

Научная статья

УДК 14.03.06

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2025-22-3-29-36>

Сравнительный анализ содержания биогенных аминов в мозге *Danio rerio* (Zebrafish) и в различных структурах мозга крыс

Е.С. Рудаскова , Б.В. Козловский, О.Ю. Муха, Л.И. Лащенко, Т.П. Кокорева, Ю.К. Исаева, И.Д. Чиркасов

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Определение биогенных аминов в биологических материалах животных необходимо при оценке эффектов и механизмов действия новых психотропных препаратов. Наиболее популярным методом для решения фармакодинамических задач является определение биогенных аминов и их метаболитов в различных структурах головного мозга белых беспородных крыс. В мозговых структурах *Danio rerio* (Zebrafish) биогенные амины и их метаболиты так же хорошо определяются, как и в различных структурах мозга крыс, поэтому данную модель можно использовать для проведения исследования различных поведенческих реакций, для моделирования стресса новизны и экспериментальной депрессии.

Ключевые слова: биогенные амины, *Danio rerio* (Zebrafish), модельный объект, метод количественного определения, фармакокинетика, высокоэффективная жидкостная хроматография

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2025-22-3-29-36>

Comparative analysis of biogenic amines in the brain of *Danio rerio* (Zebrafish) and in various structures of the rat brain

E.S. Rudaskova , B.V. Kozlovski, O.Yu. Mukha, L.I. Lashhenova, T.P. Kokoreva, Yu.K. Isaeva, I.D. Chirkasov

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Determination of biogenic amines in biological materials of animals is necessary for assessing the effects and mechanisms of action of new psychotropic drugs. The most popular method for solving pharmacodynamic problems is the determination of biogenic amines and their metabolites in various brain structures of white outbred rats. In the brain structures of *Danio rerio* (Zebrafish), biogenic amines and their metabolites are as well determined as in various brain structures of rats, so this model can be used to study various behavioral reactions, to model novelty stress and experimental depression.

Keywords: Biogenic amines, *Danio rerio* (Zebrafish), model object, quantitative determination method, pharmacokinetics, high-performance liquid chromatography

Моноаминергические системы мозга играют ключевую роль в регуляции широкого спектра физиологических и поведенческих функций [1, 2]. Нарушения передачи сигналов в рамках этих систем ассоциируются с различными неврологическими и психиатрическими расстройствами, включая депрессию, шизофрению и болезнь Паркинсона [3, 4, 5, 6]. Количественное определение моноаминов и их метаболитов в различных структурах мозга является ценным инструментом для понимания механизмов патологических состояний, разработки новых терапевтических стратегий, а также для оценки фармакологического действия психотропных препаратов.

Особый интерес представляет изучение региональных особенностей распределения биогенных аминов в отделах центральной нервной системы, таких как мозжечок, гиппокамп, медиальная префронтальная кора (мПФК),

полосатое тело и другие подкорковые структуры. Эти области характеризуются специфическими паттернами моноаминергической иннервации и дифференциальной экспрессией транспортеров и рецепторов, что определяет их уникальную роль в регуляции когнитивных, эмоциональных и двигательных функций [7, 8]. Изменения содержания моноаминов в этих структурах могут отражать как физиологические адаптивные процессы, так и патологические состояния нервной системы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектированием является высокоспецифичным методом анализа катехоламинов (норадреналин, дофамин), индоламинов (серотонин) и их основных метаболитов в биологических образцах [9]. Этот метод основан на способности моноаминов к флуоресценции после их химической деривации.

ватизации, что обеспечивает высокую селективность и чувствительность при анализе микрообъемов ткани мозга. Полученные данные открывают новые возможности для исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе нервных дисфункций, и создают фундамент для дальнейших разработок в области диагностики и терапии.

В доклинических исследованиях лекарственных препаратов в последние годы достаточно широко применяется модельный объект *Danio rerio* (Zebrafish). *Danio rerio* (Zebrafish) – маленькая пресноводная тропическая рыбка, населяющая преимущественно реки и ручьи Пакистана, Индии, Бангладеша, Непала, Мьянмы и Бутана.

В настоящее время достоверно известно, что тропические рыбки *Danio rerio* (Zebrafish) имеют ряд преимуществ по сравнению с различными представителями данного класса и даже другими лабораторными животными, в частности грызунами. Это связано с морфологическими, физиологическими, биохимическими, генетическими и эмбриологическими особенностями тропических рыб, а также экономическими выгодами и небольшими временными затратами на их разведение [4].

Главными достоинствами этой рыбки является наличие прозрачного эмбриона, который позволяет в полной мере наблюдать стадии эмбриогенеза, изучать тератогенное, канцерогенное и другие влияния различных химических и лекарственных веществ на *Danio rerio*. Помимо этого, Zebrafish обладает высокой плодовитостью и быстрым периодом созревания эмбрионов. Через 3 дня после оплодотворения у него начинает функционировать сердце, кровеносная и нервная системы. На четвертые сутки происходит формирование малька, способного к самостоятельному питанию и движению. Эта особенность позволяет ускорить процесс исследования и минимизировать затраты в виде средств и времени [1, 4].

