

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА ГРЕЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ [D-LYS³]-GHRP-6 НА СОДЕРЖАНИЕ И ОБМЕН МОНОАМИНОВ В СИММЕТРИЧНЫХ ЗОНАХ МОЗГА КРЫС, ХРОНИЧЕСКИ ПОТРЕБЛЯВШИХ АЛКОГОЛЬ

УДК 616-092.9+612.82
DOI: 10.17816/RCF15348-56

© И.В. Карпова¹, Е.Р. Бычков^{1,2,3,4}, И.Ю. Тиссен¹, А.А. Лебедев^{1,3}, П.Д. Шабанов^{1,2}

¹ФГБН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации», Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Карпова И.В., Бычков Е.Р., Тиссен И.Ю., др. Влияние блокатора грелиновых рецепторов [D-Lys³]-GHRP-6 на содержание и обмен моноаминов в симметричных зонах мозга крыс, хронически потреблявших алкоголь // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 48–56. doi: 10.17816/RCF15348-56

Поступила в редакцию 01.08.2017

Принята к печати 18.09.2017

Ключевые слова:

антагонист грелина; принудительная хроническая алкоголизация; моноамины; межполушарная асимметрия.

Резюме

Целью исследования было изучить влияния блокады грелиновых рецепторов GHS-R1a на состояние симметричных моноаминергических систем головного мозга крыс. В частности, предполагалось выяснить, способствует ли применение антагониста грелина [D-Lys³]-GHRP-6 восстановлению исходного содержания моноаминов и их метаболитов в головном мозге животных, хронически потребляющих алкоголь.

Методы. Опыты проведены на 22 самцах крыс линии «Вистар». Экспериментальные животные вместо питьевой воды получали 10 % раствор этанола. Крысы контрольных групп продолжали потреблять водопроводную воду. Через 6 месяцев после начала принудительной хронической алкоголизации 6 крысам, получавшим алкоголь, и 6 крысам, получавшим воду, в течение месяца, раз в три дня, интраназально вводили антагонист грелина [D-Lys³]-GHRP-6 (1 мкг/мкл, по 10 мкл в каждую ноздрю). Остальным животным в том же режиме вводили эквивалентный объем физраствора. Через 80 минут после последнего интраназального введения препаратов крысы декапитировали. В гипоталамусе, обонятельном бугорке, стриатуме и гиппокампе правой и левой сторон мозга методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией определяли содержание норадреналина (НА), дофамина (ДА), диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-ГТ) и гидроксиндолуксусной кислоты (5-ГИУК). Полученные результаты обрабатывали по *t*-критерию Стьюдента с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism 6.0. **Результаты.** У контрольных крыс (не подвергавшихся воздействию ни алкоголя, ни препарата) в левом стриатуме обнаружилось достоверное преобладание уровня 5-ГИУК по сравнению с аналогичным

показателем другой стороны мозга. Под действием хронического потребления 10 % раствора этанола исходная левосторонняя асимметрия исчезала. Этанол увеличивал содержание 5-ГТ в левом гиппокампе, 5-ГИУК — в правом обонятельном бугорке и ДА — в правом гипоталамусе. Препарат [D-Lys³]-GHRP-6 при интраназальном введении интактным крысам достоверно увеличивал соотношение 5-ГИУК/5-ГТ в правом обонятельном бугорке и уровень 5-ГИУК, ДОФУК и ГВК — в правом стриатуме. В гиппокампе, напротив, наблюдались левосторонние эффекты: повышался уровень 5-ГТ и уменьшалось соотношение 5-ГИУК/5-ГТ. При введении интактным крысам исследуемый препарат не влияет на состояние моноаминергических систем гипоталамуса. Между состоянием моноаминергических систем интактных животных и хронически алкоголизованных крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6, обнаруживались значимые различия. Так, в левом гиппокампе у алкоголизованных крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6, уровень 5-ГТ был выше, а соотношение 5-ГИУК/5-ГТ ниже, чем у контрольных интактных животных. Кроме того, в правом стриатуме крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 на фоне хронической алкоголизации, было отмечено более высокое содержание метаболитов ДА, чем в соответствующей зоне мозга интактных контрольных животных. При сравнении двух групп крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 (потреблявших воду и подвергавшихся принудительной алкоголизации), было обнаружено единственное различие: у алкоголизованных животных содержание ДА в левом гипоталамусе было ниже, чем у крыс, потреблявших воду. **Заключение.** Таким образом, по своему влиянию на моноаминергические системы головного мозга [D-Lys³]-GHRP-6 не является антагонистом действия этанола. Скорее, этанол при хроническом воздействии снижает реактивность большинства моноаминергических систем на антагонист грелина. При этом избирательно повышается чувствительность ДА-ергической системы гипоталамуса к препарату [D-Lys³]-GHRP-6.

