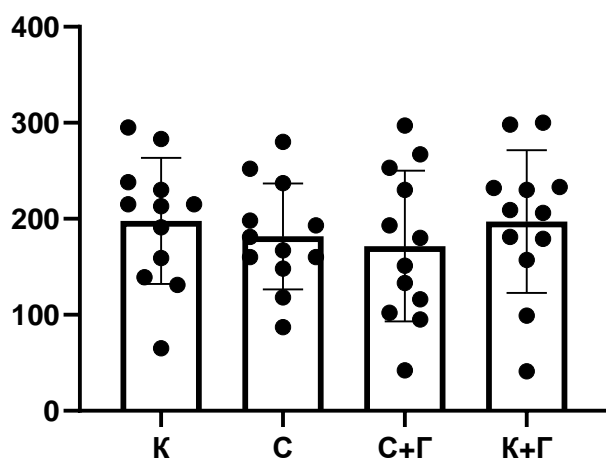


Рис 13. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Показана продолжительность времени проведенного в закрытых рукавах крысами контрольной группы (К, n=12), группой крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=12) группой крыс, которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=12) и группой крыс, которая получала инъекции галоперидола но не подвергалась неизбежному стрессу (Г+Из, n=12)

Время проведённое в открытых рукавах (сек)

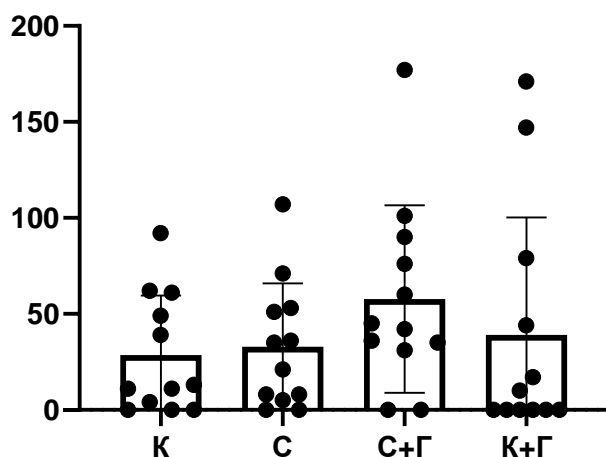


Рис 14. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Показана продолжительность времени проведенного в открытых рукавах крысами контрольной группы (К, n=12), группой крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=12) группой крыс которая получала инъекции галоперидола перед неизбежным стрессом (С+Г, n=12) и группой крыс которая получала инъекции галоперидола но не подвергались неизбежному стрессу (Г+Из, n=12)

Следующая часть работы была направлена на изучение долговременных эффектов неизбежного стресса.

Отсроченное влияние неизбежного стресса на глюкокортикоидную систему

Уровень кортикостерона у крыс на 27-е сутки после неизбежного стресса не отличается от контрольных значений ($p = 0.47$, t-тест, рис. 15)

Кортикостерон (нмоль/л)

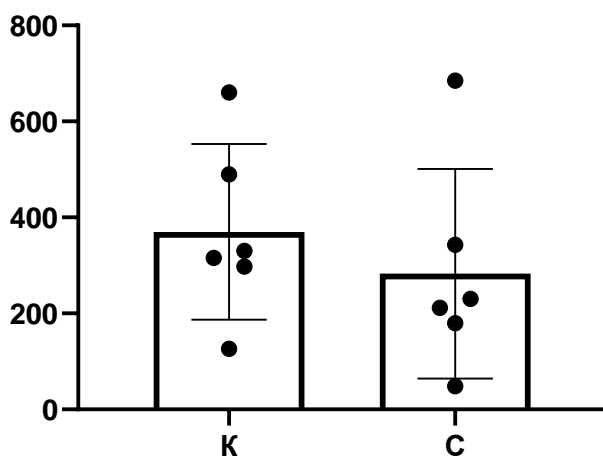


Рис. 15. Базальный уровень кортикостерона на 27-е сутки после неизбежного стресса. Показан уровень кортикостерона в хвостовой крови, взятой в 16:00 у крыс контрольной группы (К, n=6), и группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=6)

