

Действие субстанции Р при центральном введении на прижизненный метаболизм дофамина в прилежащем ядре мозга крыс по данным микродиализа

НИКОЛАЕВ С.В.
ЛЕБЕДЕВ А.А.
БЫЧКОВ Е.Р.
ОБЛЯПИН А.В.

аспирант лаборатории нейрoхимии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;
к.б.н., с.н.с. НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;
к.м.н., с.н.с. лаборатории нейрoхимии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;
мл.н.с. лаборатории стереотаксической неврологии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;

ДАМБИНОВА С.А.

д.б.н., профессор, заведующая лабораторией нейрoхимии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;

ШАБАНОВ П.Д.

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии Российской военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург.

Изучали влияние нейропептида субстанции Р на содержание дофамина (ДА) и его метаболитов в прилежащем ядре мозга у крыс. Для этой цели использовали метод in vivo микродиализа с последующим хроматографическим определением ДА, диоксифенилуксусной (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в диализате. Во время прижизненной микродиализной процедуры животные находились в условиях свободного поведения. В течение трех дней каждому животному в латеральный желудочек последовательно вводили: физиологический раствор, 0,1 мкг субстанции Р и 1,0 мкг субстанции Р. Отмечено повышение уровня ДА в диализате на 41 и 71% в ответ на введение нейропептида в дозах 0,1 и 1,0 мкг соответственно. Характер изменения уровня метаболитов ДА также зависел от дозы. Только введение субстанции Р в дозе 1,0 мкг на крысу приводило к достоверному повышению уровня ДОФУК кислоты на 28%. Уровень ГВК не изменялся после введения субстанции Р в обеих исследованных дозах. Полученные данные подтверждают предположение о том, что антиаддитивные свойства субстанции Р в значительной степени определяются дофаминергическими механизмами.

Согласно современным представлениям, устойчивость патологического состояния зависимости, в частности при алкоголизме, обусловлена нейрoхимическими перестройками в мозгу. При этом наиболее значимо вовлечение в этот процесс медиаторных систем, в норме принимающих участие в реализации эмоционального и мотивационного поведения. С этих позиций ведущим звеном в системе нарушенного гомеостаза, по-видимому, являются дисрегуляция и истощение резервов на уровне ДА-ергической системы мозга. Общим признаком состояния отмены при разных видах наркомании является редуцированное содержание ДА в проекциях мезокортиколимбической системы [20]. Поэтому перспективен поиск фармакологических агентов, которые помимо прямого стимулирующего влияния на ДА-ергическую систему оказывали бы долгосрочный эффект, восстанавливая ее функциональные возможности. Субстанция Р является основным представителем семейства нейрокининовых пептидов в нервной системе млекопитающих. Участие субстанции Р и других нейрокининов в механизмах мотивационного поведения демонстрировалось на моделях самовведения различных аддитивных веществ, включая алкоголь [3]. Субстанция Р снижает потребление алкоголя как при центральном, так и периферическом введении [1, 2]. Предполагается, что подобные свойства определяются тесной связью с мезокортиколимбической системой мозга, ДА-ергические нейроны которой имеют рецепторы для субстанции Р [10] или наличием у последней собственной подкрепляющей активности. Субстанция Р и нейрокининовые рецепторы широко представлены в ряде мозговых структур, непосредственно связанных с эмоциональными реакциями,

таких, как миндалина, гиппокамп, передняя поясная извилина [12, 19]. У субстанции Р предполагается наличие свойств нейротрофического фактора в отношении ДА-ергических нейронов [13].

Кроме самого факта изменения активности той или иной нейрoхимической системы важна динамика изменения уровня медиатора, однако традиционными способами возможно измерять лишь суммарное содержание нейромедиатора в ткани без учета его синаптического высвобождения. Об активности системы в этом случае приходится судить на основании уровня метаболитов изучаемого соединения. Метод микродиализа позволяет исследовать активность нейрoхимической системы непосредственно, измеряя содержание внеклеточного пула медиатора, а также отслеживать изменения активности системы с течением времени у одного и того же животного. Метод основан на способности биологических молекул проникать через полупроницаемую мембрану, расположенную в исследуемой структуре мозга, по концентрационному градиенту. Непрерывный поток растворителя, движущийся по другую сторону мембраны, обогащается компонентами внеклеточной среды и накапливается в объеме, удовлетворяющем требованиям аналитической техники. Концентрация интересующего соединения в каждой собранной фракции отражает его относительное содержание в структуре мозга в определенный период времени.