THE EFFECT OF THE GHRELIN RECEPTORS INHIBITOR [D-LYS³]-GHRP-6 ON THE LEVELS AND METABOLISM OF MONOAMINES IN SYMMETRIC BRAIN AREAS OF RATS TREATED CHRONICALLY WITH ALCOHOL

© I.V. Karpova¹, E.R. Bychkov^{1,2,3,4}, I.Yu. Tissen¹, A.A. Lebedev^{1,3}, P.D. Shabanov^{1,2}

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

²S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

³National Guard Military Academy of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia;

⁴Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia;

For citation: Karpova IV, Bychkov ER, Tissen IYu, et al. The effect of the ghrelin receptors inhibitor [D-Lys³]-GHRP-6 on the levels and metabolism of monoamines in symmetric brain areas of rats treated chronically with alcohol. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(3):48-56. doi: 10.17816/RCF15348-56

Received: 01.08.2017

Accepted: 18.09.2017

◆ **Keywords:** ghrelin antagonist; forced chronic treatment with alcohol; monoamines; hemispheric asymmetry.

◆ **Abstract. Aim.** In the course of the study, the impact of the ghrelin receptor GHS-R1a on the condition of symmetric monoaminergic systems of the rat brain was investigated. In particular, it was intended to find out whether the treatment with the ghrelin receptor antagonist [D-Lys³]-GHRP-6, recover the original content of monoamines and their metabolites in the brain of chronic alcoholic rats.

Methods. The experiments were performed on 22 Wistar male rats. Experimental animals instead of drinking water received 10 % ethanol solution. Rats of the control groups continued to consume tap water. 6 months after the beginning of forced chronic alcohol treatment, 6 rats treated with alcohol, and 6 rats received water, in a month, once in three days, were instilled intranasally with the ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 (1 мкг/мкл, with 10 μl to each nostril). The other animals in the same manner were administered an equivalent volume of saline. 80 minutes after the last intranasal administration of drugs, rats were decapitated. With the HPLC-method, in the hypothalamus, olfactory tubercle, striatum and hippocampus of the left and right sides of the brain the contents of noradrenaline (NA), dopamine (DA), dioxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were measured. The results were processed by Student's *t*-test using the statistical software package GraphPad Prism 6.0. **Results.** In the control rats (not exposed to either ethanol or drug) in the left striatum revealed a significant predominance of 5-HIAA compared to the same parameter of the other side of the brain. Under

the condition of chronic ethanol intake, the initial left-sided asymmetry disappeared. Ethanol increased the content of 5-HT in the left hippocampus, 5-HIAA in the right olfactory tubercle and DA – in the right hypothalamus. [D-Lys³]-GHRP-6, when administered intranasally to the intact rats, significantly increased the 5-HIAA/5-HT ratio in the right olfactory tubercle, and the 5-HIAA, DOPAC and HVA levels – in the right striatum. In contrast, the left-sided effects in hippocampus were observed: the 5-HT levels increased and the 5-HIAA/5-HT ratio decreased. When instilled to intact rats, [D-Lys³]-GHRP-6 does not alter the monoaminergic systems of the hypothalamus. Between the monoaminergic systems of intact animals and alcoholic rats treated with [D-Lys³]-GHRP-6, the significant differences were shown. So, in the left hippocampus of alcoholic rats treated with [D-Lys³]-GHRP-6, the 5-HT level was higher, and the 5-HIAA/5-HT ratio was lower than in the control intact animals. Besides, in the right striatum of alcoholic rats treated with [D-Lys³]-GHRP-6, the DA metabolites levels were higher than those in the intact control animals. When comparing two groups of rats treated with [D-Lys³]-GHRP-6 (consumed water and alcoholic), the only difference was found: the alcoholic animals the content of DA in the left hypothalamus was lower than that of rats consumed water. Conclusion. Thus, by its influence on the monoaminergic system of the brain, [D-Lys³]-GHRP-6 is not an antagonist of the ethanol. Rather ethanol, when administered chronically, reduces the reactivity of the majority of monoaminergic systems to the ghrelin antagonist. Herewith, the forced chronic treatment with ethanol selectively increases the sensitivity to the [D-Lys³]-GHRP-6 in the hypothalamus DA-ergic system