Введение дексаметазона на 28-е сутки после неизбежного стресса приводит к подавлению секреции кортикостерона через 6 часов ($p < 0.022, p = 0.039, p < 0.006$, 2wayANOVA, рис 16)

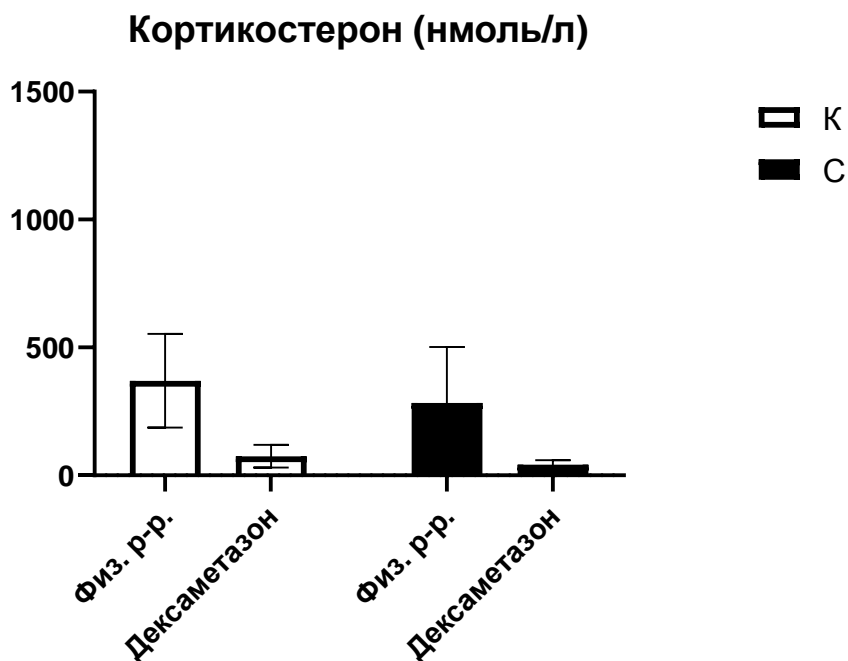


Рис. 16. Базальный уровень кортикостерона и уровень кортикостерона после введения дексаметазона на 28-е сутки после неизбежного стресса. Показан базальный уровень кортикостерона и уровень кортикостерона через шесть часов после введения дексаметазона у крыс контрольной группы (К, n=6) и группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, n=6).

На основе полученных данных можно заключить, что механизмы обратной регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы на 27-е сутки после неизбежного стресса функционируют адекватно.

Отсроченное влияние неизбежного стресса на скорость набора веса, потребление сахарозы и уровень глюкозы в крови.

Не обнаружено снижения скорости набора веса в течение 30 суток после неизбежного стресса ($p = 0.559$, t-тест, рис. 17).

Также не обнаружено изменений в среднем потреблении глюкозы у крыс на 11 – 23 сутки после неизбежного стресса по сравнению с контролем ($p = 0.748$, t-тест, рис. 18).

Измерение уровня глюкозы в хвостовой крови у крыс после голодания в течение 12 часов выполнялось на 27-е сутки после неизбежного стресса.

Статистически достоверных отличий по отношению к контролю обнаружено не было ($p=0.974$, t-тест).

Уровень кортикостерона подвержен значительным колебаниям в течение суток. Нормальный уровень глюкозы свидетельствует об отсутствии повышенного уровня кортикостерона в течение суток у животных после неизбежного стресса. Нормальная скорость набора веса и потребление сахарозы также свидетельствуют об отсутствии отсроченного влияния неизбежного стресса на системный метаболизм.

