

СПОСОБ ОБУЧЕНИЯ КРЫС ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ САМОСТИМУЛЯЦИИ В ОТВЕТ НА ПОДЪЕМ ГОЛОВЫ В ТЕЛЕМЕТРИЧЕСКОЙ УСТАНОВКЕ, РЕГИСТРИРУЮЩЕЙ УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОФАМИНА

© 2023 г. В. В. Сизов¹, А. А. Лебедев¹ *, С. С. Пюрвеев^{1, 2}, Е. Р. Бычков^{1, 3}, В. Н. Мухин¹, А. В. Дробленков¹, П. Д. Шабанов¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 23.03.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

В настоящей работе предложен способ обучения крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы в телеметрической установке, регистрирующей уровень внеклеточного дофамина. Первоначально в опытах Дж. Олдса было показано, что в ответ на электрическую стимуляцию зон положительного подкрепления у крыс наблюдается естественное исследовательское поведение, направленное на поиск источника награды. Сделано предположение, что естественный поведенческий акт, в частности подъем головы, может ускорить выработку и стабилизацию реакции самостимуляции. Изменение положения головы может служить внутренним проприоцептивным условным сигналом. Эксперименты проводили в кольцевой камере, где с помощью телеметрической установки стимулировали вентральную область покрышки (ВОП) при подъеме головы крысы на 38°. Реакция самостимуляции на подъем головы вырабатывалась и стабилизировалась в течение первого дня обучения. При pedalной самостимуляции отчетливые повторяющиеся реакции наблюдались только на 3-й день обучения после проведения процедур “наталкивания” на педаль в 1-й день обучения и “отталкивания” от педали на 2-й день обучения, стабилизация реакции наблюдалась только к 4-му дню обучения. После стабилизации реакции самостимуляции у крыс регистрировали уровень внеклеточного дофамина в прилежащем ядре методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии в ответ на навязанную стимуляцию ВОП до и после каждой из трех серий самостимуляции длительностью по 10 мин. После каждой серии самостимуляции уровень внеклеточного дофамина снижался, что отражает истощение внутриклеточного пула нейромедиатора в процессе длительной самостимуляции ВОП. Сделан вывод о перспективности использования способа обучения крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы для исследования механизмов подкрепления.

Ключевые слова: самостимуляция, уровень внеклеточного дофамина, метод быстросканирующей циклической вольтамперометрии, прилежащее ядро

DOI: 10.31857/S0044467723040093, **EDN:** WNONOT

Электрическая самостимуляция является одним из основных методов изучения механизмов подкрепления (Симонов, 1980). Суть метода самостимуляции состоит в том, что животное, нажимая на педаль (или совершая другие инструментальные реакции для полу-

чения внутримозгового подкрепления), производит электрическое раздражение участков мозга с помощью вживленного электрода (Lebedev et al., 2020; Panagis et al., 2022). В ранних исследованиях для оценки действия фармакологических средств и степени пора-

жения подкрепляющих систем мозга для самостимуляции применяли более простые инструментальные движения, чем нажатия на педаль. Оказалось, что они требуют меньшего времени для обучения и могут давать более стабильную реакцию самостимуляции (Velazquez-Martinez et al., 2022; Trujillo-Pisanty et al., 2020).

Для упрощения инструментального поведения при самостимуляции был разработан ряд вариантов методики (Velazquez-Martinez et al., 2022; Fakhoury, 2021). В частности, было описано контактное устройство, установленное на голове крысы, которое замыкало цепь, когда крыса касалась пластины над головой. Частота и пороги самостимуляции при этом оказались сравнимы с показателями, которые регистрировали в рамках педального варианта методики (Liebman, 1983). В качестве инструментального движения использовали также облизывание поверхности. Еще один вариант методики состоял в том, что животное просовывало голову в отверстие в полу или стене экспериментальной камеры. Луч фотоэлемента, установленный внутри пола (стены), определял число реакций. Использовали также регистрацию передвижения животного по горизонтальной поверхности. Перемещаясь, животное прерывало разные лучи для каждой серии вознаграждающей стимуляции мозга (Liebman, 1983). В качестве инструментального движения во время ограничения локомоторной активности животного использовали также движения его конечностей или хвоста (Liebman, 1983).

В настоящей работе предложен способ обучения крыс электрической самостимуляции, где животное должно совершить подъем головы, чтобы получить подкрепление. Электрическая стимуляция при обучении реакции самостимуляции в камере Скиннера с педалью, как правило, вызывает исследовательскую реакцию поискового характера, когда положение головы изменяется при обнюхивании окружающего пространства. Однако искусственные условия наличия педали в камере Скиннера снижают проявление естественных видоспецифических паттернов поведения, направленных на реализацию интегративного эмоционального ответа. В связи с этим реакцию самостимуляции уже к 80–90-м годам многие исследователи стали считать искусственным феноменом, не отражающим реальную картину (Negus, Miller, 2014). Первоначально в опытах Дж. Олдса у животных наблюдалось естественное поведе-

ние, характеризующееся возвращением в то место, где производилась стимуляция мозга (Симонов, 1980). Таким образом, перспектива использования способа самостимуляции в ответ на подъем головы, когда педаль отсутствует, связана с естественным видовым поведением. Более того, подъем головы является внутренним проприоцептивным условным сигналом. Наличие только внутреннего сигнала изменения положения головы без дополнительного внешнего сигнала (педали), согласно исходной гипотезе, должно вызывать увеличение скорости обучения самостимуляции. Естественное снижение положения головы после ее подъема является аналогом отключения электрической стимуляции, необходимого при обучении реакции самостимуляции в фиксированном режиме. Как известно, положительные подкрепляющие свойства электрической стимуляции наблюдаются в течение 0.5 с после нажатия педали в камере Скиннера и могут трансформироваться в отрицательные при увеличении длительности раздражения (Симонов, 1980). Согласно проведенному анализу доступной литературы, метода, подобного предложенному в настоящей работе, ранее использовано не было.

Нейромедиатор дофамин (ДА) традиционно ассоциируется с нейрохимическими исследованиями механизмов подкрепления при самостимуляции (Бычков и др., 2020; Ide et al., 2017). Показано, что вещества, активизирующие систему ДА головного мозга, повышают частоту и снижают пороги реакции самораздражения (Solomon et al., 2017). Выявлено, что структуры мозга, при раздражении которых наблюдается интенсивная реакция самостимуляции, содержат дофаминергические нейроны (Solomon et al., 2017).

Целью работы было предложить способ обучению крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы в телеметрической установке, снабженной устройством для регистрации уровня внеклеточного ДА. В наших предыдущих исследованиях высвобождение ДА регистрировалось в остром опыте на наркотизированных животных (Мухин и др., 2020, Пюрвеев и др., 2022). В настоящих исследованиях сделана попытка регистрации уровня внеклеточного ДА в свободном поведении с помощью телеметрической установки.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на 11 крысах-самцах Вистар массой 250 г в соответствии с этическими принципами, описанными в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г, одобренной комиссией по биоэтике ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”.

