

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ГРЕЛИНА В МЕХАНИЗМАХ
ИГРОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ПСИХОГЕННЫХ СТРЕССОРОВ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. А. А. Лебедев^{1, *}, С. С. Пюрвеев^{1, 2}, Э. А. Сексте¹, Б. А. Рейхардт¹,
Е. Р. Бычков¹, П. Д. Шабанов¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Исследовали роль грелина в проявлении элементов игровой зависимости у крыс, подверженных ранним психогенным стрессам. Выращивание в условиях социальной изоляции или материнская депривация в раннем онтогенезе вызывали повышение риска в поведении и импульсивности в тесте Iowa Gambling Task: животные стремились получить более значимое пищевое подкрепление, но с низкой вероятностью его достижения. Материнская депривация или выращивание в социальной изоляции вызывали повышение уровня мРНК рецептора грелина соответственно в миндалине и гипоталамусе. Уровень экспрессии исследуемого гена в префронтальной коре не изменялся. Сделан вывод, что ранние психогенные стрессы вызывают дисбаланс системы регуляции грелина, что проявляется повышением уровня мРНК рецептора грелина в структурах головного мозга, а также элементами игровой зависимости у крыс. Представлена схема действия хронического стресса в онтогенезе на гипоталамическую систему грелина в головном мозге и на экстрагипоталамический уровень его регуляции.

Ключевые слова: игровая зависимость, материнская депривация, выращивание в изоляции, грелин, мРНК рецептора грелина

DOI: 10.31857/S086981392308006X, EDN: FCMBCJ

ВВЕДЕНИЕ

Средовые воздействия в раннем онтогенезе оказывают существенное влияние на функции у половозрелых особей [1]. Ранние психогенные стрессы влияют на процессы роста, обмена веществ, воспалительные реакции, действуют на пролиферацию, дифференцировку и миграцию нейронов [1] и приводят к посттравматическим стрессовым расстройствам (ПТСР) [2, 3]. Отлучение от матери (maternal separation, MS) и выращивание в изоляции (isolation rearing, IS) вызывают отдаленные расстройства поведения, мотиваций [4], появление депрессий, повышение тревожности и злоупотребления психоактивными средствами [5]. MS вызывает у животных стойкие изменения эмоциональных реакций и формирования зависимости от аддитивных средств [6, 7]. MS включает ежедневное отделение (от 15 мин до 6 ч) пометов от самок в течение первых двух недель жизни. При IS производят отделение от самок после молочного вскармливания и содержание в одиночных клетках до

полового созревания. IS вызывает глубокие нейрохимические и поведенческие изменения у потомства, которые обнаруживаются во взрослом возрасте [8].

Грелин был впервые найден в конце двадцатого века. Он состоит из 28 аминокислот, образуется в слизистой оболочке желудка и гипоталамусе [9]. Существует 3 изоформы грелина из одного предшественника (ацилированный грелин, неацилированный грелин и обестатин) и две молекулярные формы грелинового рецептора GHSR1a и GHSR1b. Биологической активностью обладает только рецептор GHSR1a [10]. Грелиновые рецепторы находятся в желудке, надпочечниках, сердечной мышце, щитовидной железе, и головном мозге: в гипоталамусе, гипофизе, гиппокампе, миндалине, в стволе и коре мозга [11]. Грелин участвует в регуляции пищевого поведения [12], зависимости от психостимуляторов [13, 14] и алкоголя [14, 15], в реакциях на стрессорные воздействия [14, 16].

В настоящее время актуальным является исследование нехимических форм зависимостей, таких как игровая. В международных классификациях (ICD-11 и DSM-5) игровая зависимость определяется как самостоятельное заболевание и обладает основными свойствами, характерными для алкогольной или наркотической зависимости [17]. Для ее лечения не зарегистрировано еще ни одного лекарственного средства. При формировании игровой зависимости наблюдаются нарушения регуляции гормонов стресса, что связано с проявлениями повышенной импульсивности в поведении и высоким уровнем кортизола и адреналина [18]. В наших исследованиях показано, что антагонист грелиновых рецепторов [D-Lys3]-GHRP-6 снижает проявления импульсивности в поведении (поведения риска) в модели игровой зависимости у крыс, влияя на обмен дофамина [19].

В настоящее время для анализа поведения, связанного с импульсивностью и риском, в опытах на животных применяется метод Iowa Gambling Task. Он базируется на выборе величины подкрепления для увеличения значимости подкрепления. В наших исследованиях был использован вариант Iowa Gambling Task на лабораторных крысах в трехрукавном лабиринте [17, 20]. Показано, что активация и блокада рецепторов грелина вызывает изменение импульсивности и риска в Iowa Gambling Task и влияет на содержание эндогенного дезацил-грелина в лимбических структурах головного мозга у крыс [21]. В отличие от ряда аналогичных моделей, в нашем варианте не применялось наказание, исключительно только пищевое подкрепление. Отрицательным подкреплением служило отсутствие какого-либо подкрепления. Наша модель соответствует в большей степени не гемблингу (азартные игры с проигрышами), а скорее геймингу (компьютерные игры), что является перспективным для исследования и практического применения.

Целью исследования было изучение импульсивности в поведении и экспрессии гена *Ghsr* в гипоталамусе, миндалине, префронтальной коре (pFC) у крыс, подверженных ранним стрессам MS или IS.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 72 крысах линии Вистар массой 250–300 г (62 самцах и 10 самках). Животные были выращены в питомнике “Рапполово” (Тосненский район Ленинградской области). В виварии ФБГНУ “Институт экспериментальной медицины” животных содержали в стандартных клетках (40 × 50 × 20 см) при свободном доступе к воде и гранулированному корму. Использовали инвертированный свет с 8:00 до 20:00 и при температуре 22 ± 2°C.

