

# **Изучение эффекта ситуационной новизны на внеклеточное содержание дофамина в прилежащем ядре мозга крыс с использованием метода микродиализа на свободно подвижных животных**

ЛЕБЕДЕВ А.А.  
НИКОЛАЕВ С.В.  
БЫЧКОВ Е.Р.  
ШАБАНОВ П.Д.

к.б.н., с.н.с. НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;  
аспирант лаборатории нейрехимии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;  
к.м.н., с.н.с. лаборатории нейрехимии Института мозга человека РАН, Санкт-Петербург;  
д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии Российской военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург.

*У животных, выращенных в условиях территориальной и социальной изоляции от сородичей или в условиях группового содержания (контроль), после помещения в новую обстановку (экспериментальную камеру в виде стеклянной полусферы диаметром 30 см) уровни внеклеточного дофамина (ДА) в прилежащем ядре мозга увеличивались по сравнению с исходными величинами. При этом у крыс-изолянтов в течение первых 50 мин пребывания в экспериментальной камере содержание медиатора было достоверно выше, чем у контрольных животных, а в последующие 25 мин уровень ДА у изолянтов практически возвращался к исходным величинам, в то время как у животных контрольной группы еще достоверно отличался от начального. Таким образом, у крыс, выращенных в условиях социальной изоляции, реактивность ДА-ергической системы мозга выше, чем у сгруппированных животных. Вместе с тем, система ДА у крыс-изолянтов быстрее возвращается к исходному уровню, что указывает на ее большую лабильность и, возможно, более быструю истощаемость.*

Известно, что социальная изоляция животных от сородичей в раннем онтогенезе приводит к изменению реактивности их нервной системы. Это проявляется повышением двигательной и исследовательской активности, появлением элементов стереотипий и персевераций, повышением чувствительности рецепторов ДА к действию агонистов и антагонистов [5, 8]. С другой стороны, известно также, что ограничение социального опыта является фактором, способствующим формированию зависимости от психостимуляторов и других психоактивных средств [2, 3]. Ранее нами [1–4] доказано, что при социальной изоляции происходит только временное повышение чувствительности ДА-ергической системы с последующим ее функциональным истощением. До настоящего времени нейрехимические механизмы, ответственные за эти особенности, изучены недостаточно. Учитывая тесную связь ДА-ергических систем мозга с исследовательским поведением и стрессом [2, 4], изучалось влияние ситуационной новизны на уровень ДА в проекциях мезолимбической системы мозга методом микродиализа *in vivo*. Метод определения внеклеточного содержания ДА в мозгу крыс методом микродиализа *in vivo* основан на способности биологических молекул диффундировать через полупроницаемую мембрану, расположенную в исследуемой структуре мозга, по концентрационному градиенту. Непрерывный поток растворителя, движущийся по другую сторону мембраны, обогащается компонентами внеклеточной среды и собирается в объеме, удовлетворяющем требованиям аналитической техники. Концентрация интересующего соединения в определенной фракции отражает его относительное содержание в структуре мозга в момент сбора данной фракции.

## **Методика**

В опыте использовано 12 крыс-самцов Вистар массой 250–350 г, половина из которых была подвергнута проце-

дуре ранней социальной изоляции, а другая половина, выращенная в сообществе, служила контролем. Животных содержали при свободном доступе к пище и воде в условиях инвертированного света с 6.00 до 18.00.

**Выращивание крыс в условиях социальной изоляции.** Животных помещали в индивидуальные клетки с 17-го дня после рождения, когда они становились способными к самообеспечению. В изоляции крысы находились до 100–120 дней. Именно такой период постнатального развития считается наиболее значимым для формирования адаптивного поведения у крыс под влиянием различных воздействий внешней среды [1, 4]. Индивидуальные клетки размерами 40х30х25 см были сконструированы таким образом, чтобы свести к минимуму контакт животного с экспериментатором или служителем вивария при уборке клетки. К началу опыта возраст животных-изолянтов и сгруппированных крыс был одинаков (100–120 дней). После каждого экспериментального исследования крысы-изолянты возвращались в свои индивидуальные клетки.