Животных наркотизировали золетилом-100, 50 мг/кг (Valdepharm, Франция). В ВОП вживляли электрод для стимуляции (стальной биполярный электрод толщиной 0.2 мм с изоляцией). Координаты электрода относительно брегмы: $AP = -5.3$ мм, $L = 0.8$ мм, $H = 8.2$ мм (Paxinos, Watson., 2005). Для регистрации уровня DA в прилежащее ядро ипсилатерально вживляли углеродный микроэлектрод в стеклянной изоляции (длина открытого кончика 100 мкм и толщина 7 мкм). Электрод для регистрации имплантировали согласно координатам: $AP = +2.0$ мм (от брегмы); $L = 1.2$ мм; $H = 7.3$ мм от поверхности черепа (Paxinos, Watson, 2005). Вживляли также электрод сравнения диаметром 3 мм из прессованного Ag/AgCl по координатам: $AP = +5.5$ мм (от брегмы); $L = 0$. Для крепления электрода на поверхности черепа использовался акрил с УФ-отверждением. Положение электродов для стимуляции и для регистрации изменяли до получения максимального высвобождения DA и затем фиксировали. Далее в течение 1 недели животных содержали в индивидуальных клетках для восстановления после оперативного вмешательства. Для профилактики инфекционных осложнений во время операции крысам вводили бициллин-3.

Эксперименты по изучению реакции самостимуляции проводили на двух группах животных:

1. Исследование реакции самостимуляции в камере Скиннера (нажатие педали для получения положительного подкрепления) ($n = 6$).

2. Исследование реакции самостимуляции в кольцевой камере (двигательная реакция для получения внутреннего подкрепления заключалась в подъеме головы животного, который регистрировался с помощью беспроводной телеметрической установки) ($n = 5$).

Крыс группы 1 обучали нажатию на педаль в камере Скиннера ($35 \times 12 \times 21$ см). В начале обучения подкреплялось движение животного к педали, затем и нажатие педали. После нажатия педали происходила электрическая

стимуляция структуры мозга, продолжительностью 0.5 с. Анализировали число нажатий педали и порог реакции самостимуляции (в мкА) за весь период “сеанса”. Реакцию самораздражения проводили в режиме FR1, т.е. каждое нажатие на педаль подкрепляли электрической стимуляцией ВОП. Для раздражения применяли серии прямоугольных импульсов (длительность импульса 1 мс с частотой 100 Гц в течение 0.5 с). При определении пороговых значений в навязанном режиме подавался ток нарастающими порциями длительностью по 5 с шагом по 2 мкА до появления отчетливых реакций нажатия на педаль. Далее повышали силу тока на 50% от пороговых значений и затем снижали силу тока (шаг 2 мкА длительностью стимуляции 5 с) до появления отказа от нажатия педали.

Процедуру поиска пороговых значений силы тока для самостимуляции повторяли 2 раза. При совпадении значений силы тока, полученных при нарастающем и снижающем режимах, его считали порогом реакции самораздражения (Lebedev et al., 2020).

Эксперимент выполнен с помощью разработанного нами (инженер В.В. Сизов) телеметрического аппаратно-программного комплекса “Циклон”, включающего в себя несколько блоков: блок быстросканирующей циклической вольтамперометрии (FSCV) (потенциостат), электрический раздражитель (стимулятор нервной ткани), световой и звуковой раздражитель, акселерометр для определения положения головы, блок видеорегистрации положения крысы.

У крыс группы 2 вырабатывали реакцию самостимуляции на подъем головы и определяли пороговые значения силы тока в кольцевой камере, подобно экспериментам в группе 1. Для регистрации подъема головы в состав комплекса “Циклон” входил 3-осевой акселерометр LIS2DW12 фирмы STMicroelectronics с частотой опроса 100 Гц и разрешением 16 бит в диапазоне $\pm 2g$ (g – ускорение свободного падения). В процессе эксперимента передача данных осуществлялась по каналу Bluetooth модулем SPBTLE-1S фирмы STMicroelectronics. Сменный литий-полимерный аккумулятор обеспечивал непрерывную работу модуля до 10 часов. Масса модуля с аккумулятором составляла 7–8 г.

Компьютер анализировал наклон головы вперед-назад и справа-налево. Нейтральным считалось положение головы, аналогичное

принятому стереотаксическому стандарту, — брегма на одном уровне с лямбдой, ушные отверстия на одном уровне по отношению к горизонту. По достижении заданного “тангажа” и “крена” компьютер посылал по каналу Bluetooth команду, содержащую параметры стимула, на устройство блока быстросканирующей циклической вольтамперометрии.

Блок FSCV включал 2 идентичных канала 16-разрядных ЦАП (DAC8551, Texas Instruments), обеспечивающих общепринятые на данный момент параметры поддержки (–400 мВ) и изменения (до +1300 мВ за 4.5 мс) уровня напряжения на рабочем электроде. Сканирующие импульсы на обоих каналах были разнесены по времени. Ток регистрировался по классической схеме на операционных усилителях (AD8606, Analog Devices). Оцифровка производилась 16-разрядным АЦП (ADS8319, Texas Instruments), подключаемым к одному из каналов посредством аналогового ключа (ADG723, Analog Devices). Частота дискретизации составляла 54 кГц. Таким образом, на один сканирующий импульс продолжительностью 10 мс приходилось 500 точек. Изменение напряжения было синхронизировано с измерением тока. Отправка данных осуществлялась по радиоканалу каждый раз после завершения цикла из двух сканирующих импульсов: по одному и по второму каналу регистрации. Тогда же принимались команды с управляющего компьютера. Задержка от момента достижения заданного положения головы животного до начала стимуляции составляла 100 мс. Эта задержка была обусловлена протоколом обмена информацией между компьютером и устройством блока быстросканирующей циклической вольтамперометрии. Ранее показано, что задержка времени до 200 мс от нажатия на педаль до электрического стимула не сказывается на частоте самостимуляции (Fouriezos, Randall, 1997).

Электрический раздражитель (электро-стимулятор) входил в состав комплекса “Циклон” как самостоятельный модуль массой 400 мг. Его конструкция позволяла свести к приемлемому уровню наводки на синхронно регистрируемую вольтамперограмму благодаря применению гальванической развязки с низкой проходной емкостью и индуктивностью. Управление параметрами стимула производилось по каналу электрического питания прибора, что минимизировало количество электронных компонентов. В изолиро-

ванной части располагался микроконтроллер, что обеспечивало цифровое качество стимулов. Ток стимула задавался с точностью 1 мкА в диапазоне 8–378 мкА, длительность импульсов — дискретно (0.5, 1, 1.5, 2 мс). Импульсы биполярные, задержка между фазами составляла 50 мкс. Частота следования импульсов — 64 Гц. Чтобы вместить сканирующие импульсы (и не было при этом наводок), количество пачек импульсов по 5 штук могло быть задано от 1 до 300.

Питание и управление осуществлялось через трансформатор, подключенный к цифровому питанию (3В) блока FSCV через N-канальный полевой MOSFET-транзистор. Частота составляла 10–20 кГц. Напряжение питания стабилизатора тока было равно 28 В, что обеспечивало заданный стабильный ток при сопротивлении раздражающих электродов до 74 кОм. Для коммутации выходного тока использован аналоговый ключ MAX333A. Преобразователь напряжение-ток осуществлял операционный усилитель OPA170. Дешифровку параметров, управление коммутатором и током осуществлял микроконтроллер ATTINY416 по загруженной в него программе на этапе изготовления стимулятора (рис. 1).