Имеющиеся в литературе данные по микродиализу, касающиеся влияния субстанции Р на ДА-ергическую систему, получены в основном при периферическом или внутроструктурном введении нейропептида. В первом случае не исключены опосредованные эффекты, поскольку

ку субстанция Р обладает выраженным периферическим действием [7], во втором отсутствует целостная картина центральных эффектов. Кроме того, часть данных была получена в остром эксперименте, когда сам наркоз мог влиять на результаты исследования [4], а массивный выброс медиаторов из поврежденной нервной ткани мог маскировать физиологические колебания их уровня. Целью настоящего исследования явилось определение активности ДА-ергической мезолимбической системы мозга при интравентрикулярном введении субстанции Р свободно подвижным животным с использованием метода прижизненного микродиализа.

Методика

В эксперименте было использовано 6 крыс-самцов Вистар. Всем животным под нембуталовым наркозом были имплантированы канюли в правый желудочек мозга (АР = -0,9; L = 1,4; Н = 3,5). Одновременно с этим в область прилежащего ядра (АР = 2; L = 1,5; Н = 7) вводились микродиализные канюли для определения состава внеклеточной жидкости. После закрепления корпуса канюли на голове животного посредством акрилоксида животные помещались в индивидуальные клетки.

Микродиализные канюли имели концентрическую конструкцию, которая по сравнению с другими типами подобных устройств обеспечивала наименьшее повреждение ткани мозга [22]. Они были изготовлены из полой диализной мембраны (Nospal, Франция) с внешним диаметром 300 мкм и молекулярным порогом 20 кДа, которая при помощи эпоксидного клея фиксировалась внутри стальной трубки (диаметр 500 мкм) так, что длина свободного участка мембраны составляла 2,5 мм.

Микродиализное исследование проводили спустя 48 ч после операции. Поскольку фармакологические эффекты ввиду свободного поведения животных могут интерферировать с физиологическим изменением активности ДА-ергической системы, в частности реакцией на новизну [6], до проведения микродиализа все подопытные животные выдерживались в экспериментальной камере для ознакомления с обстановкой. Во время эксперимента приводящая линия канюли присоединялась к шприцу объемом 1 мл, содержащему модифицированный раствор Рингера, содержащий: 146 ммоль NaCl, 4 ммоль KCl, 2,2 ммоль CaCl₂. Посредством насоса высокой точности раствор подавался в микродиализную канюлю с постоянной объемной скоростью 2,5 мкл/мин. Отводящая линия канюли погружалась в микропробирку объемом 500 мкл, содержащую 5,0 мкл хлорной кислоты в качестве консерванта. Сбор диализата осуществляли в течение 25 мин, затем пробирку с диализатом заменяли следующей и немедленно помещали в жидкий азот. Субстанцию Р вводили в боковой желудочек мозга за 5 мин до завершения сбора 4-й порции диализата. В течение трех дней каждому животному последовательно вводили: в 1-й день — физиологический раствор, во 2-й день — 0,1 мкг субстанции Р, растворенной в 5 мкл физиологического раствора, в 3-й день — 1,0 мкг субстанции Р. Введение производили с помощью микродозатора в течение 1,5 мин. После этого проводили сбор еще четырех диализных проб. До проведения анализа пробы хранили при температуре -70°C. Определение содержания ДА, ДОФУК и ГВК в пробах диализата проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

В хроматографическую систему без предварительной обработки вводили 40 мкл диализата из каждой пробы.

Положение микродиализных канюль в структурах мозга верифицировали морфологически. После эксперимента животных забивали, осторожно высвобождали канюли, извлекали головной мозг и помещали его в 10%-ный раствор формалина. Впоследствии мозг замораживали и при помощи микротомы производили серию фронтальных срезов с шагом 250 мкм.

Обработку данных проводили методом дисперсионного анализа (ANOVA repeated measures design), в котором факторами служили время и фармакологическое воздействие. За базальный уровень (100%) принималось усредненное содержание медиатора или метаболитов в трех пробах, собранных непосредственно перед введением препарата.