Подопытные животные после поступления из питомника проходили 2-недельный период карантина в виварии ФБГНУ “Институт экспериментальной медицины”. Самок крыс линии Вистар содержали в пластиковых клетках (40 × 50 × 20 см) по 5 особей с доступом к воде и пище *ad libitum*. В каждую клетку подсаживали по

одному самцу к пяти самкам, на следующий день у самок производили забор вагинальных мазков и исследовали их методом световой микроскопии. Если у самок в мазках обнаруживали сперматозоиды в стадию проэструса, то этот день считали началом беременности. После наступления беременности животных помещали в индивидуальную клетку. Беременность протекала 20 ± 2 дня. Для стрессирования потомства применяли методы MS или IS.

Модель отлучения от матери. Крысят со 2-го по 12-й день постнатального периода помещали в индивидуальные пластиковые стаканчики на 180 мин в течение 10 последовательных дней. Зрительный контакт с матерью был исключен. После MS и молочного вскармливания 20 крысят выращивали в стандартных клетках по 5 особей в каждой. В опыте использовали 20 самцов в возрасте 90–100 дней и массой 200–250 г [22].

Модель социальной изоляции. На 21-й день после рождения (сразу после молочного вскармливания) самцов рассаживали в индивидуальные клетки. В возрасте 90–100 дней животных использовали для изучения поведения. После каждого эксперимента животных возвращали в свои жилые клетки.

Вариант Iowa Gambling Task тест “вероятности и величины подкрепления”. Установка для подачи пищевого подкрепления включала стартовую площадку ($33 \times 50 \times 35$ см) и 3 рукава (50 × 15 × 35 см) (рис. 1). В конце каждого из рукавов находилась кормушка с автоматическим управлением. Пищевое подкрепление подавалось при достижении кормушки в каждом рукаве 3-рукавного лабиринта. Когда животное выходило из рукава на стартовую площадку, происходила подача следующего подкрепления. Обучение производили каждый день. Тестировали побежки к кормушке и возвращение в стартовую камеру в течение 10 мин и не подавали каких-либо дополнительных сигналов. Животных кормили ежедневно, ограничивая время питания 4 ч, при этом осуществлялся свободный доступ к воде [17]. Пищевую депривацию выдерживали перед каждым опытом в течение 20 ч. Животных обучали в 3-рукавном лабиринте в течение 21 дня. В качестве подкрепления служило семя подсолнуха. В первые дни эксперимента применяли тренировочный режим пищевого подкрепления. При каждом выборе рукава одно животное получало одно семя. При каждом выборе рукава 2 подавали два семени, и при каждом выборе рукава 3 осуществляли подачу трех семян. Тренировочный режим подачи пищевого подкрепления длился 5 дней. В течение последующих двух дней эксперименты не осуществляли [18]. На 8-й день обучения изменяли режим пищевого подкрепления. В рукаве 1 подавали два семени (режим подкрепления FR1-2). При этом каждое достижение кормушки подкреплялось пищей. В рукаве 2 подавали три семени в режиме FR2-3 и подкрепляли каждую вторую побежку к кормушке, в рукаве 3 подавали 4 семени в режиме FR3-4 (т.е. только каждая 3-я побежка к кормушке подкреплялась пищей). Таким образом, без вознаграждения оставались 1/2 заходов во 2-й рукав и 2/3 заходов в 3-й рукав лабиринта. В этом режиме крыс обучали 2 нед. Крыс, не совершавших заходы в рукава лабиринта, из эксперимента изымали (не более 15%) [18].

Метод ПЦР. После тестирования в лабиринте животных умерщвляли путем декапитации, извлекали на холоде структуры мозга (гипоталамус, миндалина, префронтальная кора), немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения ПЦР-анализа. Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием реагента TRIzol (Ambion, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 20 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, Promega, США) [20]. ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей от 1 до 2 мкг кДНК (Синтол, Россия), смесь специфических прямых и

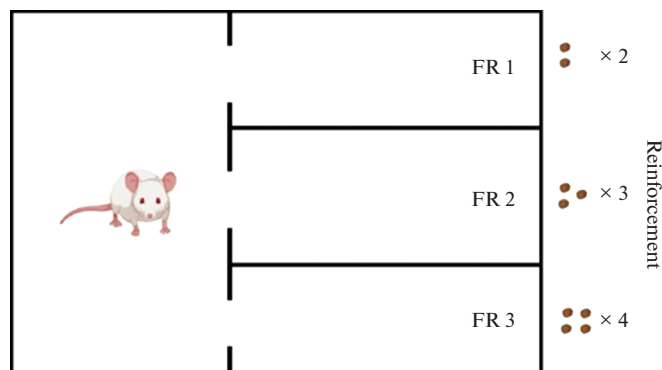


Рис. 1. Схема установки для определения вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте.

обратных праймеров, подобранных и синтезированных в компании “Beagle” (Россия) (табл. 1) [20]. Перед проведением экспериментов все праймеры прошли проверку на эффективность с пробами положительного контроля. Во всех постановках Real-Time PCR использовались отрицательные и положительные контроли, в конце реакции анализировали местоположение пиков кривых плавления для каждого комплекта праймеров. Полученные данные нормированы к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитаны в относительных единицах по отношению к уровню мРНК рецептора грелина в контрольной группе для каждой структуры мозга отдельно методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [20]. Ген домашнего хозяйства *Gapdh* был выбран, исходя из того, что ранее проведенные исследования свидетельствуют о незначительном изменении экспрессии данного гена при различных экспериментальных условиях [23].