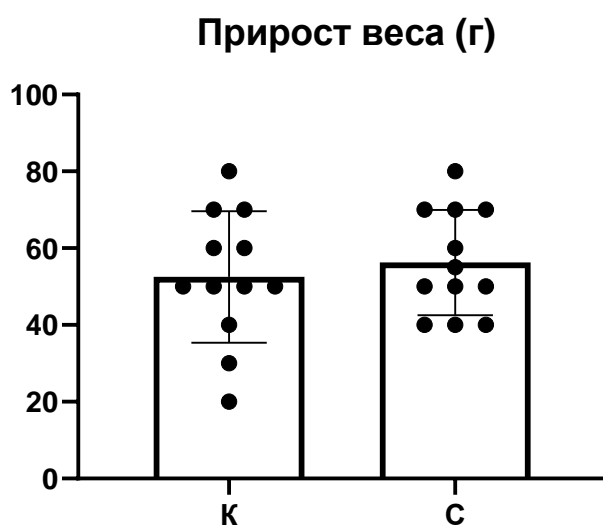


Рис 17. Прирост веса. Показан прирост веса за 30 суток наблюдения у крыс контрольной группы (К, $n=12$) и группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, $n=12$)



Рис 18. Результаты теста потребления сахарозы. Показано среднее потребление сахарозы за 12 дней крысами контрольной группы (К, $n=12$) и группы крыс, которая подверглась неизбежному стрессу (С, $n=12$).

Влияние неизбежного стресса на синаптическую плотность и количество нейронов в гиппокампе.

На 31-е сутки после неизбежного стресса не обнаружено снижения синаптической плотности и количества нейронов в CA1 ($p= 0.7$, Mann-Whitneyтест), CA3 ($p= 0.857$, Mann-Whitneyтест), CA4 ($p= 0.7$, Mann-Whitneyтест) областях гиппокампа и зубчатой извилине ($p>0.999$, Mann-Whitneyтест)рис. 19.

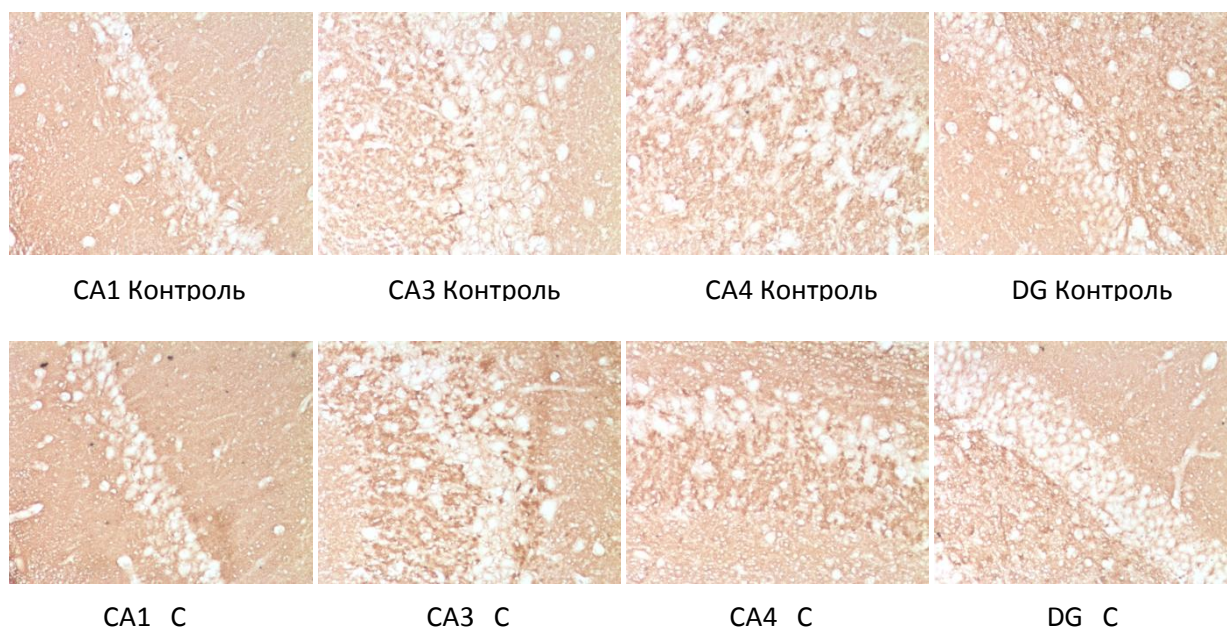


Рис. 19. Микрофотографии (x20) срезов CA1, CA3, CA4 зон гиппокампа и зубчатой извилины (DG). Показаны срезы контрольных животных и животных на 31 сутки после неизбежного стресса (С). Срезы окрашены антителами к синаптическому белку синаптофизину.