Также стоит отметить, что на настоящее время проведено детальное изучение генома *Danio rerio*. Отмечается, что у Zebrafish имеется 70 % гомологии с геномом человека, что позволяет их использовать как прекрасную модель для генетических исследований [1].

Сходные биохимические процессы с млекопитающими вновь подтверждают целесообразность использования *Danio rerio* как модели доклинических исследований.

Большой интерес представляет использование Zebrafish в качестве опытной модели для постановки поведенческих реакций, стресса новизны и экспериментальной депрессии с последующим воздействием препаратов разных фармакологических групп [1, 2, 3].

В связи с этим можно считать, что использование модели *Danio rerio* в различных направлениях доклинических исследований – токсикологических, фармакологических, эмбриологических и др., достаточно перспективно и данная модель может использоваться

в тестировании фармакологических препаратов прежде, чем они будут исследоваться на других моделях, в частности млекопитающих [1, 2, 4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнение базальных концентраций биогенных аминов в мозговых структурах крыс и *Danio rerio* (Zebrafish).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 8 белых беспородных крысах-самцах (возраст 5–6 месяцев, масса тела 220–260 г) и 10 тропических рыбках *Danio rerio* (Zebrafish). Крысы выведены в условиях вивария Научного центра инновационных лекарственных средств ВолГМУ. Животные содержались в стандартных условиях с 12-часовым световым режимом и свободным доступом к пище и воде. Рыбы *Danio rerio* были получены из коммерческого источника (ИП Парусов, Волгоград, Россия) и в течение 14 дней акклиматизировались в лаборатории. Тропические рыбки содержались в аквариуме объемом 25 л, режим свет/темнота – 12/12 ч, температура воды – 25–26 °С, кормление 2 раза в день хлопьевидным кормом Tetra Water Mix.

Все процедуры проводились в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза, и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (справка № 2024/221 от 03.04.2024).

Эвтаназию крыс проводили методом цервикальной дислокации, после чего извлекали мозг и помещали на охлажденную стеклянную пластину, расположенную на льду, для предотвращения постмортальных изменений. Для выделения мозжечка (1-я проба) мозг первоначально располагали дорсальной стороной вниз, поднимали продолговатый мозг и мост, удаляли белое вещество, после чего переворачивали мозг дорсальной стороной вверх. Мозжечок отделяли от нижнего двухолмия, удаляя оставшиеся части моста. Гиппокамп (2-я проба) выделяли, раздвигая полушария мозга, начиная с каудального края, чтобы обнажить мозолистое тело. Под ним идентифицировали гиппокамп как изогнутую серовато-прозрачную структуру медиальной части полушарий, которую аккуратно отделяли от прилегающей коры. Для выделения мПФК (3-я проба) сначала выполняли отсечение обонятельных луковиц. Затем из первого коронарного среза, выполненного на уровне переднего форцепса мозолистого тела, выделяли медиальную префронтальную кору, которая идентифицировалась как темная область между мозолистым телом и более светлыми участками окружающей коры. Ее извлекали в форме ромба, исключая материал переднего форцепса мозолистого

тела. Полосатое тело (4-я проба) извлекали из следующих коронарных срезов.

На первом срезе вентральный полосатое тело определяли как темную структуру под мозолистым телом, окруженную более светлой корой и передним форцепсом мозолистого тела. На втором срезе различали как вентральное, так и дорсальное полосатое тело, которые имели темную окраску, выделяющуюся на фоне окружающих тканей. На третьем срезе дорсальное полосатое тело выделяли, ориентируясь на его границы с мозолистым телом, капсулой и перегородкой. Глубокие структуры мозга, включая таламус, гипоталамус и средний мозг, выделяли из центральных областей вентральной поверхности, ориентируясь на их расположение относительно стриатума и мозолистого тела (5-я проба).

Эвтаназию *Danio rerio* проводили путем погружения в ледяную воду (+1–2 °C) на 15–20 с [5]. Далее рыбку фиксировали на льду с помощью пинцета, маленькими ножницами производили отсечение головной части на уровне грудных плавников, затем извлекали череп. Головной мозг извлекали препаровальной иглой и пинцетом после надреза черепа с вентральной стороны.