Статистические методы анализа. Статистический анализ проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова. В тесте вероятности и величины подкрепления при сравнении числа посещений рукавов трехрукавного лабиринта использовали *t*-критерий Стьюдента. Для анализа мофологических и ПЦР данных применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. При парном сравнении групповых средних в *post-hoc* анализе использовали критерий Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде средних значений и стандартной ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали влияние стресса MS в раннем онтогенезе на импульсивный компонент игровой зависимости. В тесте величины и вероятности подкрепления (вари-

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Gapdh</i> NM_017008.4	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'
<i>Ghsr</i> NM_032075.3	5'-CCTGGTGTCTTTGTCCTCTTCTAC-3'	5'-GTTCTGCCTCCTCCCAAGTCCC-3'

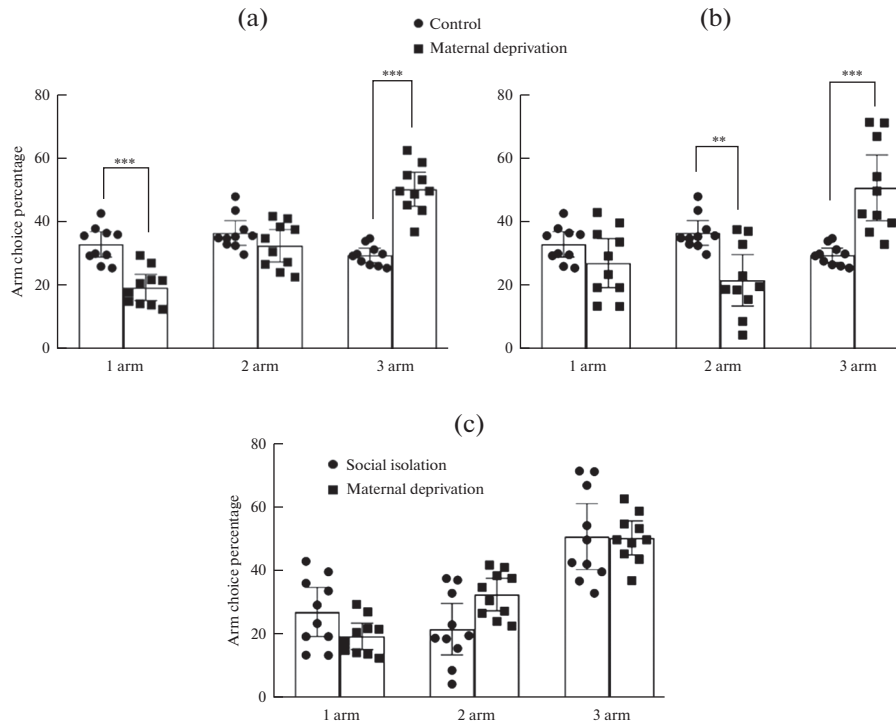


Рис. 2. Влияние различных видов стрессорного воздействия на импульсивный компонент игровой зависимости. (а) – влияние стресса материнской депривации в раннем онтогенезе на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. (б) – влияние стресса социальной изоляции после периода молочного вскармливания на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. (с) – влияние стресса социальной изоляции после периода молочного вскармливания в онтогенезе и стресса материнской депривации в раннем онтогенезе на поведение крыс в ситуации выбора вероятности и силы пищевого подкрепления в трехрукавном лабиринте. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, *** – $p < 0.0001$ относительно контрольной группы животных.

анте IOWA теста) определяли количество побегов в каждый рукав трехрукавного лабиринта. Были изучены 2 группы животных: интактные крысы (контроль) и крысы MS (экспериментальная группа). В группе MS (со 2-х по 12-е сут) в 1.5 раза увеличивалось число заходов в 3-й рукав ($t(18) = 8.098, p < 0.0001$), что свидетельствует о выборе большей величины подкрепления при его низкой вероятности. Число заходов в 1-й рукав (вознаграждение с высокой вероятностью (100%), но с наименьшим пищевым подкреплением) при этом снижалось ($t(18) = 5.316, p < 0.0001$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2а).

Исследовали влияние стресса IS после периода молочного вскармливания на импульсивный компонент игровой зависимости. В тесте величины и вероятности подкрепления (варианте IOWA теста) определяли количество побегов в каждый рукав лабиринта. Были изучены две группы животных: интактные крысы (контроль) и крысы IS (экспериментальная группа).

В группе IS увеличивалось число заходов в 3-й рукав лабиринта ($t(18) = 4.525, p = 0.0003$), что свидетельствует о выборе большей величины подкрепления при его низкой вероятности. Число заходов во 2-й рукав (вознаграждение с более высокой

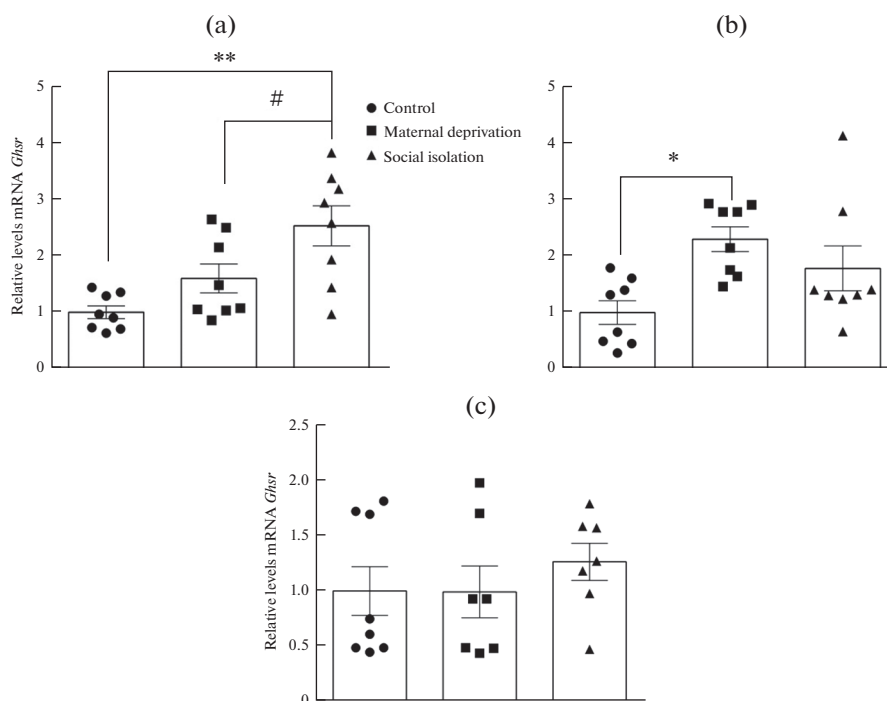


Рис. 3. Уровень мРНК рецептора грелина в гипоталамусе (а), миндалине (b), префронтальной коре (с) головного мозга крыс при различных видах стрессорного воздействия. * – $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # – $p < 0.05$ по отношению к группе материнской депривации. Данные нормированы к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и рассчитаны в относительных единицах по сравнению с контрольной группой методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

вероятностью (50%), но с меньшим пищевым подкреплением) при этом снижалось ($t(18) = 3.764$, $p = 0.0014$) по отношению к контрольной группы крыс (рис. 2b).