Результаты исследования

Базовое содержание ДА в прилежащем ядре составляло $4,56 \pm 0,35$ пг, содержание ДОФУК $236 \pm 17,9$ пг, а уровень ГВК $203 \pm 12,4$ пг в расчете на 10 мкл пробы диализата. Относительное содержание ДА и его метаболитов в разные периоды времени представлено на рис. 1–3. Центральное введение субстанции Р в дозах 1,0 и 0,1 мкг

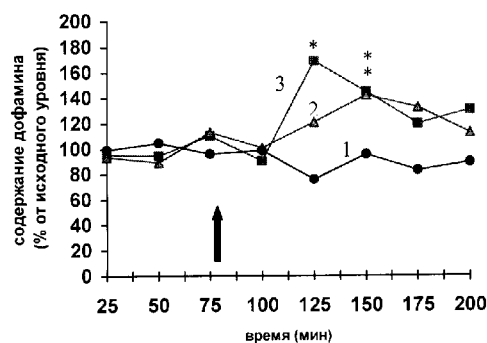


Рис. 1. Относительное содержание дофамина в прилежащем ядре крыс в различные фазы исследования:

1 — крысы, которым вводили физиологический раствор; 2 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 0,1 мкг; 3 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 1,0 мкг. По оси абсцисс — время исследования в минутах; по оси ординат — уровень дофамина в процентах от исходных значений. Стрелкой обозначено время введения субстанции Р и физиологического раствора; *P < 0,05 к исходному уровню

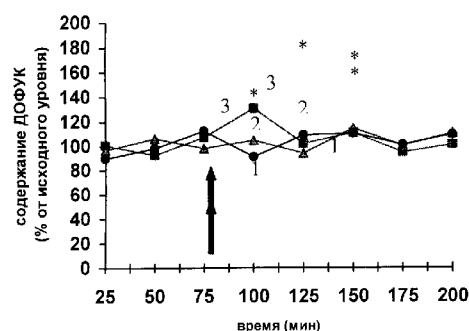


Рис. 2. Относительное содержание диоксифенилуксусной кислоты в прилежащем ядре крыс в различные фазы исследования:

1 — крысы, которым вводили физиологический раствор; 2 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 0,1 мкг; 3 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 1,0 мкг. По оси абсцисс — время исследования в минутах; по оси ординат — уровень диоксифенилуксусной кислоты в процентах от исходных значений. Стрелкой обозначено время введения субстанции Р и физиологического раствора; *P < 0,05 к исходному уровню

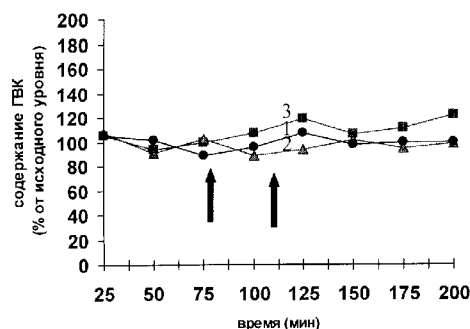


Рис. 3. Относительное содержание гомованилиновой кислоты в прилежащем ядре крыс в различные фазы исследования: 1 — крысы, которым вводили физиологический раствор; 2 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 0,1 мкг; 3 — крысы, которым вводили субстанцию Р в дозе 1,0 мкг. По оси абсцисс — время исследования в минутах; по оси ординат — уровень гомованилиновой кислоты в процентах от исходных значений. Стрелкой обозначено время введения субстанции Р и физиологического раствора; * $P < 0,05$ к исходному уровню.

вызвало повышение содержания ДА в прилежащем ядре на 71 и 41%, соответственно. При этом не только выраженность, но и динамика изменений зависела от концентрации препарата. При введении 1,0 мкг субстанции Р наблюдалось повышение уровня ДА через 50 мин. Через 75 мин после введения субстанции Р уровень ДА все еще оставался достоверно повышенным. При использовании 0,1 мкг нейропептида изменение содержания ДА отмечено лишь в пробах, собранных спустя 75 мин. Реакция со стороны метаболитов ДА также зависела от дозы. При дозе 1,0 мкг уровень ДОФУК повышался на 28%, введение нейропептида в дозе 0,1 мкг не вызвало изменений в содержании этого метаболита. Обе использованные дозы субстанции Р не оказали влияния на содержание ГВК.

Обсуждение результатов

Изменение уровня дофамина и метаболитов в прилежащем ядре при введении субстанции Р в желудочки мозга свидетельствует об участии мезолимбической системы в эффектах нейропептида. Полученные данные позволяют судить об относительном содержании исследуемых соединений. Расчет абсолютной концентрации медиатора в той или иной структуре мозга на основании его концентрации в диализате затруднен рядом обстоятельств. К таковым в первую очередь относятся особенности процессов диффузии в мозговой ткани. Моделированию диффузионных характеристик ткани мозга и расчету зависимости процессов трансмембранного переноса от геометрии поверхности и материала мембраны посвящено достаточно работ [9].

