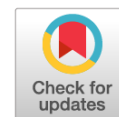


УДК 616-092.9+612.82

DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267375>

Научная статья



## Содержание грелина в разных отделах головного мозга у *Danio rerio* после стрессорного воздействия

А.А. Блаженко, П.П. Хохлов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, С.В. Казаков, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Актуальность.** Согласно литературным данным грелин может является нейропептидом стресса у некоторых животных, в том числе у *Danio rerio*.

**Цель исследования** — измерить уровень грелина в головном мозге *Danio rerio* (переднем, среднем и заднем мозге) после воздействия хищника (стресс-тест с хищником) и после введения антагонистов гелина и окситоцина, чтобы оценить функцию грелина в реакции на стресс.

**Материалы и методы.** В исследовании было использовано 68 особей *Danio rerio*, один хищник *Cichlasoma nicaraguensis*. Уровень грелина измеряли тестом ELISA. В качестве фармакологических агентов использовали: 1) антагонист грелина гексапептид [D-Lys3]-GHRP-6 (Tocris, Великобритания); 2) рекомбинантный пептидный аналог грелина агрелакс с молекулярной массой 3,5 кДа, разработанный в ФГБНУ «ИЭМ» (оба соединения в равных дозировках 0,333 мг/л); кортиколиберин (Tocris, Великобритания) в дозировке 0,4 мг/л; окситоцин (Gedeon Richter, Венгрия) — в дозировке 3,8 мкл (0,005 МЕ/мкл) на 50 мл аквариумной воды (0,019 МЕ/л).

**Результаты.** В контрольной группе уровень грелина определялся только в заднем мозге, значения концентрации грелина в переднем и среднем мозге были менее 4 пг/мг общего белка. Контакт с хищником приводил к значительному повышению содержания грелина в переднем и среднем, но не заднем мозге. Так, в переднем мозге рыб уровень грелина повышался до  $966 \pm 12$  пг/мг белка, что составляет почти 250-кратное увеличение показателя в сравнении с уровнем у интактных животных. На фоне агрелакса, [D-Lys3]-GHRP-6 и окситоцина содержание грелина в переднем и среднем мозге стрессированных рыб снижалось приблизительно в равной степени до  $88 \pm 3$ ,  $97 \pm 1$  и  $115 \pm 1$  пг/мг белка соответственно.

**Заключение.** Таким образом, стрессорное воздействие (контакт с хищником) значительно повышает содержание грелина в переднем и среднем мозге, но снижает в заднем мозге. Стресс-протекторные пептиды (окситоцин, [D-Lys3]-GHRP-6 и агрелакс) при инкубационном воздействии на стрессированных рыб снижали концентрацию грелина в переднем и среднем, в меньшей степени в заднем мозге рыб.

**Ключевые слова:** *Danio rerio*; мозг; грелин; стресс; окситоцин; агрелакс; [D-Lys3]-GHRP-6.

### Как цитировать:

Блаженко А.А., Хохлов П.П., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Казаков С.В., Шабанов П.Д. Содержание грелина в разных отделах головного мозга у *Danio rerio* после стрессорного воздействия // Психофармакология и биологическая наркология. 2022. Т. 13. № 3. С. 37–42. DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267375>

DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267375>

Research Article

## Ghrelin levels in different brain regions in *Danio rerio* exposed to stress

Alexandra A. Blazhenko, Platon P. Khokhlov, Andrei A. Lebedev, Eugenii R. Bychkov, Sergei V. Kazakov, Petr D. Shabanov

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

**BACKGROUND:** Literature data indicated that ghrelin may be a stress neuropeptide in some animals, including *Danio rerio*.

**AIM:** The aim of the study was to measure the levels of ghrelin in *Danio rerio* brain (forebrain, midbrain, and hindbrain) after predator exposure (predator stress test) and administration of ghrelin and oxytocin antagonists to assess the role of ghrelin in stress response.