**Исследование поведения.** В качестве оценки эффекта на новизну (перемену обстановки) использовали помещение животного из места содержания в экспериментальную установку. Установка представляла собой стеклянную полусферу диаметром 30 см. Забор диализата производили у крысы в клетке содержания, а в дальнейшем — в стеклянной полусфере с интервалами в 25 мин.

**Стереотаксическая процедура.** Под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) всем животным имплантировали стандартные микродиализные канюли СМА/10 (Швеция) с длиной мембраны 2,5 мм в прилежащее ядро (рис. 1) согласно следующим координатам: AP=2,0; SD=1,5; H=7,1 согласно атласу [7]. В течение трех дней до операции и весь послеоперационный период животных содержали в индивидуальных клетках. Спустя 48 ч после операции приводящую линию канюли присоединяли к шприцу объемом 1 мл, содержащему модифицированный раствор

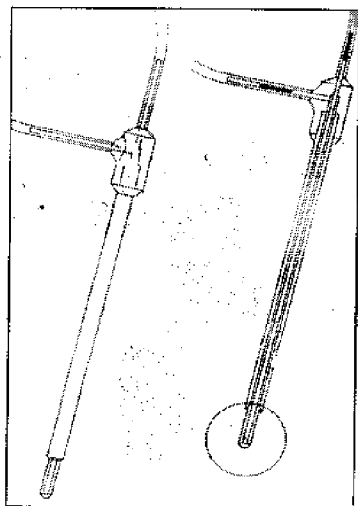


Рис. 1. Микродиализная канюля CMA/10 (Швеция)

Рингера (NaCl 146 мМ, KCl 4,0 мМ, CaCl<sub>2</sub> 2,2 мМ), нагнетание раствора осуществляли безынерционным насосом CMA/100 с объемной скоростью 2 мкл/мин.

Отводящую линию канюли помещали в микропробирку, содержащую 5 мкл хлорной кислоты. Сбор диализата производили 25 мин, после чего пробирку с диализатом немедленно помещали в жидкий азот и заменяли следующей. После окончания сбора 4-й пробы, не прекращая диализной процедуры, животное помещали в стеклянную полусферу диаметром 30 см. В дальнейшем собирали еще 4 пробы диализной жидкости, после чего исследование завершали. Полученные пробы хранили при температуре —70 °С в течение 1 месяца.

**Биохимические исследования.** Содержание ДА определяли методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с использованием электрохимического детектора. Образцы пробы в объеме 40 мкл вводили без предварительной модификации в хроматографическую систему, которая состояла из насоса 305 Gilson (США), инжектора Rheodyne, колонки Partisil 5ODS3 (4,6x250,0 мм), предколонки Pellicular ODS (4,6x70,0 мм) и амперометрического детектора LC-4B BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале +0,75 В. Подвижная фаза состояла из 0,02 М цитрат-фосфатного буфера (рН 3,5), 0,002 М натриевая соль ЭДТА, 0,004% октилсульфата натрия, 6,5% метанола при скорости потока 1,2 мл/мин. Время анализа составляло 40 мин. Статистический анализ проводили с использованием программы ANOVA.

### Результаты исследования

Прижизненное определение содержания ДА в структурах мозга является ценным показателем функционирования ДА-ергической системы. Данные об изменениях уровня ДА в прилежащем ядре представлены на рис. 2. У животных, выращенных в условиях социальной изоляции от сородичей или в условиях группы, после помещения в новую обстановку (экспериментальную камеру, представлявшую стеклянную полусферу диаметром 30 см) уровни ДА в прилежащем ядре были повышены по сравнению с исходными величинами. При этом у крыс-изолянтов в течение первых 50 мин пребывания в экспериментальной камере содержание медиатора было достоверно