Для самостимуляции использовали специальную кольцевую камеру (внешним диаметром 50 см и внутренним диаметром 26 см). Кольцевая камера обеспечивала звукоизоляцию и экранирование от электромагнитных волн, передвижения животного в свободном поведении регистрировались автоматически, информация передавалась на компьютер по каналу Bluetooth (рис. 2). Для появления ориентировочно-исследовательской реакции при обучении реакции самостимуляции применяли однократную (одновременную, кратковременную) подачу светового и звукового раздражителей (1 с). Регистрировали число поднятий головы на 38 градусов для получения внутримозгового подкрепления в фиксированном режиме FR1 (подкреплялся каждый подъем головы). Для выявления определенного угла подъема головы при выработке реакции самостимуляции учитывали данные литературы. Было показано, что использование высокой педали, 6.2 см над полом (что соответствует 38 градусам подъема головы), значительно увеличивает скорость обучения, когда животное имеет возможность кусать педаль и производить по ней различные движения (Velazquez-Martinez et al., 2022; Pallikaras, 2022).

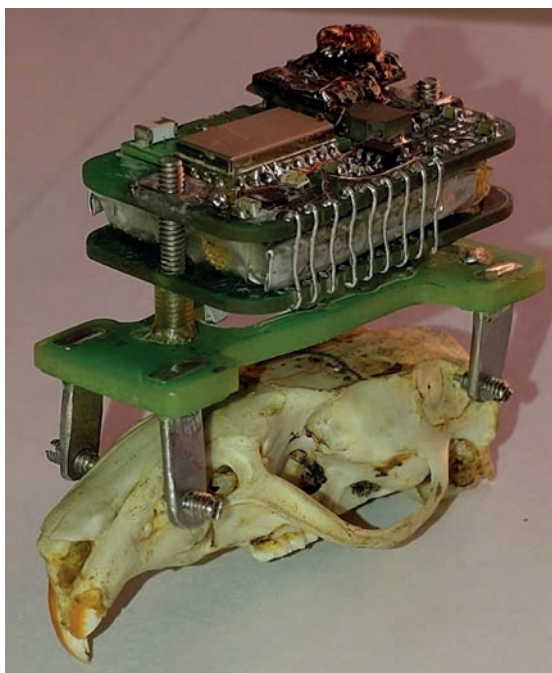


Рис. 1. Акселерометр и стимулятор в составе устройства регистрации FSCV, расположенного на черепе крысы.

Fig. 1. Accelerometer and stimulator as part of a FSCV recording device located on the skull of a rat.

Стимуляцию ВОП производили так же, как и в камере Скиннера, одиночными пачками прямоугольных электрических импульсов. Определение порога осуществляли, как и в камере Скиннера, нарастающими и снижающимися порциями силы тока.

После каждых 10 мин регистрации реакции самораздражения в кольцевой камере осуществлялся контроль наличия высвобождения DA (телеметрически у крыс в свободном поведении, находящихся в кольцевой камере). Выброс DA оценивали по изменению его экстраклеточного уровня в прилежащем ядре *in vivo* методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии в ответ на электрическое раздражение ВОП (Пюрвеев и др., 2022). Метод быстросканирующей циклической вольтамперометрии обладает преимуществом по сравнению с другими методами регистрации DA – высокой степенью временного и пространственного разрешения. Временное разрешение реализуется при частоте сканирования 10 раз в секунду, пространственное разрешение определяется размерами электрода для регистрации (углеводородное окно длиной 100 мкм и толщиной 7 мкм) (Mena et al., 2022). Раздражение ВОП осу-

ществляли в навязанном режиме одиночными пачками прямоугольных электрических импульсов (сила тока 240 мкА, длительность импульса 1 мс с частотой 100 Гц в течение 0.5 с). При тестировании реакции самостимуляции в фиксированном режиме использовались пачки импульсов с такими же характеристиками, при силе тока от 50 до 80 мкА.

Для регистрации уровня DA в ответ на стимуляцию ВОП использовали потенциал удержания 0.4 В и продолжительность сканирования 10 мс. Сканирующий импульс при этом подавали каждые 100 мс. Величина анодного предела составляла +1.3 В. Для анализа полученных данных применяли веб-приложение Analysis Kid с открытым исходным кодом. Приложение Analysis Kid разработано лабораторией Hashemi Lab, позволяет визуализировать, калибровать и фильтровать нейрохимические сигналы (Mena et al., 2022).

По завершении экспериментов был произведен морфологический контроль локализации положения электродов. Крыс умерщвляли передозировкой этиминала натрия и перфузировали физиологическим раствором, затем фиксировали в формалине, мозг выделяли и заливали целлоидином, делали фронтальные срезы и окрашивали крезильовым фиолетовым по методу Ниссля (рис. 3). Область локализации электродов верифицировали после завершения эксперимента в гистологических срезах мозга, используя стереотаксический атлас (Paxinos, Watson., 1998). Для морфологической верификации следа электрода для электростимуляции в вентральной области покрышки среднего мозга делали фронтальный разрез на уровне “Bregma –5.3 мм” (рис. 3 (а)), согласно стереотаксическому атласу. В этой области головного мозга ткань вентральной области покрышки наиболее обширна и представлена дофаминергическим паранигральным ядром (Дробленков и др., 2018). Для верификации следа электрода и регистрации в прилежащем ядре делали фронтальный срез на уровне “Bregma +2.7 мм” согласно атласу. Далее продолжали иссекать срезы на протяжении 0.7–1 мм до той области переднего мозга, в которой прилежащее ядро занимает наибольшую площадь. В этой части мозга передняя комиссура смещалась к верхней медиальной части ядра, тогда как в его наиболее крупной средней области располагался след регистрирующего электрода для определения DA (рис. 3 (б)).

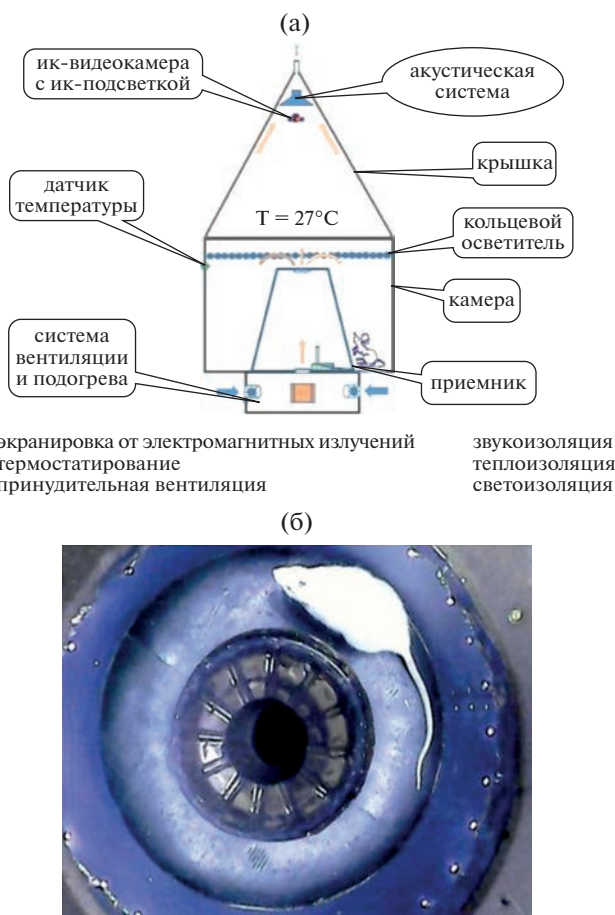


Рис. 2. Установка для тестирования в кольцевой камере. Примечание. (а) — схема установки; (б) — фотография установки (вид сверху).