**MATERIALS AND METHODS:** The study used 68 *Danio rerio*, one predator of *Cichlasoma nicaraguensis*. Ghrelin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The following pharmacological agents were used: 1) ghrelin antagonist hexapeptide [D-Lys3]-GHRP-6 (Tocris, UK); 2) recombinant peptide analog of ghrelin — agrelox — with a molecular weight of 3.5 kDa, developed at the IEM (both compounds in equal dosages of 0.333 mg/L); corticoliberin (Tocris) at a dosage of 0.4 mg/L; and oxytocin (Gedeon Richter, Hungary) at a dosage of 3.8  $\mu$ L (0.005 IU/ $\mu$ L) per 50 mL of aquarium water (0.019 IU/L).

**RESULTS:** In the control group, ghrelin level was determined only in the hindbrain, and ghrelin levels in the forebrain and midbrain were <4 pg/mg of total protein. Contact with a predator led to a significant increase in ghrelin levels in the forebrain and midbrain, but not in the hindbrain. Thus, in fish forebrain, ghrelin levels increased to  $966 \pm 12$  pg/mg of protein, which is almost a 250-fold increase in the indicator compared with the level in intact animals. In the presence of agrelox, [D-Lys3]-GHRP-6, and oxytocin, ghrelin levels in the forebrain and midbrain of stressed fish decreased approximately equally to  $88 \pm 3$ ,  $97 \pm 1$ , and  $115 \pm 1$  pg/mg protein, respectively.

**CONCLUSION:** Thus, stress exposure (contact with a predator) significantly increases ghrelin levels in the forebrain and midbrain but decreases in the hindbrain. Stress-protective peptides (oxytocin, [D-Lys3]-GHRP-6, and agrelox) decreased ghrelin levels in the forebrain and midbrain, and to a lesser extent, in the hindbrain when exposed to stress.

**Keywords:** *Danio rerio*; brain; ghrelin; stress; oxytocin; agrelox; [D-Lys3]-GHRP-6.

**To cite this article:**

Blazhenko AA, Khokhlov PP, Lebedev AA, Bychkov ER, Kazakov SV, Shabanov PD. Ghrelin levels in different brain regions in *Danio rerio* exposed to stress. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2022;13(3):37–42. DOI: <https://doi.org/10.17816/phbn267375>

Received: 07.05.2022

Accepted: 20.07.2022

Published: 29.09.2022

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Различные факторы могут привести к нарушению психического здоровья. Значительная доля людей подвержена тревожным, депрессивным, вызванным стрессом расстройствам. Согласно исследованиям Всемирной организации здравоохранения, в будущем число этих расстройств будет только увеличиваться [1]. Точная причина неизвестна, у некоторых людей они могут появиться без каких-либо стрессовых ситуаций, но у других любой стресс может спровоцировать это состояние [2]. Были предложены различные виды животных моделей для исследования механизмов тревоги и депрессии, но в основном использовались грызуны [3]. Однако, по данным литературы, одна из лучших моделей животных для этой цели — *Danio rerio* [4]. Доказано, что *Danio rerio* обладает консервативной нервной системой и является хорошей моделью для тестирования эмоционального и мотивационного поведения, включая реакции на психоактивные вещества [5]. У *Danio rerio* грелин представляет собой консервативную структуру, именно поэтому мы выбрали эту модель для нашего эксперимента. Согласно литературе, грелин может быть биомаркером стресса [6]. Грелин обладает как анксиолитическим, так и анксиогенным эффектом и играет двойную роль в модуляции тревожного поведения.

*Цель исследования* — измерить уровень грелина в головном мозге *Danio rerio* (переднем, среднем и заднем мозге) после воздействия хищника (стресс-тест с хищником) и после введения антагонистов грелина и окситоцина, чтобы оценить функцию грелина в реакции на стресс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашем исследовании было использовано 68 особей *Danio rerio*, один хищник *Cichlasoma nicaraguensis*. Рыб содержали при нормальной комнатной температуре (22–23 °С) со стандартным временем кормления (2 раза в день). Уровень грелина измеряли тестом ELISA. Хирургическим путем выполнен забор головного мозга *Danio rerio*. После этого был изготовлен материал для иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве фармакологических агентов использовали два антагониста грелина: 1) гексапептид [D-Lys3]-GHRP-6 (Tocris, Великобритания); 2) рекомбинантный пептидный аналог грелина с молекулярной массой 3,5 кДа, который разработан в ФГБНУ «ИЭМ», рабочее название «агрелакс». Оба соединения использовали для инкубации в равных дозировках 0,333 мг/л. Кортиколиберин (КРГ; Tocris, Великобритания) применяли в дозировке 0,4 мг/л при инкубации или 0,0004 мкг/мл в случае внутрисосудистого введения. Окситоцин (Gedeon Richter, Венгрия) использовали в дозировке 3,8 мкл (0,005 МЕ/мл) на 50 мл аквариумной воды (0,019 МЕ/л). В качестве внутривенного контроля вводили 1 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