Для анализа подготавливали 20%-е гомогенаты мозговых структур в растворе 0,1 Н HClO₄, используя гомогенизатор Silent Crusher (Германия). Определение

концентрации биогенных аминов и их метаболитов осуществляли методом ВЭЖХ на хроматографической системе с флуоресцентным детектором Shimadzu (Япония), настроенной на длину волны экстинкции 280 нм и длину волны эмиссии 320 нм. Анализ проводился с использованием колонки Supelcosil LC-18 (5 мкм; 100 мм × 4,6 мм). В качестве подвижной фазы применяли смесь, состоящую из 5%-го ацетонитрила для ВЭЖХ (УФ 210 нм) (Россия) и 95%-го буферного раствора, содержащего 50 мМ однозамещенного фосфата калия с pH 3,0. Для калибровки использовали стандарты норадреналина (Sigma, США), допамина (Sigma, США), серотонина (Sigma, США) и его метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК, Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация метода количественного определения проводилась путем построения калибровочных графиков уравнения прямой по трем дням исследования для каждого из водных растворов стандарта (рис. 1–4). Водные растворы стандартов объединялись в одну пробу с близкими концентрациями. Для каждой из концентраций анализировалось по 5 параллельных разведений.

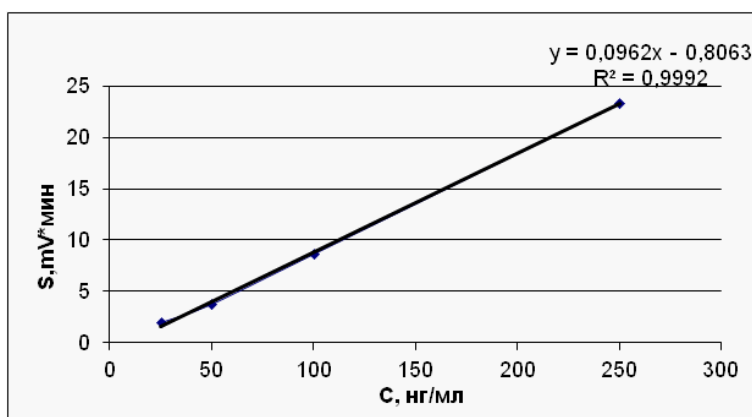


Рис. 1. Зависимость площади пика от концентрации норадреналина

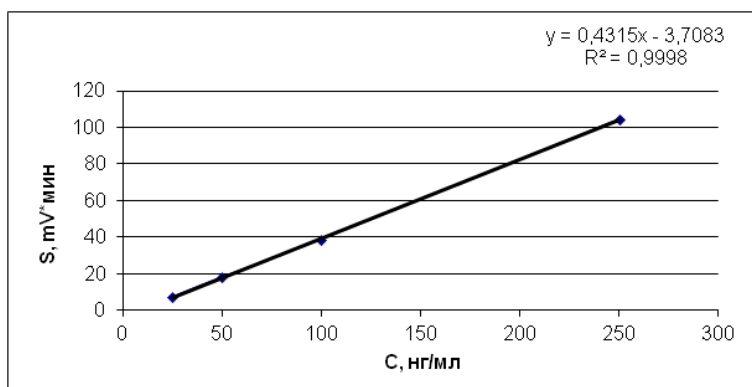


Рис. 2. Зависимость площади пика от концентрации серотонина

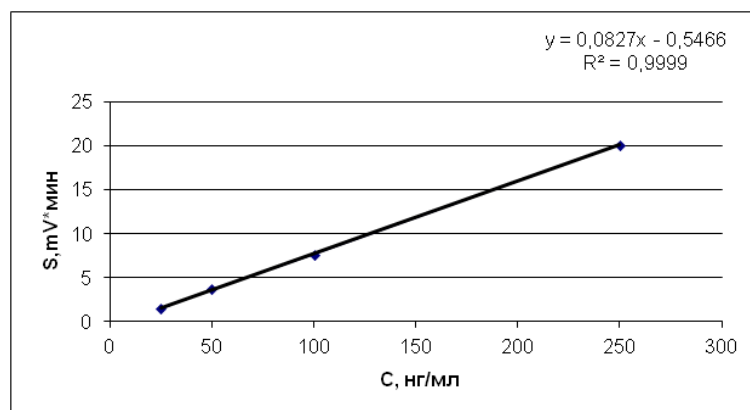


Рис. 3. Зависимость площади пика от концентрации ГИУ

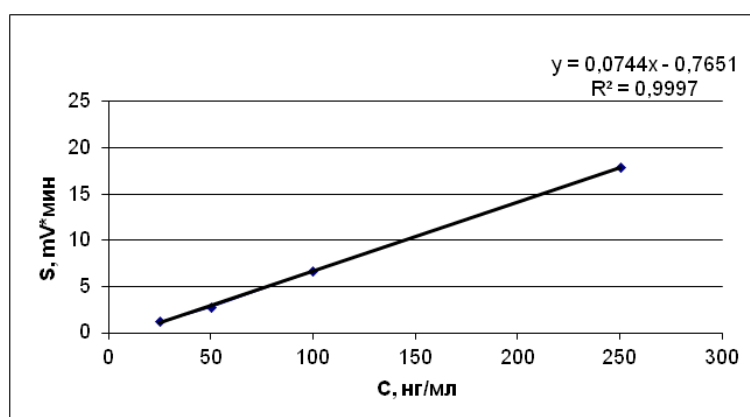


Рис. 4. Зависимость площади пика от концентрации допамина

Коэффициент достоверности аппроксимации близок к единице. Колебания концентраций находились в допустимом пределе ошибки измерения

(прецизионность составляет не более 15 %). Внутриведенные и междневные колебания также не превышали допустимых значений (рис. 5).