Fig. 2. Installation for testing in the annular chamber. Note. A (a) — installation diagram; (б) — photo installations (top view).

Для статистической обработки полученных данных применяли программу GraphPad Prizm 8.1 (GraphPad Software, США). Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым использовали критерий нормальности Д'Агостино-Пирсона. Множественные межгрупповые сравнения зависимых выборок проводили с использованием критерия Фридмана, парные сравнения зависимых выборок — критерия Данна. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведено тестирование реакции самостимуляции в камере Скиннера. Общепринятым критерием формирования и стабилизации реакции самостимуляции у животных является показатель более 90–100 актов за де-

сятиминутный интервал (Шабанов и др., 2002). При значениях силы тока, пороговых для самостимуляции, в ряде случаев самораздражение сопровождалось специфическими поведенческими реакциями, включающими в себя элементы исследовательского, пищевого, питьевого и полового поведения. Пороговая для самостимуляции сила тока составляла от 54 до 88 мкА. В начале обучения подкреплялось инструментальное движение к педали, затем и само нажатие педали. Животные в ряде случаев не отходили от педали. Для повторного получения внутримозгового подкрепления животное должно было научиться отжимать педаль и снова ее нажимать. В первый день обучения число нажатий на педаль регистрировали каждые 2 мин тестирования. Число нажатий на педаль увеличивалось с 6-й мин по сравнению с первым двухминутным интервалом, однако число на-

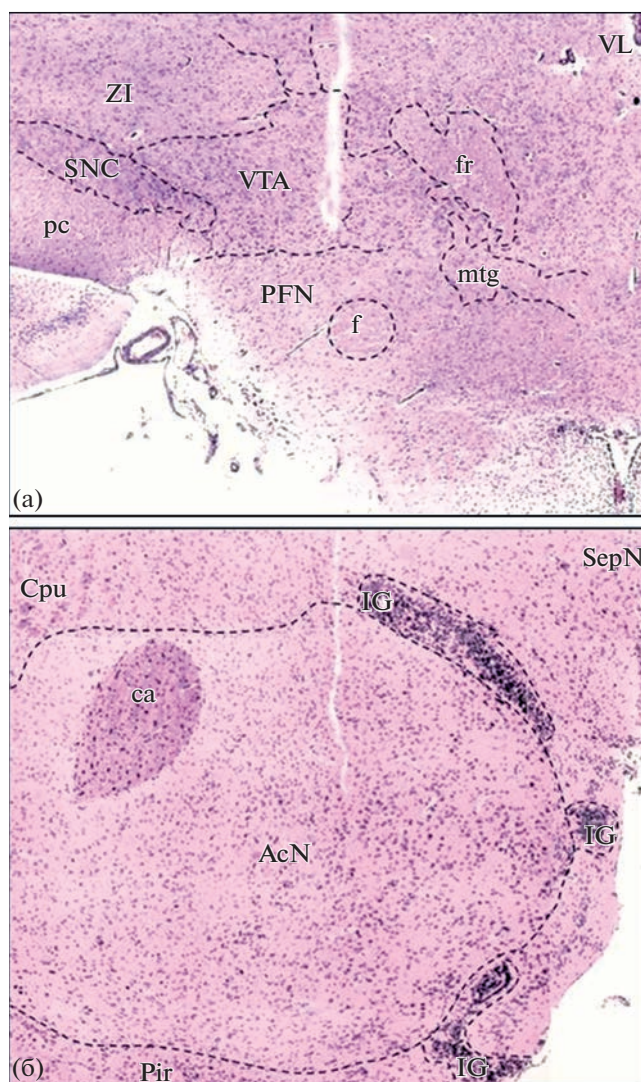


Рис. 3. Морфологический контроль следа электродов в головном мозге крыс: след электрода для стимуляции в ВОП на уровне Bregma -5.3 мм (а) и след тонкого электрода для регистрации в передней части прилежащего ядра на уровне Bregma $+2.7$ мм (б). Примечание. Обозначения к фотографии (а): VTA – комплекс ядер вентральной покрышки среднего мозга, SNC – компактная часть черной субстанции, ZI – зона инсерта, PFN – перифорникальное ядро, VL – боковой желудочек, ср – ножка мозга, f – свод, fr – fasciculus retroflexus, mtg – fasciculus mamillo- tegmental. Обозначения к фотографии (б): AcN – прилежащее ядро конечного мозга, Cpu – стриопаллидарный комплекс, IG – обонятельные ядра, Pir – грушевидная кора, SepN – ядра перегородки, ca – передняя спайка мозга. Окраска методом Ниссля, ок. $\times 10$, об. $\times 10$.

Fig. 3. Morphological control of the trace of electrodes in the brain of rats: the trace of the electrode for stimulation of the VTA at the level of Bregma -5.3 mm (a) and the trace of a thin electrode for recording in the anterior part of the nucleus accumbens at the level of Bregma $+2.7$ mm (b). Note. Labels for photo (a): VTA – nucleus complex of the ventral tegmentum of the midbrain, SNC – compact part of the substantia nigra, ZI – insert zone, PFN – perifornical nucleus, VL – lateral ventricle, cp – cerebral peduncle, f – fornix, fr – fasciculus retroflexus, mtg – fasciculus mamillo- tegmental. Labels for photo (b): AcN, nucleus accumbens, Cpu, striopallidar complex, IG, olfactory nuclei, Pir, piriform cortex, SepN, septal nuclei, ca, anterior commissure of the brain. Nissl staining, s, approx. $\times 10$, vol. $\times 10$.