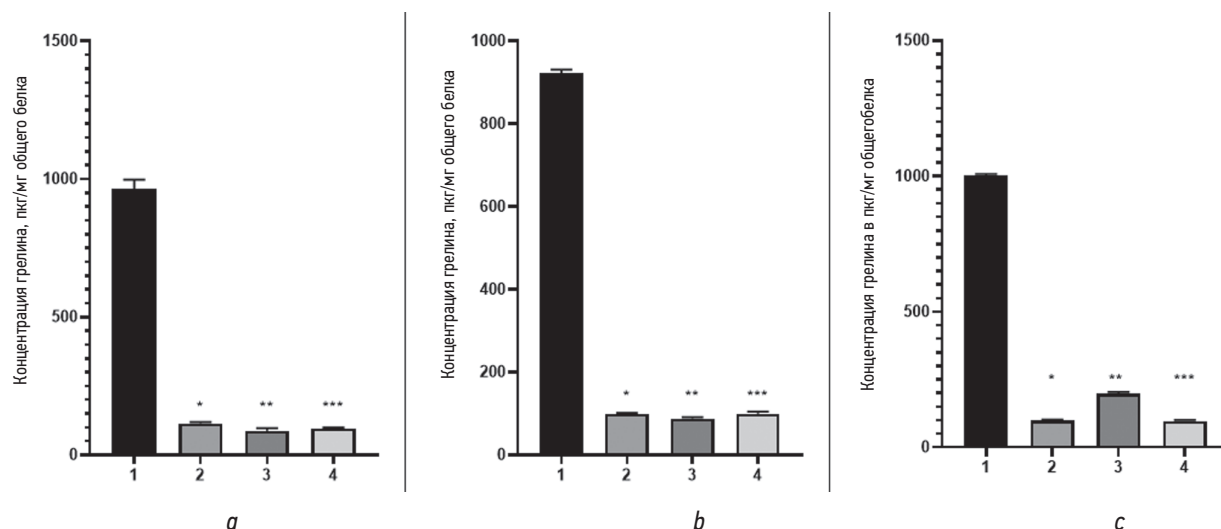
У интактных рыб уровень грелина в переднем мозге *Danio rerio*, определенный с помощью ИФА, не превышал 4 пг/мг, то есть по сути находился за пределами чувствительности тест-системы. Поэтому у рыб инициировали стрессовую реакцию, подсаживая в аквариум с хищником-резидентом *Cichlasoma nicaraguensis* на 5 мин. Контакт с хищником приводил к значительному повышению содержания грелина в переднем мозге рыб. У стрессированных рыб концентрация грелина в головном мозге достигала  $966 \pm 12$  пг/мг белка, что составляет почти 250-кратное увеличение показателя в сравнении с незначительным уровнем у интактных животных. Сходный со стрессом эффект на содержание грелина в переднем мозге *Danio rerio* оказывала 5-минутная экспозиция рыб с КРГ. На фоне КРГ уровень грелина повышался до  $986 \pm 13$  пг/мг белка. Подобные эффекты мы наблюдали при исследовании содержания периферического кортизола в условиях стресса и экспозиции с КРГ.

Таким образом, КРГ оказывает сходный со стрессом мощный стимулирующий эффект на содержание грелина в переднем мозге и уровень кортизола в мышечной ткани *Danio rerio*.