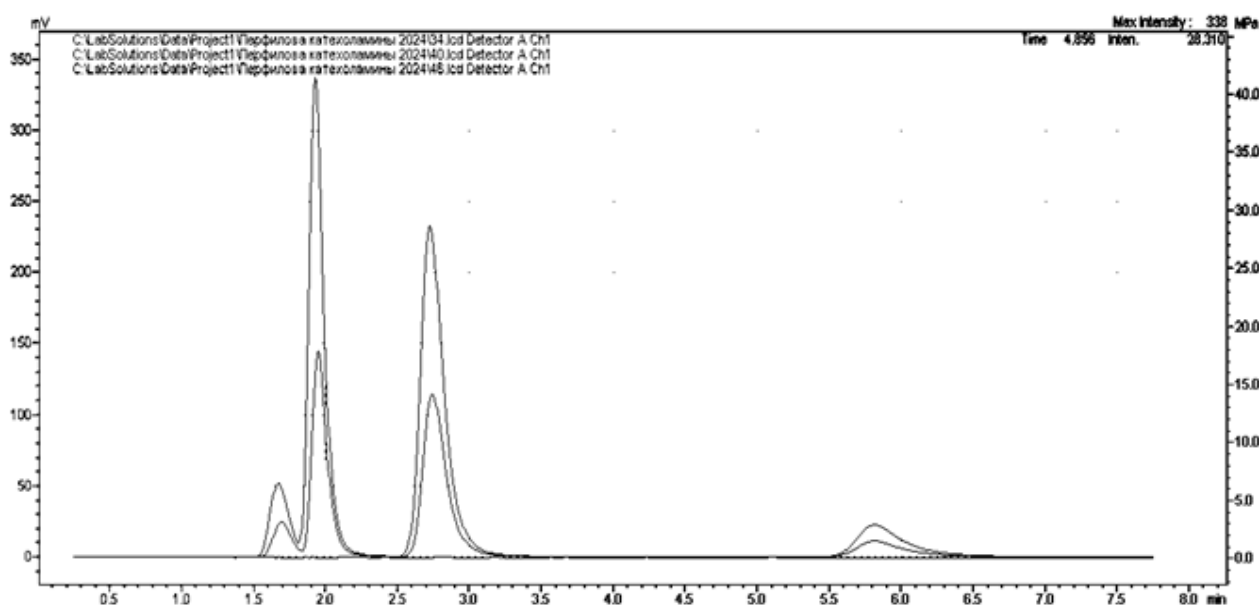


Рис. 5. Хроматограммы водных растворов стандартов допамина, норадреналина, серотонина и ГИУ в концентрациях от 10 до 100 нг/мл (наложение хроматограмм)

Были получены хроматограммы биологического фона проб различных отделов мозга крыс (рис. 6–10)

и мозговых структур *Danio rerio* (рис. 11), в которых определялись искомые моноамины.