жаний не достигало критерия обучения реакции самостимуляции (рис. 4 (а)). На 2-й день обучения производили преимущественно “отталкивания” животного от педали, после чего оно обучалось не только нажимать педаль, но и ее отжимать. Только на 3-й день

животные обучались нажимать на педаль и достигали критерия обучения. Число нажатий педали для получения внутримозгового подкрепления в камере Скиннера достоверно увеличивалось на 3-й день и 4-й день эксперимента по сравнению с первым днем. В 3-й день

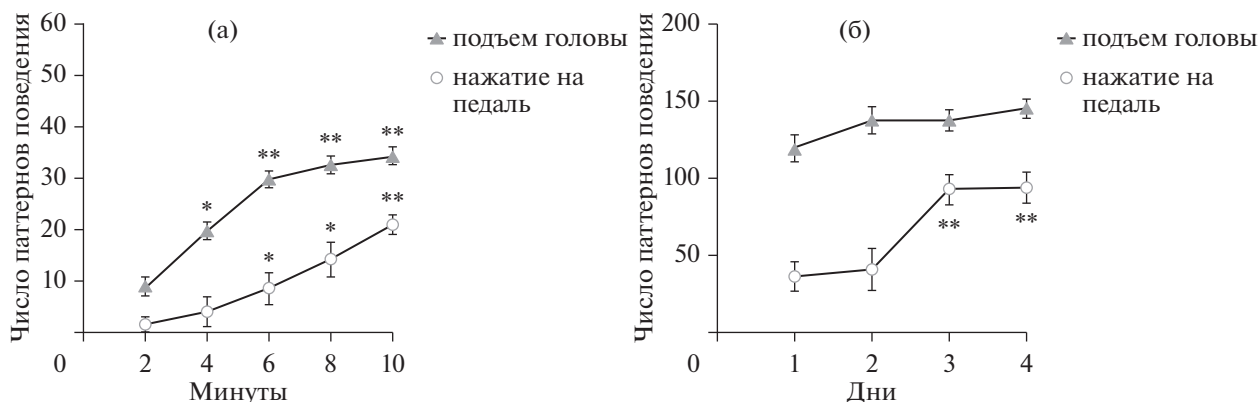


Рис. 4. Число нажатий на педаль и подъемов головы при обучении и стабилизации реакции самостимуляции в первый день тестирования (а) и последующие дни (б). Примечание: (а) показатели реакции самостимуляции за двухминутные интервалы тестирования. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – относительно 1-го двухминутного интервала; (б) показатели реакции самостимуляции с 1-го по 4-й день обучения, ** $p < 0.01$ – относительно 1-го дня.

Fig. 4. The number of pedal presses and the number of raising the head learning and stabilization of the self-stimulation reaction on the first day of testing (a) and subsequent days (b). Note: (a) the self-stimulation response scores over two-minute testing intervals * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – relative to the 1st two-minute interval; (b) the self-stimulation response scores from the 1st to the 4th day of training are presented ** $p < 0.01$ – relative to the 1st day.

тестирования число нажатий не отличалось от 4-го дня тестирования, что говорит о стабилизации реакции самостимуляции (рис. 4 (б)).

Проведено тестирование реакции самостимуляции в кольцевой камере. При значениях силы тока, пороговых для самостимуляции, в ряде случаев самораздражение сопровождалось специфическими поведенческими реакциями. Исследования показали, что пороговая для самостимуляции сила тока составляла от 45 до 75 мкА. При обучении подкреплялось инструментальное движение подъема головы. После подачи комплексного раздражителя (света и звука) животные проявляли ориентировочно-исследовательскую реакцию и поднимали голову на 38 градусов и более. Как только животное поднимало голову на 38 градусов, то получало стимуляцию зоны награды ВОП. Животные обучались поднимать и опускать голову для получения подкрепления в первый день эксперимента и достигали установленного критерия обучения. При первом же тестировании, которое длилось в течение 10 мин, животные обучались поднимать и опускать голову для самостимуляции. Число подъемов головы регистрировали за каждые 2 минуты тестирования. При данном методе самостимуляции для обучения животного не требовалось наличие периода “отгалкивания” от педали, как в случае с обучением в камере Скиннера. Уже в первый день обучения при тестировании наблюдалось повышение и стабилизация реакции самостимуляции. Число

подъемов головы к 6-й минуте тестирования увеличивалось в 3 раза по сравнению с показателями первого двухминутного интервала и выходило на плато. В последующие двухминутные интервалы измерения в первый день эксперимента число подъемов головы достоверно не изменялось (рис. 4 (а)). Повторное тестирование на 2, 3 и 4-й дни не увеличивало показатели реакции самостимуляции в кольцевой камере, что свидетельствует о стабилизации навыка (рис. 4 (б)).

В настоящей работе проведено измерение уровня внеклеточного ДА в прилежащем ядре у крыс в свободном поведении. Попытки зарегистрировать высвобождение ДА во время самой реакции самостимуляции в наших экспериментах выявило неотчетливую картину. В условиях свободного поведения интервалы между отдельными движениями головы при самораздражении сильно варьировали, от 0.1 до 10 с. В этих условиях отдельные реакции высвобождения ДА, по-видимому, накладывались друг на друга и давали неясную картину при регистрации вольтамперограмм. Отчетливые картины высвобождения ДА наблюдались только через 2 мин после серии самостимуляции. Поэтому в настоящих исследованиях мы стали подавать пачку импульсов (длительностью 0.5 с) с фиксированной силой тока и регистрировали вольтамперограмму ДА только через 2 мин после серии самостимуляции. Животным производили навязанную стимуляцию ВОП пачкой импульсов с параметрами самостимуляции че-

рез 2 мин после каждой из трех 10-минутных серий тестирования реакции самостимуляции и регистрировали вольтамперограмму.

Первую регистрацию уровня ДА проводили до начала самостимуляции ВОП. Навязанная стимуляция ВОП вызывала увеличение содержания внеклеточного ДА, характеризующееся увеличением силы тока на сенсорном электроде до 7.95 ± 0.81 нА при напряжении $+0.65$ В во время сканирующего импульса (рис. 5 (а)). Электростимуляция зоны ВОП вызывала последовательное снижение уровня внеклеточного ДА после каждой серии самостимуляции (рис. 5 (б, в, г)). Таким образом, снижение количества секретируемого ДА отражает истощение внутриклеточного пула нейромедиатора в процессе длительной самостимуляции ВОП.