В следующей серии экспериментов изучали влияние стресс-протекторных пептидов на содержание грелина в переднем мозге *Danio rerio*, подвергнутых стрессорному воздействию. Оказалось, что все исследуемые препараты приводят к значительному (более чем в 7 раз) снижению уровня грелина. На фоне агрелакса, [D-Lys3]-GHRP-6, и окситоцина содержание грелина у стрессированных рыб составляло  $88 \pm 3$ ,  $97 \pm 1$ ,  $115 \pm 1$  пг/мг белка соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что грелиновая система переднего мозга *Danio rerio* отвечает на стрессорное раздражение повышением концентрации грелина, которая, в свою очередь, значительно снижается после применения антагонистов грелина и окситоцина (см. рисунок, а).

Таким образом, в состоянии покоя (при отсутствии стресса) уровень грелина в ткани переднего мозга *Danio rerio* не определяется методом ИФА. Острый витальный стресс и КРГ стимулируют подъем уровня грелина, тогда как стресс-протекторные пептиды (окситоцин, [D-Lys3]-GHRP-6, агрелакс) при инкубационном воздействии на стрессированных животных снижают.

Средний мозг *Danio rerio* является наибольшей структурой по массе по сравнению с другими отделами. Так же как и в переднем мозге, концентрация грелина в контрольной группе рыб была меньше, чем чувствительная возможность тест-системы (менее 4 пг/мг общего белка). В группе стрессированных животных концентрация грелина в среднем мозге выросла до  $922 \pm 3$  пг/мг общего белка. Далее, после инкубационного метода применения фармакологических субстанций (окситоцина, агрелакса и [D-Lys3]-GHRP-6), концентрация грелина понизилась



**Рисунок.** Содержание грелина в переднем (а), среднем (b) и заднем (с) мозге *Danio rerio* после контакта с хищником и инкубации с окситоцином и антагонистами грелина: 1 — контакт с хищником (в группе В — введение кортиколиберина); 2 — хищник + окситоцин; 3 — хищник + агрелакс; 4 — хищник + [D-Lys3]-GHRP-6. \* $p < 0,05$  относительно группы 1

**Figure.** Ghrelin levels in the forebrain (a), midbrain (b), and hindbrain (c) of *Danio rerio* (pg/mg total protein) after contact with a predator and incubation with oxytocin and ghrelin antagonists: 1 — contact with a predator (in group B, administration of corticotrophin-releasing hormone); 2 — predator + oxytocin; 3 — predator + agrelax; 4 — predator + [D-Lys3]-GHRP-6. \*, \*\*  $p < 0.05$  relative to group 1

в несколько раз и составляла  $99 \pm 1$ ,  $88 \pm 1$  и  $100 \pm 2$  пг/мг соответственно. Примечательно, что концентрация грелина при применении окситоцина и [D-Lys3]-GHRP-6 понизилась практически до одинаковых значений, что может свидетельствовать о перекрестных ответных механизмах на стрессорное воздействие у грелиновой и окситоциновой систем.

При сравнении действия антагонистов грелина видно, что в среднем мозге, так же как и в переднем, наименьшую концентрацию грелина отмечали после применения агрелакса, она равнялась  $100 \pm 2$  пг/мг общего белка.

После применения антагонистов грелина на стрессированных животных, концентрация грелина сохранялась, однако была более чем в 7 раз ниже, чем после эксперимента с хищником (см. рисунок, b).

Показатели концентрации грелина после применения антагонистов его рецепторов значимо отличаются от концентрации грелина у стрессированных животных. Так же как и в переднем мозге, в состоянии покоя (без стресса) содержание грелина в ткани среднего мозга *Danio rerio* находится на уровне следовых значений. Острый витальный стресс или введение КРГ увеличивали концентрацию грелина в несколько раз по сравнению с группой активного контроля (контакт с хищником), она превысила 1 мкг/мг и составила  $1004 \pm 2$  пг/мг общего белка.

После применения окситоцина концентрация грелина понизилась по сравнению с группой, где применяли КРГ, более чем в 8 раз, практически достигнув уровня интактных животных. Количественные значения грелина при применении окситоцина и [D-Lys3]-GHRP-6 были примерно равны.