Зависимость темпов наступления изменений от дозы можно объяснить медленной диффузией пептида через экстраклеточное пространство [15, 17], при этом время, необходимое для достижения эффективной концентрации в области рецепторов, обратно пропорционально введенной дозе субстанции Р. Активация мезолимбической системы, вероятно, связана с непосредственным воздействием пептида на нейрокининовые рецепторы вентральной тегментальной области. Расположенные здесь ДА-ергические нейроны экспрессируют на своей поверхности рецепторы для нейрокининов первого и третьего типов (NK-1 и NK-3), которые в активированном состоянии усиливают частоту разрядов и синаптический выброс ДА [10, 21]. Хотя субстанция Р является специфическим лигандом NK-1 рецепторов, показана ее активность в отно-

шении рецепторов NK-3 типа [18], воздействием на которые также может объясняться усиленное выделение ДА.

Введение субстанции Р в область вентрального паллидума приводит к усилению выделения ДА в прилежащем ядре [5]. Кроме того, такое воздействие способно вызывать условную реакцию предпочтения места, причем подкрепляющее действие субстанции Р опосредовано рецепторами NK-1 [16]. Не исключено, что вентральный паллидум принимает участие в ДА-позитивных эффектах нейропептида и при внутрижелудочковом введении.

Способность СООН-концевых фрагментов субстанции Р проявлять подкрепляющие свойства и стимулировать выделение ДА неоднократно демонстрировалась в эксперименте [11]. Быстрое расщепление субстанции Р на биологически активные фрагменты пептидазами экстраклеточного пространства [14] предполагает немаловажное значение таких фрагментов для наблюдаемых изменений уровня ДА-ергической передачи. С другой стороны, реализация подкрепляющих свойств субстанции Р может не ограничиваться ДА-ергическими механизмами. Опиатергическая система мозга задействована в некоторых эффектах нейрокининов, в частности блокада опиатных рецепторов ингибирует развитие условной реакции предпочтения места на введение субстанции Р [8].

Таким образом, при введении субстанции Р в латеральный желудочек мозга наблюдалось повышение содержания ДА и его метаболита диоксифенилуксусной кислоты в области прилежащего ядра. Время наступления и выраженность повышения зависели от дозы нейропептида.

Список литературы

1. Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Дамбинова С.А. Влияние субстанции Р на потребление этанола у субхронически алкоголизированных крыс в тесте ограниченного доступа к алкоголю // Журн. высш. нерв. деят. — 2001. — Т. 51, № 1. — С. 120—122.
2. Бычков Е.Р., Николаев С.В., Лебедев А.А., Дамбинова С.А. Влияние периферического введения субстанции Р на потребление алкоголя и активность дофаминергических систем мозга // Психофармакол. биол. наркол. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 43—46.
3. Судаков С.К., Фигурина И.В., Медведева О.Ф., Русакова И.В. Влияние субстанции Р на внутривенное самовведение морфина у различных линий крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — Т. 132, № 4. — С. 923—925.
4. Adachi Y.U., Watanabe K., Satoh T., Vizi E.S. Halothane potentiates the effect of methamphetamine and nomifensine on extracellular dopamine levels in rat striatum: a microdialysis study // Brit. J. Anaesth. — 2001. — Vol. 86, N 6. — P. 837—845.
5. Boix F., Sandor P., Nogueira P.J.C., Huston J.P., Schwartz R.K. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region // Neuroscience. — 1995. — Vol. 64, N 4. — P. 1045—1055.
6. Feenstra M.G., Botterblom M.H. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty // Brain. Res. — 1996. — Vol. 742, N 1—2. — P. 17—24.
7. Harrison S., Geppetti P. Substance P // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2001. — Vol. 33. — P. 555—576.
8. Hasenuhl R.U., Gerhardt P., Huston J.P. Naloxone blocks conditioned place preference induced by substance P and [pGlu⁶]-SP(6-11) // Regul. Pept. — 1991. — Vol. 35. — P. 177—187.
9. Hsiao J.K., Ball B.A., Morrison P.F., Mefford I.N., Bungay P.M. Effects of different semipermeable membranes on in vitro and in vivo performance of microdialysis probes // J. Neurochem. — 1990. — Vol. 54. — P. 1449—1452.
10. Kalivas P.W. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in ventral tegmental area // Brain Res. Rev. — 1993. — Vol. 18. — P. 75—113.