Проводили сравнительный анализ влияния стресса MS в раннем онтогенезе и IS после периода молочного вскармливания в онтогенезе на импульсивный компонент игровой зависимости. Исследованы две экспериментальные группы: крысы, выращенные в социальной изоляции, и крысы с отлучением от матери. В группе животных, выращенных в социальной депривации, число заходов в рукава лабиринта достоверно не отличалось от показателей, которые были зарегистрированы в группе крыс с материнской депривацией (рис. 2с).

Сравнительный анализ уровня мРНК рецептора грелина в структурах головного мозга у животных, подверженных стрессу материнской депривации и животных, выращенных в условиях социальной изоляции. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил влияние вида стрессорного воздействия на уровень мРНК рецептора грелина в гипоталамусе и миндалине у экспериментальных животных [$F(2,21) = 8.779$, $p = 0.0017$ и 5.165 , $p = 0.0150$ соответственно]. По данным post hoc анализа у крыс, выращенных в социальной изоляции, наблюдалось повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе по сравнению с животными контрольной группы и после материнской депривации ($p < 0.05$) (рис. 3а). Напротив, в миндалине увеличивался уровень мРНК рецептора грелина у крыс MS группы по сравнению с контролем ($p < 0.05$), при этом достоверных различий между животными IS группы

и контрольной группы не наблюдалось (рис. 3b). Достоверных изменений в уровне мРНК грелинового рецептора в рFC у крыс с MS и IS по сравнению с живыми контрольной группы не отмечалось (рис. 3c).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращивание в условиях социальной изоляции вызывали стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости [20]. В группе крыс с материнской депривацией число заходов в 3-й рукав лабиринта увеличивалось в 1.5 раза, что свидетельствует о предпочтении выбора более высокой величины подкрепления при низкой вероятности получения вознаграждения. Число заходов в 1-й рукав (вознаграждение с высокой вероятностью (100%), но с наименьшим пищевым подкреплением) при этом снижалось. В группе крыс с социальной изоляцией также увеличивалось число заходов в 3-й рукав лабиринта. Число заходов во 2-й рукав (вознаграждение с более высокой вероятностью (50%), но с меньшим пищевым подкреплением) при этом уменьшалось. При этом число заходов в рукава лабиринта достоверно не отличалось от показателей в группе крыс с материнской депривацией. Полученные данные во многом согласуются с данными литературы. Разлучение с матерью в раннем онтогенезе вызывает стойкие изменения эмоциональных реакций, направленных на формирование зависимости от аддиктивных средств [6, 7]. Разлучение с матерью или выращивание в изоляции вызывают отдаленные расстройства поведения [4]. При этом наблюдаются повышение уровня тревожности, депрессий и злоупотребления психоактивными средствами [5]. Ранее в наших исследованиях было показано повышение импульсивного компонента игровой зависимости у крыс, выращенных в изоляции, по числу закапываний шариков в marble тесте [17]. Исследований игровой зависимости у животных после отлучения от матери в доступной литературе нами обнаружено не было, хотя у человека повышение ее проявлений является хорошо установленным фактом [24].