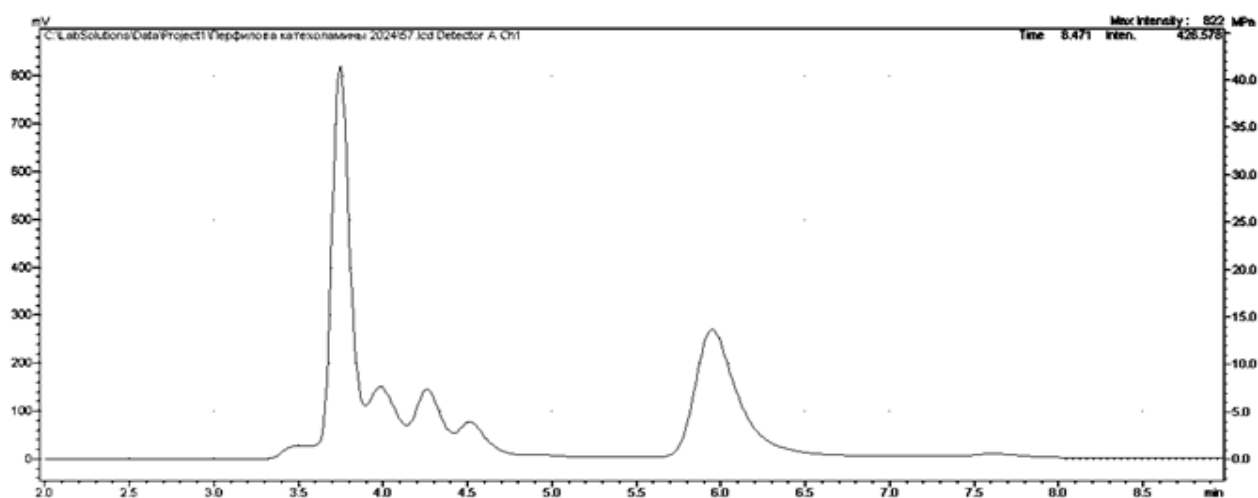


Рис. 6. Хроматограмма биологического фона мозжечка крыс

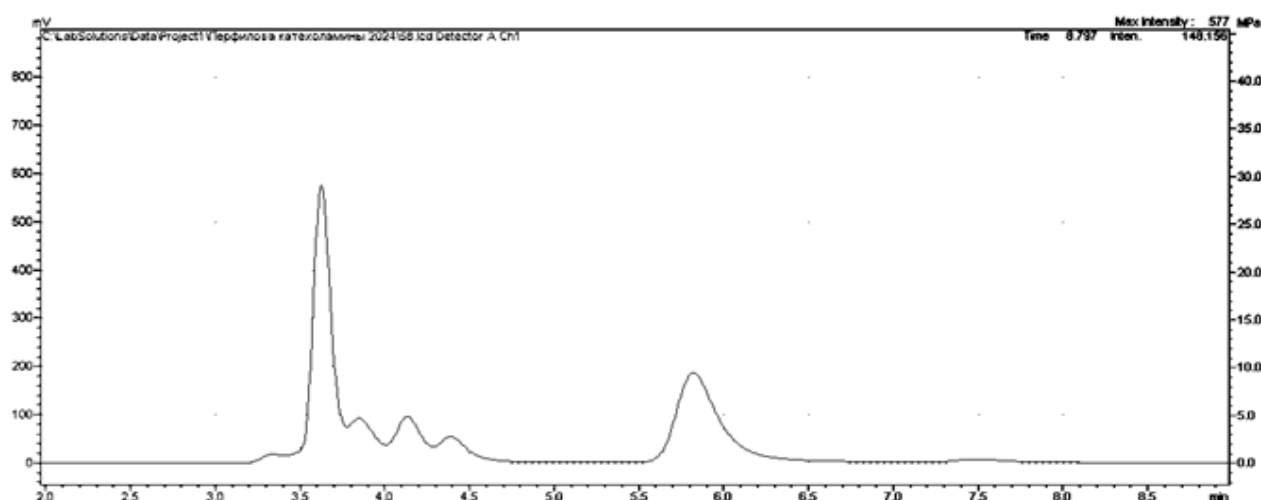


Рис. 7. Хроматограмма биологического фона гиппокампа крыс

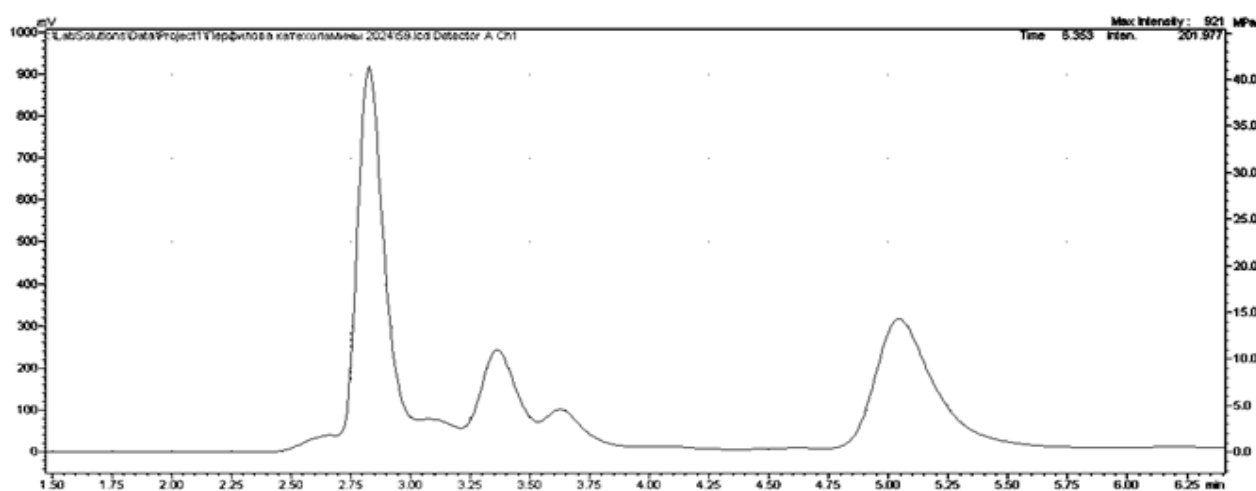


Рис. 8. Хроматограмма биологического фона префронтальной коры головного мозга крыс