ВВЕДЕНИЕ

Грелины представляют собой гормоны, которые секретируются главным образом клетками желудка и в значительно меньшей степени клетками латерального гипоталамуса [3, 9]. Ацилированная форма грелина является специфическим лигандом для рецепторов подкорковых ядер головного мозга [7, 9]. Присутствие ацильного остатка необходимо для связывания грелина с рецептором GHSR1a [3, 22]. Рецепторы этого типа активно экс-

прессируются в вентромедиальном и латеральном гипоталамусе, дугообразном ядре, черной субстанции, ядрах миндалины и других отделах головного мозга [7, 9]. Взаимодействие грелина с соответствующими рецепторами в гипоталамусе приводит к энергетическим сдвигам в организме [17, 18], в мезолимбической и нигростриатной системах — к изменениям в подкрепляющих системах мозга [10, 19], а в гиппокампе — к процессам, влияющим на обучение и память [6, 9]. Активацию рецепторов GHSR1a у млекопитающих связывают с функцио-

нированием систем положительного подкрепления и аддиктивным поведением [5, 7]. Имеются данные об участии грелиновой системы в формировании алкогольной зависимости. Так, введение грелина повышает [12], а блокада грелиновых рецепторов снижает [12, 13, 16] потребление алкоголя мышами. Предполагается, что эти функции либо опосредованы моноаминергической регуляцией, либо реализуются через гетеродимерный рецептор GHSR1a/D1R [14, 23].

По данным наших предыдущих исследований, билатеральное интраназальное введение пептидных препаратов (в частности, окситоцина) вызывает асимметричные сдвиги содержания и обмена моноаминов в различных структурах переднего мозга мышей [2].

Однако различия реактивности правых и левых моноаминергических систем на симметричные воздействия антагонистов грелина до сих пор не исследованы. Данная работа посвящена изучению хронической блокады грелиновых рецепторов GHSR1a на состояние симметричных моноаминергических систем головного мозга крыс. В частности, предполагается выяснить, способствует ли применение антагониста грелина восстановлению исходного состояния моноаминергических систем мозга у животных, хронически потребляющих алкоголь.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на 22 самцах крыс линии «Вистар», выращенных в питомнике «Рапполово» (Ленинградская область). В начале исследования масса животных составляла 180–200 г. С момента получения из питомника и до начала эксперимента животных не менее трех недель содержали в общих клетках по 5–6 особей на стандартном пищевом рационе при свободном доступе к пище и воде.

В начале исследования в клетках с экспериментальными животными (5 и 6 крыс) вода в поилке была заменена на 10 % раствор этанола. Крысы контрольных групп (5 и 6 крыс) продолжали получать водопроводную воду *ad libitum*. Через 7 месяцев после начала полупринудительной хронической алкоголизации масса животных составляла 350–400 г. За месяц до окончания эксперимента 6 крысам, получавшим алкоголь, и 6 крысам, получавшим воду, интраназально вводили водный раствор антагониста грелина [D-Lys³]-GHRP-6 (20 мкг в 20 мкл, по 10 мкл раствора в каждую ноздрю с помощью пипеточного дозатора). Интраназальные инстилляции производили раз в три дня. Остальным животным (5 — из числа хронически потреблявших алкоголь и 5 — получавших воду) интраназально в том же режиме вводили эквивалентный объем физиологического раствора.