Филогенетически задний мозг у *Danio rerio* является самой древней структурой. В отличие от переднего и среднего мозга, в заднем мозге изначально определялся грелин в концентрации  $663 \pm 29$  пг/мг общего белка. После экспозиции хищнику эта концентрация понизилась в несколько раз, до  $81 \pm 1$  пг/мг общего белка. Сходное действие оказывали стресс-протекторные нейропептиды (окситоцин, [D-Lys3]-GHRP-6, агрелакс), снижая уровень грелина до 97–98 пг/мг общего белка. В отличие от показателей концентраций грелина переднего и среднего мозга, в группе использования агрелакса концентрация грелина была наибольшей по сравнению с группами, где применялись другие антагонисты (см. рисунок, с).

Таким образом, в заднем мозге *Danio rerio* в состоянии покоя определяется высокое содержание нейропептида грелина, которое снижается в условиях стресса и возрастает в 2 раза при воздействии КРГ. При инкубационном воздействии на стрессированных рыб (с низким уровнем грелина) стресс-протекторные пептиды (окситоцин, [D-Lys3]-GHRP-6 и агрелакс) не оказывают выраженных эффектов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование высокочувствительного ИФА позволило нам идентифицировать пептид грелин в различных частях мозга *Danio rerio*.

Состояние психоэмоционального стресса привело к значительному изменению концентрации грелина в разных отделах мозга *Danio rerio*. Воздействие антагонистов

грелина и окситоцина наглядно привело к снижению уровня грелина в мозге *Danio rerio*.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: А.А. Блаженко, П.П. Хохлов, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, С.В. Казаков — написание статьи, анализ данных; П.Д. Шабанов — редактирование статьи, разработка общей концепции.

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

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Authors contribution.** Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. The contribution of each author: A.A. Blazhenko, P.P. Khokhlov, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov, S.V. Kazakov — manuscript drafting, writing and pilot data analyses; P.D. Shabanov — paper reconceptualization and general concept discussion.

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

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothbaum B.O., Kearns M.C., Price M., et al. Early intervention may prevent the development of posttraumatic stress disorder: A randomized pilot civilian study with modified prolonged exposure // *Biol Psychiatry*. 2012. Vol. 11, No. 72. P. 957–963. DOI: 10.1016/j.biopsych.2012.06.002
2. Kumar A., Pareek V., Raza K., et al. Induction – reversal modeling of psychiatric disorders by functional manipulation of habenular pathways in zebrafish // *Neurol Psychiatry Brain Res*. 2017. Vol. 24. P. 1–8. DOI: 10.1016/J.NPBR.2016.12.003
3. Foster M.T., Solomon M.B., Huhman K.L., Bartness T.J. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006. Vol. 290, No. 5. P. R1284–R1293. DOI: 10.1152/ajpregu.00437.2005

4. Biran J., Blechman J., Wircer E., Levkowitz G. Development and Function of the Zebrafish Neuroendocrine System. In: Ludwig L., Levkowitz G., editors. *Model Animals in Neuroendocrinology: From Worm to Mouse to Man*. John Wiley and Sons, 2019. P. 101–131. DOI: 10.1002/9781119391128.CH5
5. Khan K.M., Collier A.D., Meshalkina D.A., et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery // *Br J Pharmacol*. 2017. Vol. 174, No. 13. P. 1925–1944. DOI: 10.1111/bph.13754
6. Maruna P., Gürlich R., Rosická M. Ghrelin as an acute-phase reactant during postoperative stress response // *Horm Metab Res*. 2008. Vol. 40, No. 6. P. 404–409. DOI: 10.1055/S-2008-1065329

## REFERENCES

1. Rothbaum BO, Kearns MC, Price M, et al. Early intervention may prevent the development of posttraumatic stress disorder: A randomized pilot civilian study with modified prolonged exposure. *Biol Psychiatry*. 2012;11(72):957–963. DOI: 10.1016/j.biopsych.2012.06.002
2. Kumar A, Pareek V, Raza K, et al. Induction – reversal modeling of psychiatric disorders by functional manipulation of habenular pathways in zebrafish. *Neurol Psychiatry Brain Res*. 2017;24:1–8. DOI: 10.1016/J.NPBR.2016.12.003
3. Foster MT, Solomon MB, Huhman KL, Bartness TJ. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):R1284–R1293. DOI: 10.1152/ajpregu.00437.2005