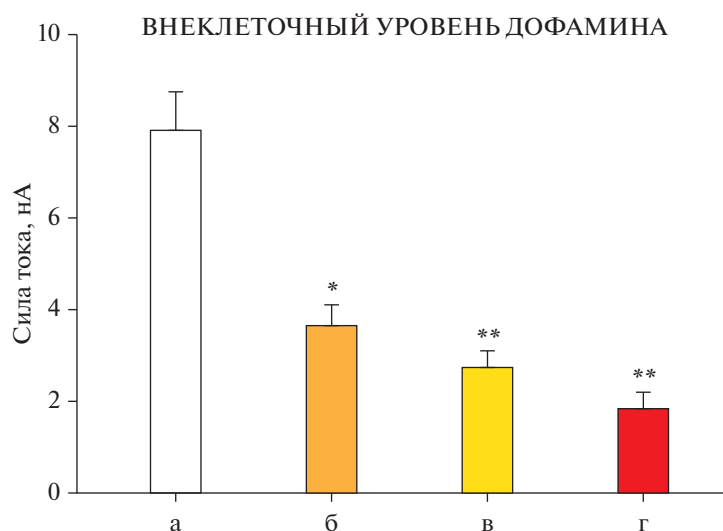
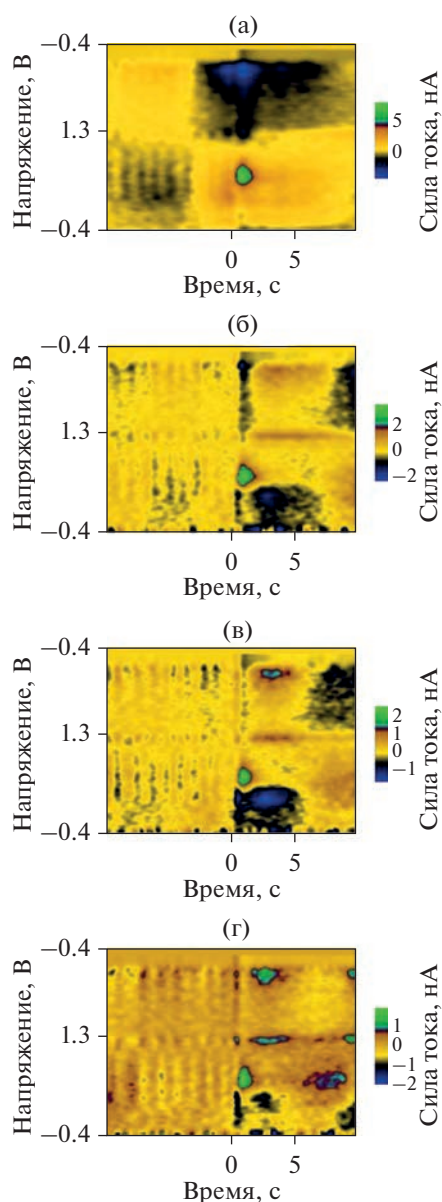
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, в работе было проведено сравнительное исследование классического педального метода самостимуляции в камере Скиннера и метода “подъема головы” в кольцевой камере. Идея о том, что в основе образования инструментальных условных рефлексов лежит механизм “мотивации привлекательностью” (“incentive salience attribution”), была высказана еще И.П. Павловым (Павлов, 1951). Он предположил, что в основе выработки условных рефлексов второго типа (инструментальных условных рефлексов) лежит ассоциация между проприоцептивным сигналом от выполняемого движения и пищевым безусловным стимулом. В начале обучения реакции самостимуляции в камере Скиннера в наших опытах подкреплялось инструментальное движение, направленное к педали, а затем и само нажатие педали. Как правило, только на 2-й день обучения после “отталкивания” животного от педали оно обучалось не только нажимать педаль, но и ее отжимать. К стабилизации выработанного навыка нажатия на педаль приступали, как правило, только на 3-й день обучения. При сравнении числа нажатий педали для получения внутримозгового подкрепления в камере Скиннера в первые два дня обучения и в последующие дни эксперимента оказалось, что число нажатий увеличивалось к 3-му дню и держалось на том же уровне в 4-й день тестирования (рис. 4 (б)).

Преимущество метода “подъема головы” заключалось в том, что реакцию самостимуляции можно было выработать быстро, в течение

первых минут исследования. Животные уже в первый день тестирования обучались поднимать и опускать голову для получения подкрепления и достигали установленного критерия обучения, при этом не требовалось наличие периода “отталкивания”, как в случае с обучением в камере Скиннера. Уже в первый день обучения при тестировании наблюдалось повышение и стабилизация реакции самостимуляции (рис. 4 (а)). В последующие дни (во 2, 3 и 4-й дни от начала обучения) достоверных отличий по частоте самостимуляции от 1-го дня не наблюдалось (рис. 4 (б)). Возникает вопрос, почему скорость выработки и время стабилизации реакции самостимуляции значительно меньше при использовании в качестве условного сигнала изменения позы при подъеме головы в отличие от классической камеры Скиннера с педалью? Ответ можно дать исходя из анализа внешних и внутренних факторов, сопровождающих процесс выработки и стабилизации инструментальной условной реакции самостимуляции.

Во-первых, это связано с отличиями в самой структуре условного рефлекса на изменение позы. Выработка инструментальных условных рефлексов, как известно, сопровождается образованием ряда временных связей, как классического, так и инструментального характера. Известно, что выработка инструментальных условных рефлексов происходит быстрее, чем классических (Лебедев и др., 2022). При выработке инструментального условного рефлекса цель движения (внешняя — педаль для самостимуляции или внутренняя — поза) на основе павловского ассоциативного механизма становится привлекательной и приобретает побудительное значение (“incentive salience attribution”) (Майоров, 2018). В то же время “внешняя или внутренняя цели движения”, по-видимому, имеют разное значение для образования характера временных связей, как внутримозговых эквивалентов условного инструментального рефлекса. В то время как первая в большей степени связана с включением классической (павловской) временной связи, вторая, внутренняя, имеет преимущественно инструментальную основу. Изменение позы подъема головы в нашем случае является внутренним проприоцептивным условным сигналом. При изучении реакции самостимуляции в кольцевой камере отсутствует педаль как внешний объект для инструментального поведения, где время для обучения ее нажатия (и отжатия)



не требуется. Как было описано во введении, ранее уже использовали для самостимуляции контактное устройство, установленное на голове крысы, которое замыкало цепь, когда животное касалось пластины над головой. Реакция подъема головы до пластины, описанная в данной работе, на первый взгляд очень сходна с методикой самостимуляции в кольцевой камере. В то же время сама пластина над головой является дополнительным внешним объектом для инструментального поведения и больше напоминает педаль, что, в свою очередь, может увеличивать время обучения и стабилизации навыка. Таким образом, наличие только

внутреннего проприоцептивного сигнала изменения позы в кольцевой камере (без дополнительного внешнего сигнала — педали или пластины над головой) вызывает увеличение скорости обучения и стабилизации реакции самостимуляции.

Во-вторых, скорость выработки и время стабилизации реакции самостимуляции в кольцевой камере связано также и с повышением степени адекватности раздражителей, отмеченное И.П. Павловым при изучении условных рефлексов. Подкрепляющая электрическая стимуляция в кольцевой камере вызывала, как правило, интенсивную ориентировочно-исследовательскую реакцию по-

Рис. 5. Кинетика изменения внеклеточного уровня ДА в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию зоны вентральной области покрышки до и после трех последовательных 10-минутных серий самостимуляции ($n = 5$). Примечание. На цветных панелях показан набор циклических вольтамперограмм, записанных за 10-секундный интервал до и после трех последовательных 10-минутных серий самостимуляции (5 (а, б, в, г)). По оси ординат отложен потенциал, приложенный на сенсорный электрод во время каждой вольтамперограммы, по оси абсцисс – время, в которое она была записана, а текущие изменения электрического тока закодированы цветом. ДА представлен во время стимуляции при +0.65 В (пик окисления, закодирован зеленым цветом). Цветовая шкала отражает величину изменения электрического тока: (5а) – до 8 нА, (5б) – до 3.7 нА, (5в) – до 2.5 нА, (5г) – до 1.8 нА. На графике представлена величина силы тока при +0.65 В на сенсорном электроде, отражающая уровень внеклеточного ДА в прилежащем ядре в процессе последовательных серий самостимуляции (среднее и стандартная ошибка средней). (а) – уровень внеклеточного ДА перед началом серий самостимуляций, (б) – уровень внеклеточного ДА после первой серии самостимуляции, (в) – уровень внеклеточного ДА после второй серии самостимуляции, (г) – уровень внеклеточного ДА после третьей серии самостимуляции. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ относительно величины, зарегистрированной перед самостимуляцией.