На основе совокупности представленных данных можно заключить что неизбежный стресс в нашей моделине вызывает стойких функциональных, гормональных и морфологических изменений.

Заключение

В проведённом исследовании продемонстрирован эффект галоперидола, направленный на снижение выраженности стрессорной реакции организма в ответ на неизбежный стресс. Данный эффект, по видимому, реализуется путём подавления реакции бегства на фоне ингибирования дофаминовых рецепторов головного мозга.

Реакция бегства в условиях неизбежного стресса, по всей видимости, является дезадаптивной по своему характеру. В течение трёх сеансов

неизбегаемого стресса, в процессе адаптации к такому виду стрессорного воздействия, животные вырабатывают поведение, характеризующееся подавлением реакции бегства. Об успешной адаптации к действию неизбегаемого стресса свидетельствует отсутствие функциональных, метаболических и морфологических нарушений в отсроченный период после неизбегаемого стресса.

Пациенты, находящиеся в жизнеугрожающем состоянии, фактически подвергаются воздействию интенсивного неизбегаемого стресса. Стрессорный компонент, наряду с общей тяжестью состояния, способствует развитию приступов психомоторного возбуждения, которые эффективно купируются введением галоперидола. В проведенном исследовании получены новые данные, позволяющие обосновать широко распространённое применение галоперидола для купирования вышеописанного клинического состояния.

Выводы

1. Блокада дофаминовых рецепторов головного мозга во время неизбегаемого стресса приводит к нормализации уровня кортикостерона на 2-е сутки после стрессорного воздействия крыс.
2. Неизбегаемый стресс приводит к подавлению реакции бегства что, по-видимому, не является показателем дезадаптивного состояния для данного вида стрессорного воздействия
3. Неизбегаемый стресс в используемой нами модели не сопровождается развитием стойких функциональных, метаболических и морфологических нарушений.

Апробация работы

Результаты данного исследования были представлены на Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (8-10 декабря 2021 года, Санкт-Петербург).

Список публикаций по теме научно-квалификационной работы

1. Ступин К. Н., Зенько М. Ю., Рыбникова Е. А. Сравнительный анализ патобиохимических нарушений при депрессии и посттравматическом стрессовом расстройстве //Биохимия. – 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 885-893.
2. Ступин К.Н.Сравнительный анализ патофизиологических изменений при тревожно-депрессивных расстройствах//Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «ИНТЕГРАТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ» 8-10 декабря 2021 года, Санкт-Петербург, с.130.

Список литературы

1. Douma E. H., de Kloet E. R. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2020. – Т. 108. – С. 48-77.
2. Miller, E.K. (2000). The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 59–65.
3. Gregoriou, G.G., Rossi, A.F., Ungerleider, L.G., and Desimone, R. (2014). Lesions of prefrontal cortex reduce attentional modulation of neuronal responses and synchrony in V4. *Nat. Neurosci.* 17, 1003–1011.
4. Rossi, A.F., Bichot, N.P., Desimone, R., and Ungerleider, L.G. (2007). Top down attentional deficits in macaques with lesions of lateral prefrontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 11306–11314.
5. Wilkinson, L.S., Dias, R., Thomas, K.L., Augood, S.J., Everitt, B.J., Robbins, T.W., and Roberts, A.C. (1997). Contrasting effects of excitotoxic lesions of the prefrontal cortex on the behavioural response to D-amphetamine and presynaptic and postsynaptic measures of striatal dopamine function in monkeys. *Neuroscience* 80, 717–730.
6. Abercrombie, E.D., Keefe, K.A., DiFrischia, D.S., and Zigmond, M.J. (1989). Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J. Neurochem.* 52, 1655–1658.
7. Bassareo, V., De Luca, M.A., and Di Chiara, G. (2002). Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 4709–4719.
8. Decot, H.K., Namboodiri, V.M.K., Gao, W., McHenry, J.A., Jennings, J.H.,