Через 80 минут после интраназального введения препаратов крыс декапитировали. На льду

из левой и правой половины мозга извлекали гипоталамус, обонятельный бугорок, стриатум и гиппокамп. Образцы взвешивали на торсионных весах, помещали в пластиковые пробирки и хранили до анализа при температуре –80 °С. За неделю до анализа образцы ткани извлекали из холодильника, гомогенизировали в 150 мкл 0,1 N HCl, центрифугировали при 15000 g в течение 20 минут. Супернатанты отбирали при помощи пипеточного дозатора, помещали в чистые сухие пластиковые пробирки и хранили при –80 °С. Непосредственно в день анализа пробы размораживали, подвергали повторному центрифугированию с ускорением 15000 g при температуре +4 °С в течение 20 минут, после чего исследовали на хроматографе Beckman Coulter с амперометрическим детектором. Определяли содержание следующих веществ: норадреналина (НА), дофамина (ДА), диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-ГТ) и гидроксиндолюксусной кислоты (5-ГИУК) [15]. Хроматографическая система включала инжектор Rheodyne 7125 с хроматографической петлей на 20 мкл для нанесения образца, колонку Phenomenex (4,6 × 250,0 мм) с сорбентом Sphere Clone 5 мкл ODS(2) и амперометрический детектор LC-4C BAS. Определение концентраций исследуемых веществ проводили при потенциале +0,70 В. Подвижная фаза содержала 5,5 мМ цитратно-фосфатного буфера с 0,7 мМ октансульфоново́й кислотой, 0,5 мМ EDTA и 8 % ацетонитрила (pH 3,0). Скорость элюции подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время анализа одной пробы — около 20 минут.

Полученные результаты обрабатывали по *t*-критерию Стьюдента с использованием стандартного пакета статистических программ GraphPad Prism 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У контрольных крыс (не подвергавшихся воздействию алкоголя или препарата) стриатум был единственной структурой мозга, где обнаружилось асимметричное распределение моноаминов. В данной области мозга отмечено достоверное преобладание уровня 5-ГИУК слева ($p < 0,05$). Аналогичная тенденция наблюдалась в отношении содержания в стриатуме ДОФУК (метаболита ДА) ($p = 0,0597$) (табл. 1). В остальных исследованных областях мозга содержание моноаминов и их метаболитов у контрольных крыс было симметричным.

Под влиянием хронического потребления алкоголя содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме становилось симметричным, хотя повышение уровня 5-ГИУК в правом стриатуме было недостоверным ($p = 0,08$).

Хроническое потребление алкоголя вызывало достоверное увеличение содержания 5-ГТ в левом гиппокампе ($p < 0,05$) и уровня ДА в правом гипота-

■ Таблица 1. Уровень моноаминов и их метаболитов (нг/мг ткани) в симметричных структурах мозга крыс линии «Вистар», содержащихся при свободном доступе к воде и в условиях хронического полупринудительного потребления 10 % раствора этанола

Моноамины и их метаболиты	Условия содержания			
	При свободном доступе к воде (контроль)		При хроническом полупринудительном потреблении 10 % этанола	
	Левое полушарие	Правое полушарие	Левое полушарие	Правое полушарие
Гиппокамп				
НА	0,381 ± 0,087	0,373 ± 0,075	0,522 ± 0,047	0,630 ± 0,087
5-ГТ	0,193 ± 0,022	0,211 ± 0,011	0,317 ± 0,041*	0,294 ± 0,015
5-ГИУК	0,284 ± 0,032	0,315 ± 0,022	0,337 ± 0,015	0,328 ± 0,017
5-ГИУК/5-ГТ	1,477 ± 0,075	1,461 ± 0,017	1,135 ± 0,155**	1,344 ± 0,228
Обонятельный бугорок				
5-ГТ	0,470 ± 0,025	0,505 ± 0,016	0,511 ± 0,035	0,543 ± 0,034
5-ГИУК	0,328 ± 0,006	0,343 ± 0,011	0,398 ± 0,035	0,431 ± 0,034*
5-ГИУК/5-ГТ	0,705 ± 0,035	0,681 ± 0,026	0,779 ± 0,031	0,801 ± 0,060
ДА	0,319 ± 0,021	0,337 ± 0,019	0,379 ± 0,051	0,367 ± 0,051
ДОФУК	0,191 ± 0,016	0,210 ± 0,021	0,274 ± 0,052	0,279 ± 0,036
ДОФУК/ДА	0,606 ± 0,058	0,632 ± 0,070	0,713 ± 0,069	0,774 ± 0,070
Стриатум				
5-ГТ	0,288 ± 0,025	0,220 ± 0,023	0,261 ± 0,030	0,299 ± 0,030
5-ГИУК	0,321 ± 0,020	0,251 ± 0,026*	0,343 ± 0,048	0,330 ± 0,030
5-ГИУК/5-ГТ	1,153 ± 0,137	1,192 ± 0,154	1,370 ± 0,228	1,138 ± 0,120
ДА	0,535 ± 0,045	0,419 ± 0,041	0,468 ± 0,066	0,442 ± 0,051
ДОФУК	0,367 ± 0,053	0,265 ± 0,022	0,320 ± 0,041	0,308 ± 0,011
ГВК	0,209 ± 0,048	0,094 ± 0,041	0,194 ± 0,027	0,217 ± 0,008
ДОФУК/ДА	0,672 ± 0,043	0,649 ± 0,068	0,690 ± 0,033	0,738 ± 0,091
ГВК/ДА	0,355 ± 0,065	0,223 ± 0,101	0,0427 ± 0,058	0,416 ± 0,011
Гипоталамус				
5-ГТ	0,433 ± 0,036	0,399 ± 0,029	0,532 ± 0,057	0,532 ± 0,073
5-ГИУК	0,399 ± 0,050	0,379 ± 0,033	0,531 ± 0,053	0,421 ± 0,088
5-ГИУК/5-ГТ	0,913 ± 0,051	0,961 ± 0,081	1,020 ± 1,106	0,800 ± 0,158
ДА	0,048 ± 0,008	0,044 ± 0,008	0,050 ± 0,012	0,072 ± 0,008*
ГВК	0,190 ± 0,068	0,112 ± 0,045	0,193 ± 0,050	0,172 ± 0,069