Fig. 5. Kinetic of changes in the DA extracellular level in the nucleus accumbens in response to electrical stimulation of the ventral tegmental area before and after three consecutive 10-minute series of self-stimulation ($n = 5$). Note: The color panels show a set of cyclic voltammograms recorded over a 10-s interval before and after three consecutive 10-min self-stimulation series (5 (a, b, v, r)). The y-axis shows the potential applied to the sensor electrode during each voltammogram, the abscissa shows the time at which it was recorded, and the current changes in electric current are color-coded. Dopamine is present during stimulation at +0.65 V (oxidation peak, coded in green). The color scale reflects the magnitude of the electric current change: (5a) – up to 8 nA, (5b) – up to 3.7 nA, (5v) – up to 2.5 nA, (5r) – up to 1.8 nA. The graph shows the magnitude of the current at +0.65 V on the sensor electrode, reflecting the level of extracellular dopamine in the nucleus accumbens during successive series of self-stimulation (mean and standard error of the mean). (a) – extracellular dopamine level before the start of self-stimulation series, (б) – extracellular dopamine level after the first self-stimulation series, (в) – extracellular dopamine level after the second self-stimulation series, (r) – extracellular dopamine level after the third self-stimulation series. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ relative to the value, recorded before self-stimulation.

искового характера, когда положение головы быстро изменялось при обнюхивании окружающего пространства. В это время положение головы животного достигало требуемого значения (подъема на 38 градусов) для включения подкрепляющего электрического стимула зоны награды. В данном случае мы имеем дело с проявлением естественных движений обнюхивания, которые обычно наблюдаются при стимуляции положительных подкрепляющих зон головного мозга у крыс. Эти движения генетически детерминированы и необходимы для осуществления территориального и внутривидового поведения у грызунов (Lebedev et al., 2020). Под адекватностью условного и безусловного раздражителей, как одного из правил образования условного рефлекса, И.П. Павлов понимал прежде всего органическое соединение системы восприятия и движения животного с конкретными условиями и задачами эксперимента. Исследование самостимуляции в кольцевой камере в большей степени отвечает критериям адекватности, чем при обучении нажатия педали в камере Скиннера. Подкрепляющая электрическая стимуляция при обучении реакции самостимуляции в камере Скиннера обычно также вызывает интенсивную ориентировочно-исследовательскую реакцию

поискового характера, когда положение головы быстро изменяется при обнюхивании окружающего пространства. Однако искусственные условия наличия педали в камере Скиннера снижают критерий адекватности условного раздражителя. В связи с этим реакцию самостимуляции уже к 80–90-м годам многие исследователи стали считать искусственным феноменом, не отражающим реальную картину интегративного эмоционального ответа организма (Negus, Miller, 2014). Первоначально в опытах Дж. Олдса было сделано наблюдение естественного поведения, когда животные возвращались в то место, где производилась стимуляция мозга (Симонов, 1980). В “двухплатформенном” тесте, разработанном Валенштейном, животные, выходя на одну платформу, вызывали стимуляцию мозга. Как правило, платформа со стимуляцией чередовалась с платформой без стимуляции (Liebman, 1983). В наших исследованиях также регистрировали поведение крыс в челночной камере, когда чередовались площадка со стимуляцией с площадкой без стимуляции (Petrov, Lebedev, 1997). Таким образом, использование метода “подъема головы” в круговой камере, когда педаль отсутствует, больше связано с естественным видовым поведением и

удовлетворяет критерию адекватности при образовании условного рефлекса.

В настоящей работе проведено тестирование реакции самораздражения ВОП с использованием телеметрии и определения уровня внеклеточного ДА в прилежащем ядре у крыс в свободном поведении. На основе анализа литературных данных и собственных наблюдений мы пришли к выводу о том, что при самораздражении более целесообразно определять изменение уровня ДА в ответ на навязанную стимуляцию структуры мозга. Попытки зарегистрировать высвобождение ДА во время самой реакции самостимуляции в наших экспериментах выявило неотчетливую картину. В условиях свободного поведения интервалы между отдельными нажатиями педали (в нашем случае движения головы при самораздражении), как правило, сильно варьируют, от 0.1 до 10 с. В этих условиях отдельные реакции высвобождения ДА в ответ на последовательные нажатия педали могут накладываться друг на друга и давать неясную картину при регистрации вольтамперограмм. Поэтому в настоящих исследованиях подавали пачку импульсов (длительностью 0.5 с) с фиксированной силой тока и регистрировали вольтамперограмму в перерывах между сериями самостимуляции. Установлено снижение уровня внеклеточного ДА в прилежащем ядре при длительной самостимуляции ВОП. Данное снижение высвобождения ДА из дофаминергических терминалей отражает истощение внутриклеточного пула нейромедиатора в процессе длительной самостимуляции ВОП. В ряде работ физическое высвобождение ДА также регистрировалось лишь в начале серии самораздражения (Rodeberg et al., 2016), а в течение продолжительной серии тестирования самостимуляции в режиме FR1 оно снижалось (Cheer et al., 2004). С другой стороны, в режиме FR8 (когда подкрепляется только каждое 8-е нажатие педали, т.е. увеличивается время между подачей подкрепления и регистрацией внеклеточного ДА) появлялась возможность регистрации высвобождения ДА в процессе самостимуляции (Yavich, Tiuhonen, 2000).

Таким образом, полученные в настоящих исследованиях данные говорят о перспективе использования способа обучения крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы в телеметрической установке, регистрирующей уровень внеклеточного дофамина. В перспективе данный способ может быть

также использован для изучения аддиктивных свойств фармакологических средств в сочетании с определением уровня внеклеточного ДА.

ВЫВОДЫ

1. Реакция самостимуляции при нажатии на педаль в камере Скиннера по времени выработки и стабилизации уступает методу, когда подкрепление подается при подъеме головы. Это связано со структурой вырабатываемого рефлекса и адекватностью раздражителей.

2. Для исследования механизмов подкрепления при самораздражении целесообразно регистрировать и анализировать повышение уровня ДА в ответ на навязанную стимуляцию области мозга, при стимуляции которой наблюдается и реакция самораздражения.

3. Для изучения механизмов внутримозгового подкрепления при самостимуляции использование способа обучения крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы в телеметрической установке, регистрирующей уровень внеклеточного дофамина, является перспективным.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (шифр: FGWG-2022-0032).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Ефимов Н.С., Крюков А.С., Карпова И.В., Пюрвеев С.С., Дробленков А.В., Шабанов П.Д. Особенности вовлечения дофаминергической и серотонинергической систем мозга в положительные и отрицательные эмоциональные состояния у крыс. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2020. 18 (2): 123–130.
- Дробленков А.В., Федоров А.В., Шабанов П.Д. Структурные особенности дофаминергических ядер вентральной покрышки среднего мозга. Наркология. 2018. 17 (3): 41–45.
- Лебедев А.А., Русановский В.В., Лебедев В.А., Шабанов П.Д. Нейрофизиология. Москва–Берлин: ООО “Директ-Медиа”. 2022. 270 с.
- Майоров В.И. Функции дофамина в инструментальном условном рефлексе. Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. 68м (4): 404–414.