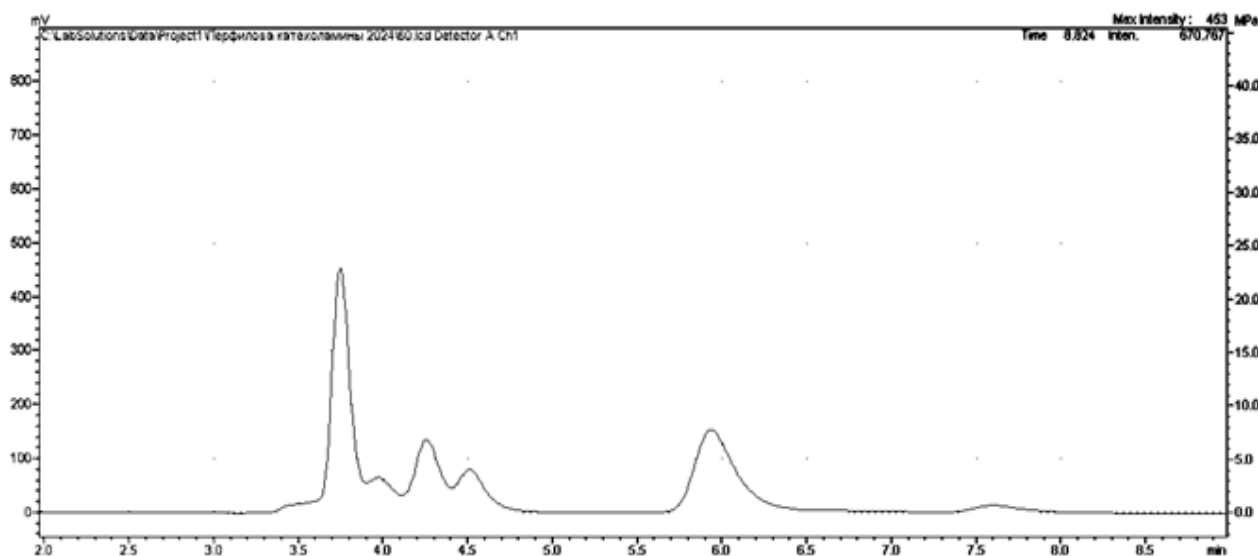


Рис. 9. Хроматограмма биологического фона стриатума крыс

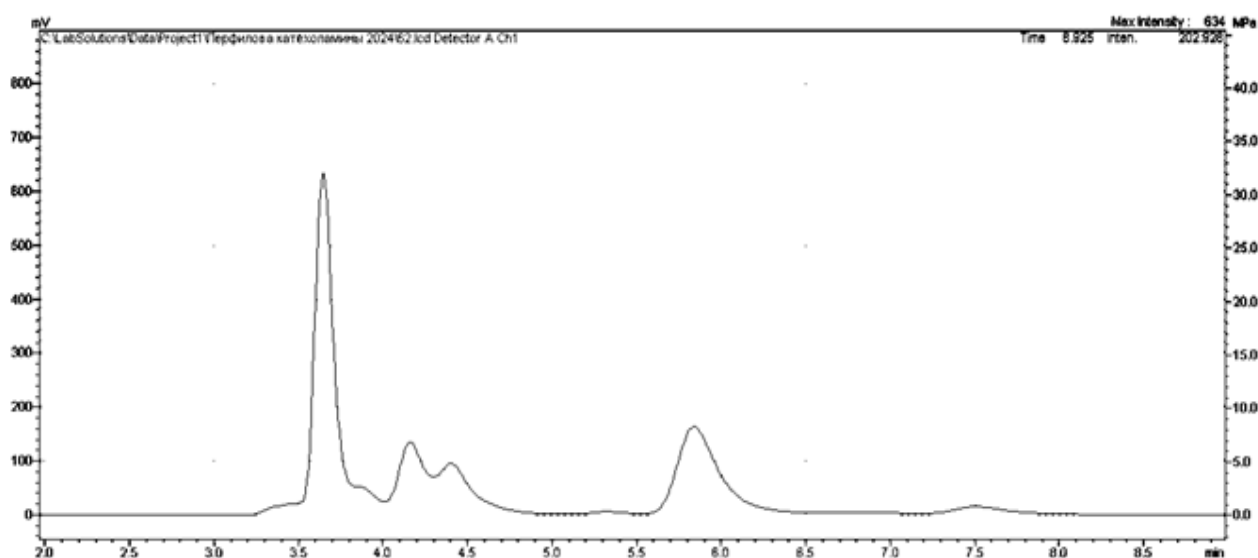


Рис. 10. Хроматограмма биологического фона таламуса крыс

В силу того, что головной мозг рыб *Danio rerio* имеет слишком малый размер для получения пробы с адекватным объемом, все полученные мозговые структуры рыб были объединены в одну пробу. В результате была получена единая хроматограмма для головного мозга всех *Danio rerio* (рис. 11).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в фоновых пробах мозговых структур крыс пики искомых биогенных аминов определяются хорошо в диапазоне от 10 до 100 нг/мл. Следовательно, поведенческие модели, основанные на функционировании моноаминергической системы мозга, на данном виде лабораторных животных более чем оправданы. Но стоит отметить, что проведение

поведенческих тестов на крысах является более трудоемким процессом по сравнению с таковыми для *Danio rerio*.