- Lee, S.-H., Katak, P.A., Jill Kao, Y.-C., Das, M., Witten, I.B., et al. (2017). Coordination of Brain-Wide Activity Dynamics by Dopaminergic Neurons. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 615–627.
9. Hernandez, L., and Hoebel, B.G. (1990). Feeding can enhance dopamine turnover in the prefrontal cortex. *Brain Res. Bull.* 25, 975–979.
10. Bassareo, V., Tanda, G., Petromilli, P., Giua, C., and Chiara, G.D. (1996). Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 124, 293–299.
11. Ahn, S., and Phillips, A.G. (1999). Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, RC29.
12. Ellwood, I.T., Patel, T., Wadia, V., Lee, A.T., Liptak, A.T., Bender, K.J., and Sohal, V.S. (2017). Tonic or Phasic Stimulation of Dopaminergic Projections to Prefrontal Cortex Causes Mice to Maintain or Deviate from Previously Learned Behavioral Strategies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 8315–8329.
13. Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., and Malenka, R.C. (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 70, 855–862.
14. Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217.
15. Sato Y, Kumamoto Y . Psychological stress and sexual behavior in male rats. II. Effect of psychological stress on dopamine and its metabolites in the critical brain areas mediating sexual behavior *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1992; 83: 212–219.
16. Zebrowska-Lupina I, Stelmasiak M, Porowska A . Stress, induced depression of basal motility: effects of antidepressant drugs *Pol J Pharmacol Pharm* 1990; 42: 97–104.
17. Zebrowska-Lupina I, Ossowska G, Klenk-Majewska B . The influence of antidepressants on aggressive behavior in stressed rats: the role of dopamine *Pol J Pharmacol Pharm* 1992; 44: 325–335.
18. Anstrom KK, Miczek KA, Budygin EA (2009) Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. *Neuroscience* 161:3–12.
19. Anstrom KK, Woodward DJ (2005) Restraint increases dopaminergic burst firing in awake rats. *Neuropsychopharmacology* 30:1832–1840.

20. Miczek KA, Nikulina EM, Shimamoto A, Covington HE 3rd (2011) Escalated or suppressed cocaine reward, tegmental BDNF, and accumbal dopamine caused by episodic versus continuous social stress in rats. *J Neurosci* 31:9848–9857.
21. Mangiavacchi S, Masi F, Scheggi S, Leggio B, De Montis MG, Gambarana C (2001) Long-term behavioral and neurochemical effects of chronic stress exposure in rats. *J Neurochem* 79:1113–1121.
22. Watt M.J., Roberts C.L., Scholl J.L., Meyer D.L., Miiller L.C., Barr J.L., Novick A.M., Renner K.J., Forster G.L. (2014). Decreased prefrontal cortex dopamine activity following adolescent social defeat in male rats: role of dopamine D2 receptors. *Psychopharmacology*, 231(8), 1627-1636.
23. Boyson S. J., McGonigle P., Molinoff P. B. Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain // *Journal of Neuroscience*. – 1986. – T. 6. – №. 11. – C. 3177-3188.
24. Seligman, M. E., Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(2), 534–541. doi:10.1037/h0076430.
25. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // *Journal of Comparative Psychology*. – 1936. – T. 22. – №. 3. – C. 345.
26. Pellow S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // *Journal of neuroscience methods*. – 1985. – T. 14. – №. 3. – C. 149-167.
27. Christianson J. P. et al. The role of prior stressor controllability and the dorsal raphe nucleus in sucrose preference and social exploration // *Behavioural brain research*. – 2008. – T. 193. – №. 1. – C. 87-93.
28. Zhukov D. A. The dexamethasone suppression test in genetically different rats exposed to inescapable and escapable electric shocks // *Psychoneuroendocrinology*. – 1993. – T. 18. – №. 7. – C. 467-474.