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, которые достоверно различаются между собой; * проявление асимметрии (достоверные различия между правой и левой структурой мозга, $p < 0,05$); ** достоверные изменения соответствующего параметра под действием хронического потребления 10 % этанола ($p < 0,05$)

ламусе ($p < 0,05$), что, однако, не приводило к появлению асимметрии в данных структурах мозга.

При интраназальном введении интактным крысам антагониста грелина асимметрия по уровню 5-ГИУК в стриатуме исчезала (табл. 2). В остальных структурах мозга под действием [D-Lys³]-GHRP-6 сохранялось симметричное содержание моноаминов и их метаболитов. При этом введение [D-Lys³]-GHRP-6 крысам, получавшим воду, вызывало достоверные изменения показателей моноаминергических систем только с одной стороны. Так, под влиянием [D-Lys³]-GHRP-6 достоверно увеличивалось соотношение 5-ГИУК/5-ГТ в правом обонятельном бугорке ($p < 0,05$), а содержание 5-ГИУК, ДОФУК и ГВК в правом стриатуме. В правом стриатуме также была отмечена выраженная тенденция к повышению уровня

серотонина ($p = 0,0509$). В гиппокампе, напротив, наблюдали левосторонние эффекты. Под действием [D-Lys³]-GHRP-6 в левом гиппокампе повышался уровень 5-ГТ ($p < 0,05$) и уменьшалось соотношение 5-ГИУК/5-ГТ ($p < 0,01$), что свидетельствует о левостороннем снижении уровня метаболизма 5-ГТ в данной структуре мозга.

Применение [D-Lys³]-GHRP-6 у крыс, хронически потреблявших 10 % этанол, не приводило к возврату моноаминергических систем в состояние, характерное для интактных животных. Более того, между состоянием моноаминергических систем интактных животных и хронически алкоголизованных крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6, обнаруживались значимые различия. Так, в левом гиппокампе у алкоголизованных крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6,

■ Таблица 2. Уровень моноаминов и их метаболитов (нг/мг ткани) в симметричных структурах мозга крыс линии «Вистар», содержащихся в условиях свободного доступа к воде, после введения физиологического раствора и антагониста грелина [D-Lys³]-GHRP-6