В свою очередь, несмотря на то, что пики биогенных аминов на хроматограмме головного мозга *Danio rerio* (Zebrafish) заметно ниже таковых в пробах структур мозга крыс, они в 3–5 раз превосходят по высоте колебания нулевой линии, что позволяет их идентифицировать. Учитывая относительную простоту организации тестов, данную модель можно использовать для проведения исследования различных поведенческих реакций, для моделирования стресса новизны и экспериментальной депрессии при проведении доклинических испытаний новых лекарственных средств.

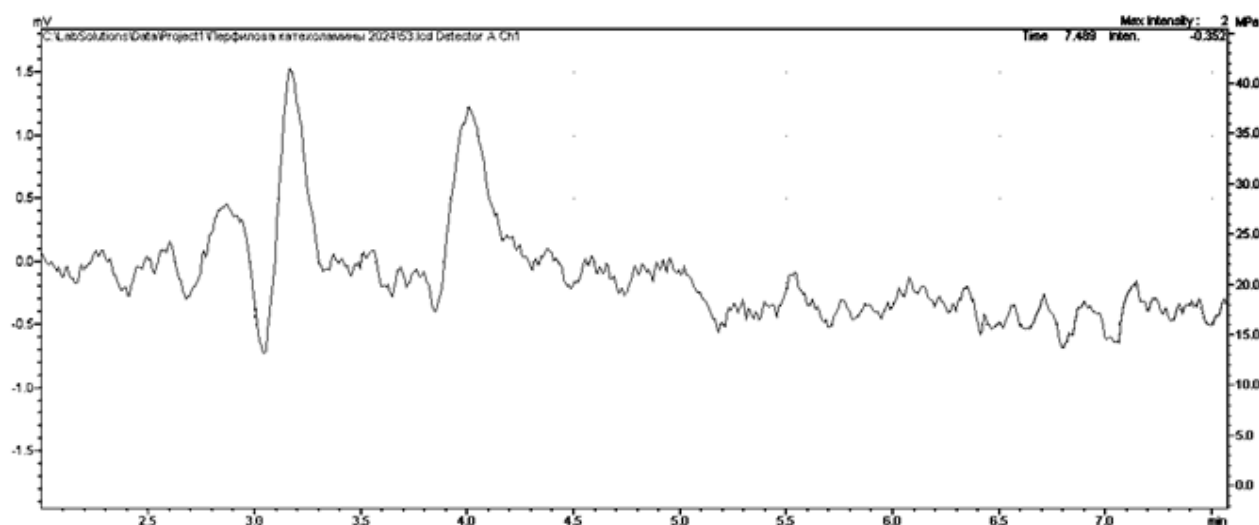


Рис. 11. Хроматограмма биологического фона мозговых структур рыб *Danio rerio* (Zebrafish)

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Шабанов П.Д., Лебедев В.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р. Влияние стресса новизны на поведенческие ответы *Danio rerio* и оценка дозозависимых эффектов анксиолитиков бензодиазепинового ряда на примере феназепама. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(3):57–63. doi: 10.17816/RCF15357-63.

2. Качанов Д.А. Сравнительный анализ влияния селективных ингибиторов обратного захвата серотонина на поведение *Danio rerio* в условиях экспериментальной депрессии. *Мечниковские чтения – 2018: материалы Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием*. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2018. С. 636–637.

3. Ribeiro S., Torres T., Martins R., Santos M.M.. Toxicity screening of diclofenac, propranolol, sertraline and simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;114:67–74. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.008.

4. Качанов Д.А., Бардаков М.О., Лукин Е.Н., Мкртчян Г.В., Газданова Н.В., Акопян К.А. и др. Сравнительный обзор возможностей использования *Danio rerio* (Zebrafish) в качестве модельного объекта в доклинических исследованиях. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2020;96(6-2):107–111. doi: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2020.96.6.058>.

5. Davis A. K., Garner J.P., Chu D.K., Felt S.A. Propofol immersion as a euthanasia method for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Medicine*. 2022;72(3):204–209. doi: 10.30802/AALAS-CM-22-000050.

6. Nakamura S. Integrated pathophysiology of schizophrenia, major depression, and bipolar disorder as monoamine axon disorder. *Frontiers in Bioscience-Scholar*. 2022;14(1):4.