11. Khan S., Brooks N., Whelpton R., Michael-Titus A.T. Substance P-(1-7) and substance P-(5-11) locally modulate dopamine release in rat striatum // *Eur. J. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 282. — P. 229–233.
12. Kiyama H., Maeno H., Tohyama M. Substance P receptor (NK-1) in the central nervous system: possible functions from a morphological aspect // *Regul. Pept.* — 1993. — Vol. 46. — P. 114–123.
13. Mattioli R., Schwarting R.K.W., Huston J.P. Recovery from unilateral 6-hydroxydopamine lesion of substantia nigra promoted by the neurotachykinin substance P1-11 // *Neurosci.* — 1992. — Vol. 48. — P. 595–605.
14. Michael-Titus A.T., Fernandes K., Setty H., Whelpton R. In vivo metabolism and clearance of substance P and co-expressed tachykinins in rat striatum // *Neurosci.* — 2002. — Vol. 110, N 2. — P. 277–286.
15. Nicholson C., Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis // *Trends Neurosci.* — 1998. — Vol. 21. — P. 207–215.
16. Nikolaus S., Huston J.P., Hasenöhrl R.U. Reinforcing effects on neurokinin substance P in the ventral pallidum: mediation by the tachykinin NK-1 receptor // *Eur. J. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 370. — P. 93–99.
17. Pardridge W.M. Drug delivery to the brain // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1997. — Vol. 17. — P. 713–731.
18. Regoli D., Boudon A., Fauchere J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides // *Pharmacol. Rev.* — 1994. — Vol. 46. — P. 551–599.
19. Ribeiro-da-Silva A., Hökfelt T. Neuroanatomical localization of substance P in the CNS and sensory neurons // *Neuropeptides.* — 2000. — Vol. 34, N 5. — P. 256–271.
20. Rossetti Z.L., Hmaidan Y., Gessa G.L. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats // *Eur. J. Pharmacol.* — 1992. — Vol. 221. — P. 227–234.
21. Seabrook G.R., Bowery B.J., Hill R.G. Pharmacology of tachykinin receptors on neurons in the ventral tegmental area of rat brain slices // *Eur. J. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 273. — P. 113–119.
22. Westerink B.H.C., De Vries J.B. Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: methodological aspects // *J. Neurosci.* — 1988. — Vol. 51. — P. 683–687.

ACTION OF CENTRALLY ADMINISTERED SUBSTANCE P ON DOPAMINE METABOLISM IN NUCLEUS ACCUMBENS AS MEASURED BY MICRODIALYSIS IN FREELY MOVING RATS

NIKOLAYEV S.V.	postgraduate researcher, Neurochemical Lab. of Human Brain Institute of RAS, Sankt-Peterburg
LEBEDEV A.A.	cand.biol.sci., senior researcher, Institute of experimental medicine of RAMR, Sankt-Peterburg
BYCHKOV E.R.	cand.med.sci., senior researcher of Neurochemical Lab. of Human Brain Institute of RAS, Sankt-Peterburg
OBLYAPIN A.V.	junior researcher of Stereotaxis Neurology Lab. of Human Brain Institute of RAS, Sankt-Peterburg
DAMBINOVA S.A.	Dr.med.sci., professor, Head of Neurochemical Lab. of Human Brain Institute of RAS, Sankt-Peterburg
SHABANOV P.D.	Dr.med.sci., professor, Head of chair of Pharmacology, S.-P. military med. academy, Sankt-Peterburg

The influence of neuropeptide substance P on the contents of dopamine (DA) and its metabolites in the nucleus accumbens of rats was studied. For these purposes, we used in vivo microdialysis in freely moving animals with subsequent chromatographic detection of DA, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid GVA in dialysate. During 3 days, each animal was administered intraventricular saline (1st day), 0,1 mkg substance P (2nd day), 1,0 mkg substance P (3rd day). As a result, the elevation of accumbal DA was observed, which amounts to 41% and 71% for 0,1 mkg and 1,0 mkg of the neuropeptide, respectively. The response of metabolites also depended on neuropeptide concentration. Substance P at the dose 1,0 mkg increased contents of DOPAC on 28%, while 0,1 mkg did not change this parameter. The contents of GVA was unaffected by central substance P at the doses studied. The present data confirm the suggestion that antiaddictive potential of substance P is determined with its dopaminergic properties in high degree.