Моноамины и их метаболиты	После введения физиологического раствора (контроль)		После введения антагониста грелина	
	Левое полушарие	Правое полушарие	Левое полушарие	Правое полушарие
Гиппокамп				
НА	0,381 ± 0,087	0,373 ± 0,075	0,397 ± 0,088	0,367 ± 0,052
5-ГТ	0,193 ± 0,022	0,211 ± 0,011	0,296 ± 0,032*	0,246 ± 0,038
5-ГИУК	0,284 ± 0,032	0,315 ± 0,022	0,294 ± 0,010	0,325 ± 0,029
5-ГИУК/5-ГТ	1,477 ± 0,075	1,461 ± 0,017	1,037 ± 0,084*	1,337 ± 0,113
Обонятельный бугорок				
5-ГТ	0,470 ± 0,025	0,505 ± 0,016	0,449 ± 0,037	0,434 ± 0,047
5-ГИУК	0,328 ± 0,006	0,343 ± 0,011	0,355 ± 0,028	0,363 ± 0,031
5-ГИУК/5-ГТ	0,705 ± 0,035	0,681 ± 0,026	0,799 ± 0,038	0,856 ± 0,054*
ДА	0,319 ± 0,021	0,337 ± 0,019	0,296 ± 0,042	0,309 ± 0,029
ДОФУК	0,191 ± 0,016	0,210 ± 0,021	0,186 ± 0,029	0,228 ± 0,023
ДОФУК/ДА	0,606 ± 0,058	0,632 ± 0,070	0,628 ± 0,018	0,741 ± 0,069
Стриатум				
5-ГТ	0,288 ± 0,025	0,220 ± 0,023	0,264 ± 0,027	0,296 ± 0,024
5-ГИУК	0,321 ± 0,020	0,251 ± 0,026	0,343 ± 0,026	0,345 ± 0,030*
5-ГИУК/5-ГТ	1,153 ± 0,137	1,192 ± 0,154	1,368 ± 0,186	1,168 ± 0,044
ДА	0,535 ± 0,045	0,419 ± 0,041	0,501 ± 0,029	0,506 ± 0,034
ДОФУК	0,367 ± 0,053	0,265 ± 0,022	0,387 ± 0,052	0,368 ± 0,030*
ГВК	0,209 ± 0,048	0,094 ± 0,041	0,263 ± 0,025	0,209 ± 0,019*
ДОФУК/ДА	0,672 ± 0,043	0,649 ± 0,068	0,758 ± 0,063	0,727 ± 0,026
ГВК/ДА	0,355 ± 0,065	0,223 ± 0,101	0,536 ± 0,066	0,413 ± 0,023
Гипоталамус				
5-ГТ	0,433 ± 0,036	0,399 ± 0,029	0,472 ± 0,042	0,441 ± 0,023
5-ГИУК	0,399 ± 0,050	0,379 ± 0,033	0,446 ± 0,039	0,483 ± 0,040
5-ГИУК/5-ГТ	0,913 ± 0,051	0,961 ± 0,081	0,977 ± 0,103	1,106 ± 0,106
ДА	0,048 ± 0,008	0,044 ± 0,008	0,075 ± 0,008	0,057 ± 0,009
ГВК	0,190 ± 0,068	0,112 ± 0,045	0,239 ± 0,045	0,224 ± 0,062

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, которые достоверно различаются между собой; * достоверные изменения соответствующего параметра под действием антагониста грелина АГ-НТ (* $p < 0,05$;)

уровень 5-ГТ был выше ($p < 0,05$), а соотношение 5-ГИУК/5-ГТ ниже ($p < 0,001$), чем у контрольных интактных животных. Кроме того, в правом стриатуме крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 на фоне хронической алкоголизации, было отмечено более высокое содержание метаболитов ДА ($p < 0,001$ — для ДОФУК и $p < 0,05$ — для ГВК), чем в соответствующей зоне мозга интактных контрольных животных.

При сравнении двух групп крыс под воздействием [D-Lys³]-GHRP-6 (потреблявших воду и получавших 10 % этанол) было обнаружено сниженное содержание ДА в левом гипоталамусе хронически алкоголизованных животных ($p < 0,05$) (табл. 3). Других различий между двумя группами крыс, получавших препарат, выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным данным у крыс линии «Вистар», не подвергавшихся воздействию ни алкоголя, ни препарата, стриатум был единственной структурой мозга, где обнаружилось асимметричное распределение моноаминов. Преобладание уровня 5-ГИУК (метаболита 5-ГТ) в левом стриатуме контрольных животных согласуется с результатами измерения уровней моноаминов в мозге интактных самцов крыс линии Long Evans, полученными в одной из недавних работ [4]. Однако наряду с данным результатом авторами были обнаружены и другие межполушарные различия, которые в настоящем исследовании не воспроизводились [4]. Вместе

■ Таблица 3. Уровень моноаминов и их метаболитов (нг/мг ткани) в симметричных структурах мозга крыс линии «Вистар», содержащихся в условиях хронического полупринудительного потребления 10 % раствора этанола, после введения физиологического раствора и антагониста грелина [D-Lys³]-GHRP-6