7. Xu P., Chen A., Li Y., Xing X., Lu H. Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological genomics*. 2019;51(9):432–442. doi: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019.

8. Beuriat P.A., Cristofori I., Gordon B., Grafman J. The shifting role of the cerebellum in executive, emotional and social processing across the lifespan. *Behavioral and brain functions: BBF*. 2022;18(1):6. doi: 10.1186/s12993-022-00193-5.

9. Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcão A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – A review. *Analytica chimica acta*. 2013;768:12–34. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.030.

REFERENCES

1. Shabanov P.D., Lebedev V.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R. Effect of novelty stress on behavioral responses of *Danio rerio* and assessment of dose-dependent effects of anxiolytics of benzodiazepine structure with phenazepam as an example. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii = Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(3):57–63. (In Russ.) doi: 10.17816/RCF15357-63.

2. Kachanov D.A. Comparative analysis of the effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the behavior of *Danio rerio* under experimental depression conditions. *Mechnikovskie chteniya – 2018: materialy Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy studencheskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem = Mechnikov Readings – 2018: materials of the All-Russian Scientific and Practical Student Conference with international participation*. St. Petersburg; Publishing House of SZGMU named after I.I. Mechnikov, 2018:636–637. (In Russ.).

3. Ribeiro S., Torres T., Martins R., Santos M.M.. Toxicity screening of diclofenac, propranolol, sertraline and simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;114:67–74. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.008.

4. Kachanov D.A., Bardakov M.O., Lukin E.N., Mkrтчян G.V., Gazdanova N.V., Akopjan K.A. et al. Comparative review of possibilities of *Danio rerio* (Zebrafish)

usage as a model object in preclinical studies. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*. 2020;96(6-2):107–111. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2020.96.6.058>.

5. Davis A. K., Garner J.P., Chu D.K., Felt S.A. Propofol immersion as a euthanasia method for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Medicine*. 2022;72(3):204–209. doi: 10.30802/AALAS-CM-22-000050.

6. Nakamura S. Integrated pathophysiology of schizophrenia, major depression, and bipolar disorder as monoamine axon disorder. *Frontiers in Bioscience-Scholar*. 2022;14(1):4.

7. Xu P., Chen A., Li Y., Xing X., Lu H. Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological genomics*. 2019;51(9):432–442. doi: 10.1152/physiolgenomics.00006.2019.

8. Beuriat P.A., Cristofori I., Gordon B., Grafman J. The shifting role of the cerebellum in executive, emotional and social processing across the lifespan. *Behavioral and brain functions: BBF*. 2022;18(1):6. doi: 10.1186/s12993-022-00193-5.

9. Bicker J., Fortuna A., Alves G., Falcão A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – A review. *Analytica chimica acta*. 2013;768:12–34. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.030.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этические требования соблюдены. Текст не сгенерирован нейросетью.

Информация об авторах

Елена Станиславовна Рудаскова – старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики отдела синтеза и фармацевтических технологий, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; ✉ elrudaskova@mail.ru

Богдан Вадимович Козловский – младший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики отдела синтеза и фармацевтических технологий, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; Angeisman@volgmed.ru

Ольга Юрьевна Муха – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; olay.myha14@gmail.com

Людмила Ивановна Лашенова – доцент кафедры биологии, кандидат биологических наук, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; mih-li@mail.ru

Татьяна Павловна Кокорева – студентка педиатрического факультета, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; kkvpavel55@gmail.com

Юлия Константиновна Исаева – студентка медико-биологического факультета, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; jul.space@icloud.com

Илья Дмитриевич Чиркасов – ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; DoctorChirkasov@gmail.com

Статья поступила в редакцию 11.12.2024; одобрена после рецензирования 03.04.2025; принята к публикации 05.09.2025.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethical requirements are met. The text is not generated by a neural network.

Information about the authors

Elena S. Rudaskova – Senior Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics of the Department of Synthesis and Pharmaceutical Technologies, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; ✉ elrudaskova@mail.ru

Bogdan V. Kozlovski – Junior Researcher at the Laboratory of Pharmacokinetics of the Department of Synthesis and Pharmaceutical Technologies, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; Angeisman@volgmed.ru

Olga Yu. Mukha – Assistant Professor at the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; olay.myha14@gmail.com

Lyudmila I. Lashhenova – Associate Professor of the Department of Biology, Candidate of Biological Sciences, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; mih-li@mail.ru

Tatiana P. Kokoreva – student of the Pediatric Faculty, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; kkvpavel55@gmail.com

Yulia K. Isaeva – student of the Faculty of Medicine and Biology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; jul.space@icloud.com

Ilya D. Chirkasov – Assistant Professor of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; DoctorChirkasov@gmail.com

The article was submitted 11.12.2024; approved after reviewing 03.04.2025; accepted for publication 05.09.2025.