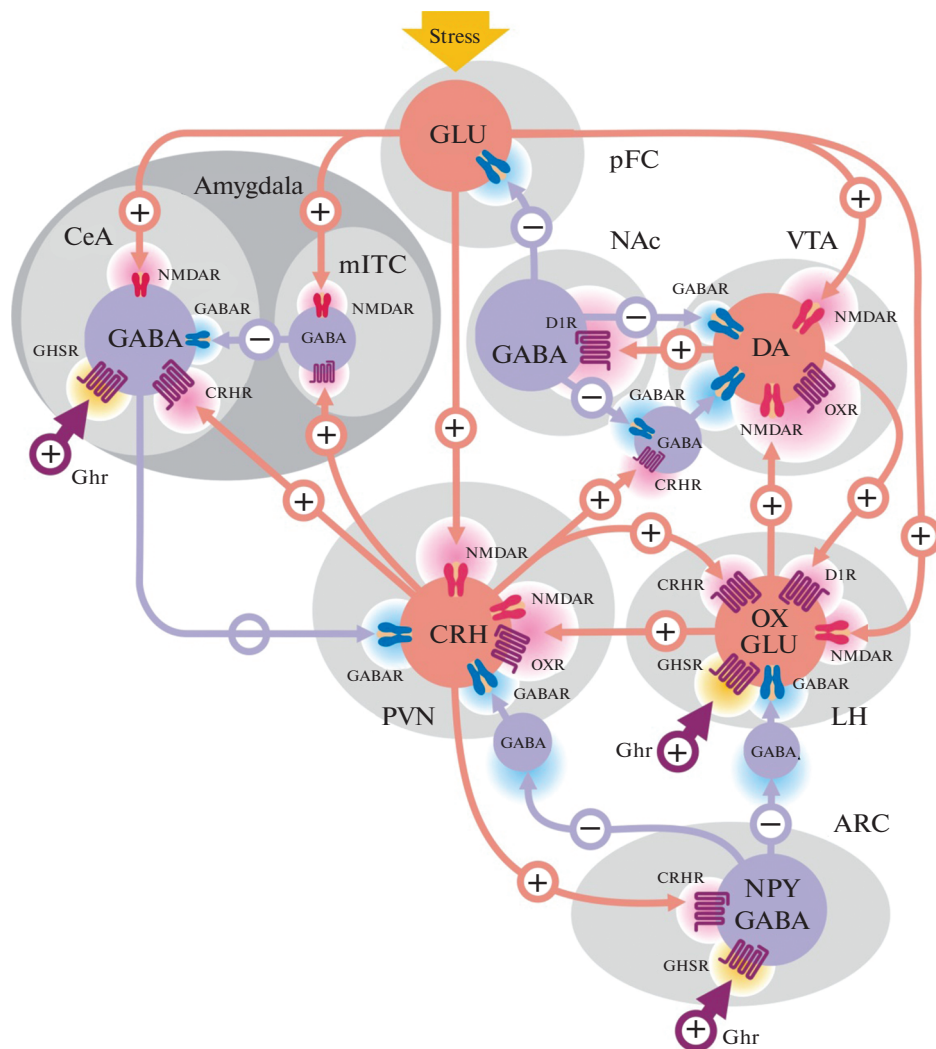
В настоящем исследовании изучали роль рецептора грелина в механизмах уязвимости к поведению риска [18] и импульсивности в поведении [25] на модели игровой зависимости у животных с различным индивидуальным опытом [17]. Хронический стресс отнятия от матери вызывал повышение уровня мРНК рецептора грелина в миндале по отношению к контрольной группе крыс. Хронический стресс выращивания в условиях социальной изоляции вызывал повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе по отношению к контрольной группе крыс. Таким образом, отнятие от матери в раннем онтогенезе влияет преимущественно на экстрагипоталамический уровень регуляции грелина в головном мозге, в то время как выращивание в условиях социальной изоляции в большей степени связано с влиянием на гипоталамическую систему его регуляции. Показано, что наиболее высокий уровень мРНК рецептора грелина наблюдаются в гипоталамусе и гипофизе, а низкий – в гиппокампе, миндале и в ядрах ствола мозга [26]. Грелин действует в первую очередь в гипоталамусе и стимулирует поведение приема пищи, направленное на регуляцию энергетического баланса [9]. Ранее в наших исследованиях показаны активация пищевого поведения и увеличение массы тела у крыс, выращенных в изоляции [27, 51]. Значение передачи сигналов грелина в областях мозга за пределами гипоталамуса заключается в его действии на обучение и память, вознаграждение и мотивацию, тревогу и депрессию [28]. Сравнительный анализ, проведенный в рамках работы, подтвердил преимущественное действие стресса отнятия от матери в раннем онтогенезе на экстрагипоталамический уровень

регуляции грелиновой системы мозга. Наблюдалось повышение уровня мРНК рецептора грелина в гипоталамусе у крыс, подверженных стрессу социальной изоляции, по сравнению с показателями у животных после стресса материнской депривации. В миндалине и префронтальной коре различий в уровнях мРНК рецептора грелина у крыс, выращенных в социальной депривации по сравнению с группой крыс, подверженных стрессу материнской депривации, отмечено не было.

В наших более ранних исследованиях показано, что после введения [D-Lys3] – GHRP-6 наблюдалось стремление получить подкрепление с высокой вероятностью (100%) в трехрукавном лабиринте, но наименьшей величиной вознаграждения, т.е. снизить риск получения пищевого подкрепления до минимума. Это было связано с повышением обмена дофамина в гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме [18]. При введении грелина отмечено увеличение соотношения побегов в сторону третьего рукава лабиринта с меньшей вероятностью, но высокой величиной подкрепления [21]. В исследованиях других авторов показано, что уровень грелина в сыворотке крови у пациентов с алкогольной зависимостью значительно повышен, а введение ацетил-грелина, лиганда грелинового рецептора [29], увеличивает тягу к алкоголю [30]. Хронические стрессы вызывают повышение содержания ацетил-грелина, которое сохраняется после прекращения воздействия стрессора [31, 32].

Возможными мишенями действия грелина в ответ на хронический стресс, по-видимому, являются нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN) [32], в которых отмечается высокая концентрация кортиколиберина (corticotropin-releasing hormone, CRH) [33]. Рецепторы грелина были найдены в паравентрикулярном ядре. Введение грелина повышало концентрацию c-fos-протеина в CRH-содержащих нейронах паравентрикулярного ядра и вызывало активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) [34]. Мишенью действия грелина при стрессе, по-видимому, также служит система расширенной миндалины, которая включает в себя центральное ядро миндалины (CeA), ядро ложа конечной полоски (BNST), безымянную субстанцию и прилежащее ядро (NAc) и является экстрагипоталамической системой CRH [35]. Структуры расширенной миндалины получают входы от дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (VTA) и составляют основную функциональную систему для реализации эмоционально-мотивационных эффектов различных наркотиков [36]. Блокада CRH нейромедиаторной передачи в CeA, BNST и NAc устраняет или значительно снижает активирующие эффекты аддиктивных средств [35]. Структуры расширенной миндалины, по-видимому, важны для реализации механизмов подкрепления [37]. Показано, что CeA и BNST оказывают регулирующее влияние на гипоталамус [38]. Психогенный стресс вызывает активацию путей в CeA, BNST, NAc, рFC и затем в CRH-нейронах PVN [39]. Введение грелина вызывает спайковую активность в CRH-содержащих нейронах, увеличивает уровень мРНК CRH в PVN и уровень кортикостерона в сыворотке крови у грызунов. Грелин может действовать на CRH-содержащие нейроны и через другие нейробиохимические системы: орексина, нейропептида Y (NPY), моноаминергические нейроны, обладающие рецепторами грелина [40, 41].