- Мухин В.Н., Боровец И.Р., Сизов В.В., Павлов К.И., Клименко В.М. В-амилоид и литий влияют на величину фазических выбросов дофамина в оболочке прилежащего ядра. Журн. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2020. 70 (4): 488–499.
- Павлов И.П. Полное собрание сочинений. АН СССР. – Изд. 2-е, доп. М.: Изд-во АН СССР, 1951–1954. Т. 3, кн. 1: [Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей нервной деятельности (поведения)].
- Пюреев С.С., Сизов В.В., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Мухин В.Н., Дробленков А.В., Шабанов П.Д. Регистрация изменений уровня внеклеточного дофамина в прилежащем ядре методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии при стимуляции зоны вентральной области покрышки, раздражение которой вызывает и реакцию самостимуляции. Российский физиологический журн. им. И.М. Сеченова. 2022. 108 (10): 1316–1328.
- Симонов П.В. Эмоциональный мозг. М.: Наука, 1980.
- Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мещеров Ш.К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. СПб.: Лань, 2002.
- Cheer J.F. Wassum K.M. Heien M.L. Phillips P.E. Wightman R.M. Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J. Neurosci.* 2004. 24 (18): 4393–4400.
- Fakhoury M., Rompré P.P. Intracranial self-stimulation and the curve-shift paradigm: a putative model to study the brain reward system. in *The Brain Reward System*, ed. Fakhoury M. (New York, NY: Humana;) 2021. 165: 3–20.
- Fouriez G., Randall D. The cost of delaying rewarding brain stimulation. *Behav. Brain Res.* 1997. 87 (1): 111–113.
- Ide S., Takahashi T., Takamatsu Y., Uhl G.R., Niki H., Sora I., Ikeda K. Distinct Roles of Opioid and Dopamine Systems in Lateral Hypothalamic Intracranial Self-Stimulation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017. 20 (5): 403–409.
- Lebedev A.A., Bessolova Yu.N., Efimov N.S., Bychkov E.R., Drobленков A.V., Shabanov P.D. Role of orexin peptide system in emotional overeating induced by brain reward stimulation in fed rats. *Research Results in Pharmacology.* 2020. 6 (1): 81–91.
- Liebman J.M. Discriminating between reward and performance: a critical review of intracranial self-stimulation methodology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1983. 7 (1): 45–72.
- Mena S., Visentin M., Witt C.E., Honan L.E., Robins N., Hashemi P. Novel, User-Friendly Experimental and Analysis Strategies for Fast Voltammetry: Next Generation FSCAV with Artificial Neural Networks. *ACS Meas. Sci. Au.* 2022. 2 (3): 241–250.
- Negus S.S., Miller L.L. Intracranial self-stimulation to evaluate abuse potential of drugs. *Pharmacol. Rev.* 2014. 66 (3): 869–917.
- Pallikaras V., Shizgal P. Dopamine and beyond: implications of psychophysical studies of intracranial self-stimulation for the treatment of depression. *Brain Sci.* 2022. 12 (8): 1052.
- Panagis G., Vlachou S., Higuera-Matas A., Simon M. Editorial: neurobehavioral mechanisms of reward: theoretical and technical perspectives and their implications for psychopathology. *Front. Behav. Neurosci.* 2022. 5; 16: 967922.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005. 207 с.
- Petrov E.S., Lebedev A.A. Dopamine and the reinforcing system of the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* 1997. 27 (3): 309–311.
- Rodeberg N.T., Johnson J.A., Bucher E.S., Wightman R.M. Dopamine dynamics during continuous intracranial self-stimulation: effect of waveform on fast-scan cyclic voltammetry data. *ACS Chem. Neurosci.* 2016. 7 (11): 1508–1518.
- Rothman R.B., Baumann M.H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 2003. 479 (1–3): 23–40.
- Solomon R.B., Conover K., Shizgal P. Valuation of opportunity costs by rats working for rewarding electrical brain stimulation. *PLoS One.* 2017. 12 (8): e0182120.
- Trujillo-Pisanty I., Conover K., Solis P., Palacios D., Shizgal P. Dopamine neurons do not constitute an obligatory stage in the final common path for the evaluation and pursuit of brain stimulation reward. *PLoS One.* 2020. 15 (6): e0226722.
- Velazquez-Martinez D.N., Pacheco-Gomez B.L., Toscano-Zapien A.L., Lopez-Guzman M.A., Velazquez-Lopez D. On the Similarity Between the Reinforcing and the Discriminative Properties of Intracranial Self-Stimulation. *Front. Behav. Neurosci.* 2022. 16: 799015.
- Yavich L., Tiuhonen J. Patterns of dopamine overflow in mouse nucleus accumbens during intracranial self-stimulation. *Neurosci. Lett.* 2000. 293 (1): 41–44.

METHOD FOR TRAINING ELECTRICAL SELF-STIMULATION IN RESPONSE TO HEAD ELEVATION IN RATS BY A TELEMETRY SYSTEM THAT REGISTERS EXTRACELLULAR DOPAMINE LEVELS

V. V. Sizov^a, A. A. Lebedev^{a, #}, S. S. Pyurveev^{a, b}, E. R. Bychkov^{a, c},
V. N. Mukhin^a, A. V. Drobenkov^a, and P. D. Shabanov^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

^b*St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^c*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru*

In this work, we propose a method for training rats electrical self-stimulation in response to rearing head in a telemetric system that records the level of extracellular dopamine. Initially, in the experiments of J. Olds, it was shown that in response to electrical stimulation of zones of positive reinforcement, rats exhibit natural exploratory behavior aimed at finding the source of the reward. It has been suggested that a natural behavioral act, in particular rearing head, can accelerate the development and stabilization of the self-stimulation reaction. A change in the position of the head can serve as an internal proprioceptive conditioned signal. The experiments were carried out in an annular chamber, where the ventral tegmental area (VTA) was stimulated using a telemetric system when the rat's head was raised by 38°. The self-stimulation response to rearing head was developed and stabilized during the first day of training. With pedal self-stimulation, distinct repetitive reactions were observed only on the 3rd day of training after the procedures of "pushing" on the pedal on the 1st day of training and "repulsing" from the pedal on the 2nd day of training, stabilization of the reaction was observed only by the 4th day training. After stabilization of the self-stimulation response in rats, the level of extracellular dopamine in the nucleus accumbens was recorded by fast-scan cyclic voltammetry in response to the imposed stimulation of the VTA before and after each of the three series of self-stimulation lasting 10 minutes. After each series of self-stimulation, the level of extracellular dopamine decreased, which reflects the depletion of the intracellular pool of the neurotransmitter during prolonged self-stimulation of the VTA. The conclusion is made about the prospects of using the method of training rats to electrical self-stimulation in response to rearing head to study the mechanisms of reinforcement.

Keywords: self-stimulation, extracellular dopamine level, fast-scan cyclic voltammetry, nucleus accumbens