4. Biran J, Blechman J, Wircer E, Levkowitz G. Development and Function of the Zebrafish Neuroendocrine System. In: Ludwig L, Levkowitz G, editors. *Model Animals in Neuroendocrinology: From Worm to Mouse to Man*. John Wiley and Sons, 2019. P. 101–131. DOI: 10.1002/9781119391128.CH5
5. Khan KM, Collier AD, Meshalkina DA, et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2017;174(13):1925–1944. DOI: 10.1111/bph.13754
6. Maruna P, Gürlich R, Rosická M. Ghrelin as an acute-phase reactant during postoperative stress response. *Horm Metab Res*. 2008;40(6):404–409. DOI: 10.1055/S-2008-1065329

## ОБ АВТОРАХ

\***Александра Александровна Блаженко**, мл. науч. сотр. Института экспериментальной медицины; адрес: Россия, Санкт-Петербург, 197022, ул. Академика Павлова, д. 12; eLibrary SPIN: 8762-3604. E-mail: alexandrablazhenko@gmail.com

## AUTHORS INFO

\***Alexandra A. Blazhenko**, junior research associate, Institute of Experimental Medicine; address; 12, Akademika Pavlova st., Saint Petersburg, 197022, Russia; eLibrary SPIN: 8762-3604. E-mail: alexandrablazhenko@gmail.com

**Платон Платонович Хохлов**, канд. биол. наук, ст. научн. сотр.;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0007-6553-9267>;  
eLibrary SPIN: 8673-7417. E-mail: [platonkh@list.ru](mailto:platonkh@list.ru)

**Андрей Андреевич Лебедев**, д-р биол. наук, профессор,  
заведующий лабораторией общей фармакологии;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0297-0425>;  
eLibrary SPIN: 4998-5204. E-mail: [aalebedev-iem@rambler.ru](mailto:aalebedev-iem@rambler.ru)

**Евгений Рудольфович Бычков**, канд. мед. наук, заведующий  
лабораторией химии и фармакологии лекарственных средств;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8911-6805>;  
eLibrary SPIN: 9408-0799. E-mail: [bychkov@mail.ru](mailto:bychkov@mail.ru)

**Сергей Владимирович Казаков**, аспирант.  
E-mail: [bychkov@mail.ru](mailto:bychkov@mail.ru)

**Петр Дмитриевич Шабанов**, д-р мед. наук, профессор, заве-  
дующий отделом; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;  
eLibrary SPIN 8974-7477. E-mail: [pdshabanov@mail.ru](mailto:pdshabanov@mail.ru)

**Platon P. Khokhlov**, Cand. Sci. Biol. (Biochemistry); senior  
research associate; ORCID: <https://orcid.org/0000-0007-6553-9267>;  
eLibrary SPIN: 8673-7417. E-mail: [platonkh@list.ru](mailto:platonkh@list.ru)

**Andrei A. Lebedev**, Dr. Biol. Sci. (Pharmacology), professor,  
Head of Laboratory of general Pharmacology, Department of  
Neuropharmacology; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0297-0425>.  
eLibrary SPIN: 4998-5204. E-mail: [aalebedev-iem@rambler.ru](mailto:aalebedev-iem@rambler.ru)

**Eugenii R. Bychkov**, Cand. Sci. Biol. (Pathophysiology), head of  
the Laboratory, Department of Neuropharmacology;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8911-6805>;  
eLibrary SPIN: 9408-0799. E-mail: [bychkov@mail.ru](mailto:bychkov@mail.ru)

**Sergei V. Kazakov**, postgraduate student.  
E-mail: [bychkov@mail.ru](mailto:bychkov@mail.ru)

**Petr D. Shabanov**, Dr. Med. Sci. (Pharmacology), professor and  
head of the Department of Pharmacology;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;  
e-Library SPIN: 8974-7477. E-mail: [pdshabanov@mail.ru](mailto:pdshabanov@mail.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author