Для описания влияния раннего опыта на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы традиционно применяется метод отлучения от матери [42]. Периодическое разлучение с матерью является мощным социальным хроническим стрессором, который может активировать реакцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у крысят во время периода гипореактивности в течение первых двух недель после рождения [43]. Разлучение с матерью может изменить нейроэндокринные и нейромедиаторные ответные реакции на стрессоры и при повторном воздействии привести к долгосрочному повышению реактивности оси гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, тревоге,



депрессии и злоупотреблению наркотиками во взрослом возрасте [44]. Показано, что содержание грелина в крови повышается при стрессе разлучения с матерью [45, 46]. Метод выращивания в изоляции после периода молочного вскармливания также традиционно используется для изучения влияния раннего опыта и фактора стресса социальной депривации на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [44]. Установлено, что у крыс, выращенных в условиях социальной депривации, повышается уровень тревожности, депрессивности и реактивности в ответ на подкрепляющие агенты среды, наблюдается гиперактивность и уязвимость к аддиктивному поведению [47]. Преобладание типичных паттернов поведения при социальной изоляции позволило нам специально выделить “синдром социальной изоляции” [47]. Результаты биохимических и молекулярных исследований подтвердили взаимосвязь нарушений поведения, вызванных социальной изоляцией, и изменением функционирования ряда нейрохимических систем мозга [48]. В настоящей работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращи-

Рис. 4. Участие грелина в активации CRH-нейронов гипоталамуса и CeA при хроническом психогенном стрессе в раннем онтогенезе. Приведена схема Рейхардта и Шабанова [49] в модификации. Грелин активирует NPY-нейроны ARC ядра, которые снижают тоническую активность гипотетических GABA-интернейронов, тормозящих активность CRH-нейронов PVN. Одновременно NPY-нейроны блокируют тоническое ингибирование OX-нейронов MCH/GABA-нейронами LH и GABA-интернейронами, находящимися за пределами LH. Активацию OX-нейронов LH осуществляют: (а) грелин посредством GHSR рецептора, (б) Glu-сигналы из рFC при вовлечении коры мозга в стресс-ответ, (в) через положительную обратную связь из VTA через D1R рецепторы. CRH-нейроны PVN модулируют GABA систему расширенной CeA. Активированные OX-нейроны стимулируют CRH-нейроны посредством секреции возбуждающих медиаторов OX/Glu в PVN. Кроме того, CRH-нейроны PVN и нейроны CeA получают Glu-сигнал при возбуждении рFC. В свою очередь, CRH-нейроны PVN посылают положительную обратную связь в отношении NPY-нейронов ARC и OX-нейронов LH. Кроме того, CRH-нейроны PVN могут модулировать GABA/Glu входы в DA-нейроны непосредственно или путем стимуляции нейронов LH, наряду с OX продуцирующих Glu. В конечном итоге, возбуждение CRH-нейронов PVN приводит к активации HPA-оси и повышению уровня кортикостерона, который оказывает мощное воздействие на структуры мозга. CRH – кортикотропин рилизинг гормон, CRHR – рецептор CRH, ARC – аркуатное ядро, PVN – паравентрикулярное ядро, LH – латеральный гипоталамус, VTA – вентральная область покрышки, CeA – центральное ядро миндалины; NAc – прилежащее ядро, рFC – префронтальная кора, NPY – нейропептид Y, Glu – глутамат, NMDAR – рецептор Glu, селективно связывающий N-метил-D-аспарат, GABA – гамма-аминомасляная кислота, GABAR – GABA-A рецептор GABA, OX – орексин, OXR – рецептор OX, DA – дофамин, D1R – возбуждающий рецептор DA первого типа, Ghg – грелин, GHSR – рецептор грелина, mITC – интернейроны миндалины.

вание в условиях социальной изоляции вызывали стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости [20].

На основании анализа литературных и собственных данных мы приводим гипотетическую схему участия грелина в активации CRH-нейронов гипоталамуса и CeA при хроническом психогенном стрессе в раннем онтогенезе (рис. 4).

Таким образом, в работе показано, что хронические стрессы отнятия от матери в раннем онтогенезе или выращивание в условиях социальной изоляции вызывают стратегию поведения животных, направленную на получение более значимого пищевого подкрепления, но с низкой вероятностью его достижения, что связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости. Отнятие от матери или выращивание в условиях социальной изоляции вызывали повышение уровня мРНК рецептора грелина соответственно в миндалине и гипоталамусе по сравнению с контрольной группой животных. Таким образом, в то время как выращивание в условиях социальной изоляции в большей степени связано с влиянием на гипоталамическую систему грелина в головном мозге, отнятие от матери в раннем онтогенезе влияет преимущественно на экстрагипоталамический уровень его регуляции. Можно заключить, что увеличение уровня мРНК рецептора грелина в головном мозге связано с повышением импульсивного компонента игровой зависимости у крыс, подверженных психотравмирующему воздействию в раннем онтогенезе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проведены в соответствии с этическими принципами, обозначенными в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г., и одобрены комиссией по биоэтике ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022–2025 гг.). “Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддитивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС”, шифр FGWG-2022-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л. – идея работы, планирование эксперимента, обсуждение, написание и редактирование статьи. С.С.П. – сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание и редактирование статьи. Э.А.С. – сбор данных в эксперименте, обработка данных, проведение ПЦР анализа. Б.А.Р. – создание схемы действия стресса, обсуждение полученных данных. Е.Р.Б. – статистическая обработка данных, написание и редактирование статьи. П.Д.Ш. – общее руководство, обсуждение, написание и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fenoglio KA, Brunson KL, Baram TZ* (2006) Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol* 27(2): 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>
2. *Catani C, Jacob N, Schauer E, Kohila M, Neuner F* (2008) Family violence, war, and natural disasters: a study of the effect of extreme stress on children’s mental health in Sri Lanka. *BMC Psychiatry* 8(33). <https://doi.org/10.1186/1471-244X-8-33>
3. *Lang AJ, Aarons GA, Gearity J, Laffaye C, Satz L, Dresselhaus TR, Stein MB* (2008) Direct and indirect links between childhood maltreatment, posttraumatic stress disorder, and women’s health. *Behav Med* 33(4): 125–135. <https://doi.org/10.3200/BMED.33.4.125-136>
4. *Tata D* (2012) Maternal separation as a model of early stress: Effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hellenic J Psychol* 9: 84–101.
5. *Naqavi MR, Mohammadi M, Salari V, Nakhaee N* (2011) The relationship between childhood maltreatment and opiate dependency in adolescence and middle age. *Addict Health* 3(3–4): 92–98.
6. *Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W* (2013) Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. *Gen Comp Endocrinol* 181: 306–309.
7. *Moffett MC, Vicentic A, Kozel M, Plotsky P, Francis DD, Kuhar MJ* (2007) Maternal separation alters drug intake patterns in adulthood in rats. *Biochem Pharmacol* 73(3): 321–330.
8. *Krupina NA, ShISenova SD, Khlebnikova NN* (2020) Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex. *Brain Sci* 10(11): 1–29.
9. *Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
10. *Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A* (2009) Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 61(4): 430–481. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001958>
11. *Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Faireclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M* (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metabol* 87(6): 2988. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8739>
12. *Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM* (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatr* 67(9): 880–886. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.030>
13. *Carroll ME, France CP, Meisch RA* (1979) Food deprivation increases oral and intravenous drug intake in rats. *Science (New York)* 205(4403): 319–321. <https://doi.org/10.1126/science.36665>