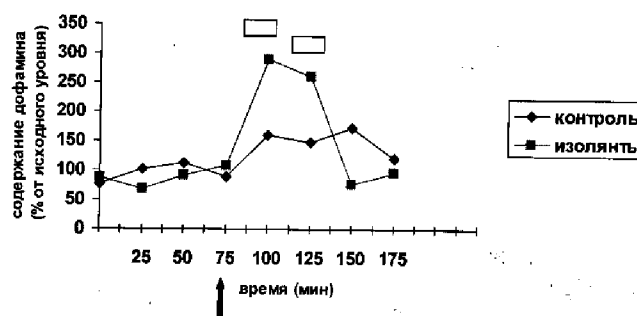


Рис. 2. Содержание внеклеточного дофамина в области прилежащего ядра. Стрелкой отмечено время помещения животных из жилой в экспериментальную камеру. Прямоугольниками обозначены данные, статистически достоверные при  $P < 0,05$

выше, чем у контрольных животных. Однако в последующие 25 минут уровень ДА у изолянтов практически возвращался к исходным величинам, в то время как у животных контрольной группы еще достоверно отличался от начального. Таким образом, у крыс, выращенных в условиях социальной изоляции, реактивность ДА-ергической системы мозга выше, чем у сгруппированных животных. Вместе с тем, система ДА у крыс-изолянтов быстрее возвращается к исходному уровню, что указывает на ее большую лабильность и, возможно, более быструю истощаемость.

### Обсуждение результатов

Посмертное определение нейромедиаторов в структурах головного мозга предоставляет данные лишь об их суммарном содержании, которое определяется в основном темпом их синтеза и мало отражает физиологически значимые колебания. Для исследования связи активности медиаторных систем с теми или иными фазами поведения используется большое количество животных с изучением косвенных признаков, таких, например, как уровень метаболитов. Метод микродиализа позволяет исследовать активность нейрохимических систем непосредственным измерением содержания внеклеточного пула медиатора. При этом имеется возможность оценки изменения активности той или иной системы с течением времени у одного и того же животного. Это повышает статистическую ценность получаемых данных.

Социальная изоляция крыс от сородичей меняет поведение животных, что проявляется повышением двигательной и исследовательской активности, реактивности на введение агонистов ДА, различных экспериментальных процедур, снижает порог болевых раздражителей, вызывает персеверации [4, 5]. В наших исследованиях фенамин в диапазоне доз от 0,5 до 5 мг/кг существенно повышал реактивность ДА-ергической системы мозга крыс-изолянтов [1, 2, 4]. Вместе с тем, фенамин существенно увеличивает высвобождение внеклеточного пула ДА в прилежащем ядре и других ДА-ергических структурах мозга у свободно подвижных крыс при исследовании методом микродиализа [5, 6]. Полученные нами данные об увеличении внеклеточного содержания ДА у крыс с различным индивидуальным опытом вполне укладываются в эту общую картину. При этом крысы-изолянты в отличие от сгруппированных особей более активно реагируют на новую для них обстановку. В работе [5], в которой в сходных условиях эксперимента изучали реакцию крыс-изолянтов на процедуру электрокожного наказания, найдено, что повышение высвобождения экстракеле-

точного ДА было более выражено и регистрировалось более длительно у изолянтов, нежели у сгруппированных животных. При этом уровни основных метаболитов ДА 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот практически не менялись за исследуемый период времени или же менялись незначительно, не повторяя динамику изменений самого медиатора. В то же время, эти авторы [5] также нашли, что нормализация повышенного уровня ДА происходит приблизительно к 120-й минуте наблюдений. Аналогичные результаты получены и в нашей работе, когда нормализацию базального уровня внеклеточного ДА регистрировали в период между 125-й и 150-й минутами исследования.