14. Kharbanda KK, Farokhnia M, Deschaine SL, Bhargava R, Rodriguez-Flores M, Casey CA, Goldstone AP, Jerlhag E, Leggio L, Rasineni K (2022) Role of the ghrelin system in alcohol use disorder and alcohol-associated liver disease: A narrative review. *Alcoholism, Clin and Exp Res* 46(12): 2149–2159. <https://doi.org/10.1111/acer.14967>
15. Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Engel JA (2011) Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addiction Biol* 16(1): 82–91. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00231.x>
16. Ducharme R, Anisman H, Abizaid A (2010) Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 32(4): 632–639. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07310>
17. Шабанов ПД, Якушина НД, Лебедев АА (2020) Фармакология пептидных механизмов игрового поведения у крыс. *Вопр наркол* 4(187): 24–44. [Shabanov PD, Yakushina ND, Lebedev AA (2020) Pharmacology of peptide mechanisms of gambling behavior in rats. *Vopr Narkol* 4(187): 24–44. (In Russ)].
18. Geisel O, Pannack P, Hellweg R, Wiedemann K, Muller CA (2015) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with pathological gambling and internet use disorder. *Psychiatry Res* 226: 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.11.078>
19. Lebedev AA, Karpova IV, Bychkov ER, Yakushina ND, Thyssen IY, Gramota KE, Efimov NS, Shabanov PD (2022) The ghrelin antagonist [D-LYS3]-GHRP-6 decreases signs of risk behavior in a model of gambling addiction in rats by altering dopamine and serotonin metabolism. *Neurosci Behav Physiol* 52(3): 415–421. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01255-x>
20. Сексте ЭА, Лебедев АА, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Шабанов ПД (2021) Повышение уровня мРНК рецептора орексина первого типа (OX1R) в структурах головного мозга у крыс, склонных к импульсивности в поведении. *Биомед химия* 67(5): 411–417. [Sekste EA, Lebedev AA, Bychkov ER, Airapetov MI, Gramota KE, Tissen IY, Shabanov PD (2021) Increase in the level of orexin receptor 1 (OX1R) mRNA in the brain structures of rats prone to impulsivity in behavior. *Biomed Chem* 67(5): 411–417. (In Russ)].
21. Лебедев АА, Хохлов ПП, Якушина НД, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Шабанов ПД (2019) Фармакологический и биохимический анализ участия пептидной системы грелина в поведенческих проявлениях игровой зависимости у крыс. *Экспер клин фармакол* 82(6): 16–20. [Lebedev AA, Khokhlov PP, Yakushina ND, Gramota KE, Tissen IY, Bychkov ER, Airapetov MI, Shabanov PD (2021) Pharmacological and biochemical analysis of participation of the ghrelin peptide system in behavioral manifestations of gambling in rats. *Eksper klin farmakol* 82(6): 16–20. (In Russ)].
22. Балакина МЕ, Десярева ЕВ, Некрасов МС, Брус ТВ, Пурвеев СС (2021) Воздействие раннего постнатального стресса на психоэмоциональное состояние и развитие склонности к чрезмерному употреблению высокоуглеводной пищи у крыс. *Рос биомед исследов* 6(2): 27–37. [Balakina ME, Degtyareva EV, Nekrasov MS, Brus TV, Purveev SS (2021) Effect of early postnatal stress upon psychoemotional state and development of excessive consumption of high-carbohydrate food in rats. *Russ Biomed Res* 6(2): 27–37. (In Russ)].
23. Wang S, Wang J, Lv X (2018) Selection of reference genes for expression analysis in mouse models of acute alcoholic liver injury. *Int J Mol Med* 41(6): 3527–3536. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3527>
24. Yang B, Cai G, Xiong C, Huang J (2021) Relative Deprivation and Game Addiction in Left-Behind Children: A Moderated Mediation. *Front Psychol* 12: 639051. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.639051>
25. Сексте ЭА, Лебедев АА, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Грамота КЕ, Thyssen IY, Shabanov PD (2021) Increase in the level of orexin receptor 1 (OX1R) mRNA in the brain structures of rats prone to impulsivity in behavior. *Biomed Chem* 67(5): 411–417. <https://doi.org/10.18097/PBMC20216705411>
26. Alvarez-Crespo M, Skibicka KP, Farkas I, Molnár CS, Egecioglu E, Hrabovszky E, Liposits Z, Dickson SL (2012) The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PloS One* 7(10): e46321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046321>
27. Ветлугин ЭА, Бычков ЕР, Абросимов МЕ, Москалев АР, Пшеничная АГ, Пурвеев СС, Лебедев ВА, Лебедев АА, Шабанов ПД (2022) Анксиолитическое и антидепрессивное действие SNAP 94847, антагониста рецептора 1-го типа меланин-концентрирующего гормона. *Педиатрия* 13(1): 25–34 [Vetlugin EA, Bychkov ER, Abrosimov ME, Moskalyev AR, Pshenichnaya AG, Purveev SS, Lebedev VA, Lebedev AA, Shabanov PD (2022) Anxiolytic and antidepressant effects of melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847. *Pediatriya* 82(6): 16–20. (In Russ)].

28. *Andrews ZB* (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34(1): 31–40.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.10.001>
29. *Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD* (2021) Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) in the brain. *Physiol Rep* 9(21): e15113.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15113>
30. *Leggio L, Zywiak WH, Fricchione SR, Edwards SM, de la Monte SM, Swift RM, Kenna GA* (2014) Intravenous ghrelin administration increases alcohol craving in alcohol-dependent heavy drinkers: a preliminary investigation. *Biol Psychiatry* 76(9): 734–741.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.019>
31. *Hemmann K, Raekallio M, Kanerva K, Hänninen L, Pastell M, Palviainen M, Vainio O* (2012) Circadian variation in ghrelin and certain stress hormones in crib-biting horses. *Veterin J* 193(1): 97–102.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.027>
32. *Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM* (2008) The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neurosci* 11(7): 752–753.
<https://doi.org/10.1038/nn.2139>
33. *Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M* (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PloS One* 7(2): e31462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031462>
34. *Cabral A, Portiansky E, Sánchez-Jaramillo E, Zigman JM, Perello M* (2016) Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67: 27–39.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.027>
35. *Roik RO, Lebedev AA, Shabanov PD* (2019) The value of extended amygdala structures in emotive effects of narcogenic with diverse chemical structure. *Res Pharmacol* 5(3): 11–19.
<https://doi.org/10.3897/npharmacology.5.38389>
36. *Koob GF* (2009) Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* 56(1): 18–31.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.043>
37. *Klein AK, Brito MA, Akhavan S, Flanagan DR, Le N, Ohana T, Patil AS, Purvis EM, Provenzano C, Wei A, Zhou L, Etenberg A* (2017) Attenuation of the anxiogenic effects of cocaine by 5-HT1B autoreceptor stimulation in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychopharmacology* 234(3): 485–495.
<https://doi.org/10.1007/s00213-016-4479-3>
38. *Pina MM, Cunningham CL* (2017) Ethanol-seeking behavior is expressed directly through an extended amygdala to midbrain neural circuit. *Neurobiol Learning and Memory* 137: 83–91.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.11.013>
39. *Aguilera G, Liu Y* (2012) The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol* 33(1): 67–84.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.08.002>
40. *Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M* (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7(2): e31462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031462>
41. *Willesen MG, Kristensen P, Römer J* (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70(5): 306–316.
<https://doi.org/10.1159/000054491>
42. *Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM* (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res* 61(1): 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.01.011>
43. *Zoicas I, Neumann ID* (2016) Maternal separation facilitates extinction of social fear in adult male mice. *Behav Brain Res* 297: 323–328.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.034>
44. *Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ* (2005) Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30(12): 2192–2204.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300769>
45. *Salzmann C, Otis M, Long H, Roberge C, Gallo-Payet N, Walker CD* (2004) Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. *Endocrinology* 145(4): 1810–1822.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1514>

46. Schmidt MV, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet ER, Holsboer F, Müller MB (2006) Metabolic signals modulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J Neuroendocrinol* 18(11): 865–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01482.x>
47. Шабанов ПД, Лебедев АА, Мещеров ШК (2002) Дофамин и подкрепляющие системы мозга. Санкт-Петербург. [Shabanov PD, Lebedev AA, Mescherov ShK (2002) Dopamine and thereinforsing systems of the brain. Saint Petersburg. (In Russ)].
48. Лебедев АА, Москалев АР, Абросимов МЕ, Ветлугин ЭА, Пшеничная АГ, Лебедев ВА, Евдокимова НР, Бычков ЕР, Шабанов ПД (2021) Действие антагониста нейропептида Y BMS193885 на переедание и эмоциональные реакции, вызванные социальной изоляцией у крыс. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 19(2): 189–202. [Lebedev AA, Moskalev AR, Abrosimov ME, Vetlugin EA, Pshenichnaya AG, Lebedev VA, Evdokimova NR, Bychkov ER, Shabanov PD (2021) Effect of neuropeptide antagonist BMS193885 on overeating and emotional responses induced by social isolation in rats. *Rev Clin Pharmacol and Drug Therapy* 19(2): 189–202. (In Russ)].
49. Рейхардт БА, Шабанов ПД (2022) Грелиновые механизмы пищевого вознаграждения. Часть 2. Взаимодействие грелина с гормонами, нейропептидами и другими эндогенными лигандами. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 20(3): 229–254. [Reichardt BA, Shabanov PD (2022) Ghrelin mechanisms of nutritional reward. Part 2. Interaction of ghrelin with hormones, neuropeptides and other endogenous ligands. *Rev Clin Pharmacol and Drug Therapy* 20(3): 229–254. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF203229-254>

Studying the Involvement of Ghrelin in the Mechanism of Gambling Addiction in Rats after Exposure to Psychogenic Stressors in Early Ontogenesis

A. A. Lebedev^{a, *}, S. S. Purveev^{a, b}, E. A. Sexte^a, B. A. Reichardt^a,
E. R. Bychkov^a, and P. D. Shabanov^a

^aInstitute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

^bSt. Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

We investigated the role of ghrelin and its receptors in the manifestation of gambling addiction elements in rats exposed to early psychogenic stress. Rearing in conditions of social isolation or maternal deprivation in early ontogeny increased risk behavior and impulsivity in the Iowa Gambling Task test: animals sought more food reinforcement, but with a low probability. Maternal deprivation or rearing in social isolation increased expression of *Ghsr* in the amygdala and hypothalamus respectively. The level of expression of the gene under study in the prefrontal cortex did not change. It is concluded that early psychogenic stress causes an imbalance in the brain ghrelin regulatory system, which manifests itself in increased of *Ghsr* level as well as elements of gambling addiction. The scheme of the effect of chronic stress on the hypothalamic ghrelin system and on the extrahypothalamic regulation of ghrelin is presented.

Keywords: gambling, maternal deprivation, isolation rearing, ghrelin, mRNA ghrelin receptor