Таким образом, полученные данные предполагают несколько общих заключений. Показатель внеклеточного содержания ДА является достаточно чувствительным для исследования ДА-ергической системы мозга. На основании изменений уровня внеклеточного ДА можно косвенно судить об активности ДА-ергической структуры мозга, в нашем случае об активности прилежащего ядра. У крыс-изолянтов ДА-ергическая система, по-видимому, более чувствительна к воздействию внешних факторов (более лабильна), в наших опытах это реакция на новую экспериментальную обстановку. Степень лабильности системы ДА у животных, выросших в условиях социальной изоляции от сородичей, ограничена. Нормализация базального уровня экстраклеточного содержания ДА наблюдается через 2–2,5 ч после сильного стрессогенного воздействия. В наших исследованиях таким агентом было помещение в новую экспериментальную обстановку, в исследованиях других авторов [6] — значимое для животных электрокожное наказание. И, наконец, показатели уровней внеклеточного ДА могут в определенной степени

служить критерием объективной оценки поведенческих феноменов, связанных с активностью ДА-ергической системы мозга. Это предполагает адекватное использование методики для изучения общих закономерностей формирования зависимости от психоактивных средств, избирательно влияющих на ДА-ергическую передачу мозга.

Поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-04-49073).

### Список литературы

1. Ноздрачев А.Д., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Организация подкрепляющих систем мозга // Вестник СПбГУ. — 2000. — Сер. 3. — Вып. 4 (27). — С. 62–76.
2. Шабанов П.Д. Дофаминергические системы мозга: участие в эффектах психостимуляторов, кортикостероидов и этанола // Мед. акад. журн. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 41–57.
3. Шабанов П.Д., Лебедев А.А. Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрхимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов // Психофармакол. и биол. наркол. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 13–26.
4. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мещеров Ш.К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. — СПб.: Лань, 2002. — 208 с.
5. Fulford A.J., Marsden C.A. Effect of isolation-rearing on conditioned dopamine release in vivo in the nucleus accumbens of the rat // J. Neurochem. — 1998. — Vol. 70. — P. 384–390.
6. Hall F.S., Wilkinson L.S., Humby T. et al. Isolation rearing in rats: Pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems // Pharmacol. Biochem. and Behav. — 1998. — Vol. 59, N 4. — P. 859–872.
7. König P.R., Klippel A. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. — Baltimore, 1963. — 214 p.
8. Wongwitdech N., Marsden C.A. Isolation rearing prevents the reinforcing properties of amphetamine in a conditioned place preference paradigm // Eur. J. Pharmacol. — 1995. — Vol. 279. — P. 99–103.

### THE EFFECT OF NOVELTY ON EXTRACELLULAR DOPAMINE LEVEL IN THE NUCLEUS ACCUMBENCE OF RATS WITH DIFFERENT INDIVIDUAL EXPERIENCE ASSESSED BY IN VIVO MICRODIALYSIS IN FREELY MOVING ANIMALS

|                |                                                                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LEBEDEV A.A.   | cand.biol.sci., senior researcher,<br>Institute of experimental medicine RAMS, Sankt-Peterburg        |
| NIKOLAYEV S.V. | postgraduated researcher, laboratory of neurochemistry,<br>RAS Human Brain Institute, Sankt-Peterburg |
| BYCHKOV E.R.   | Cand.med.sci., researcher of neurochemistry laboratory,<br>RAS Human Brain Institute, Sankt-Peterburg |
| SHABANOV P.D.  | Dr.med.sci., professor, Russian Military Medical Academy,<br>Sankt-Peterburg                          |

*In rats, rearing in social isolation or in groups, the extracellular dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens were enhanced following replacing of an animal into a novel environment (glass hemisphere of 30 cm in diameter). The transmitter contents within the first 50 min were higher in isolated rats compared to socially reared rats. Then, the DA level was normalized in isolation-reared rats, while was enhanced in group-reared (control) rats. Therefore, in isolation-reared rats, the reactivity of the brain DA-ergic system is higher than in socially reared animals. Nevertheless, the DA-ergic system of isolation-reared rats is normalizing more quickly than in group-reared animals. That fact point out greater lability level of the system and probably exhaustivity in isolation-reared rats.*