Моноамины и их метаболиты	После введения физиологического раствора (контроль)		После введения антагониста грелина	
	Левое полушарие	Правое полушарие	Левое полушарие	Правое полушарие
Гиппокамп				
НА	0,522 ± 0,047	0,630 ± 0,087	0,527 ± 0,065	0,456 ± 0,095
5-ГТ	0,317 ± 0,041	0,294 ± 0,015	0,299 ± 0,035	0,298 ± 0,039
5-ГИУК	0,337 ± 0,015	0,328 ± 0,017	0,291 ± 0,025	0,320 ± 0,003
5-ГИУК/5-ГТ	1,135 ± 0,155	1,344 ± 0,228	1,001 ± 0,061	1,103 ± 0,070
Обонятельный бугорок				
5-ГТ	0,511 ± 0,035	0,543 ± 0,034	0,532 ± 0,054	0,548 ± 0,061
5-ГИУК	0,398 ± 0,035	0,431 ± 0,034	0,443 ± 0,054	0,446 ± 0,049
5-ГИУК/5-ГТ	0,779 ± 0,031	0,801 ± 0,060	0,837 ± 0,068	0,827 ± 0,065
ДА	0,379 ± 0,051	0,367 ± 0,051	0,407 ± 0,057	0,358 ± 0,046
ДОФУК	0,274 ± 0,052	0,279 ± 0,036	0,309 ± 0,043	0,291 ± 0,029
ДОФУК/ДА	0,713 ± 0,069	0,774 ± 0,070	0,780 ± 0,076	0,838 ± 0,071
Стриатум				
5-ГТ	0,261 ± 0,030	0,299 ± 0,030	0,287 ± 0,034	0,258 ± 0,036
5-ГИУК	0,343 ± 0,048	0,330 ± 0,030	0,285 ± 0,019	0,311 ± 0,027
5-ГИУК/5-ГТ	1,370 ± 0,228	1,138 ± 0,120	1,031 ± 0,082	1,354 ± 0,272
ДА	0,468 ± 0,066	0,442 ± 0,051	0,506 ± 0,037	0,535 ± 0,058
ДОФУК	0,320 ± 0,041	0,308 ± 0,011	0,363 ± 0,010	0,429 ± 0,019^{###}
ГВК	0,194 ± 0,027	0,217 ± 0,008	0,239 ± 0,019	0,244 ± 0,032
ДОФУК/ДА	0,690 ± 0,033	0,738 ± 0,091	0,737 ± 0,056	0,852 ± 0,095
ГВК/ДА	0,0427 ± 0,058	0,416 ± 0,011	0,448 ± 0,048	0,411 ± 0,036
Гипоталамус				
5-ГТ	0,532 ± 0,057	0,532 ± 0,073	0,410 ± 0,030	0,393 ± 0,022
5-ГИУК	0,531 ± 0,053	0,421 ± 0,088	0,457 ± 0,056	0,431 ± 0,031
5-ГИУК/5-ГТ	1,020 ± 1,106	0,800 ± 0,158	1,100 ± 0,083	1,097 ± 0,045
ДА	0,050 ± 0,012	0,072 ± 0,008	0,046 ± 0,007	0,053 ± 0,004
ГВК	0,193 ± 0,050	0,172 ± 0,069	0,132 ± 0,064	0,131 ± 0,027

Примечание: жирным шрифтом выделены значения, которые достоверно различаются между собой; # достоверные изменения соответствующего параметра под действием антагониста грелина АГ-НТ (^{###} $p < 0,001$)

с тем в одном из ранних исследований асимметрии моноаминергических систем у интактных крыс линии Purdue-Wistar сообщаются совершенно иные сведения [21]. Все это говорит о том, что, несмотря на бесспорность факта наличия асимметрии, конкретные ее показатели очень вариабельны и зависят от линии животных и их функционального состояния. Учитывая, что настоящая работа выполнена на крысах, поступивших одновременно из одного и того же питомника и содержащихся в контролируемых условиях вивария, мы считаем возможным принять данные, полученные нами на животных контрольной группы за «точку отсчета», с которой допустимо сравнивать результаты воздействий, применявшихся в эксперименте.

При интраназальном введении интактным крысам антагониста грелина асимметрия по уровню 5-ГИУК в стриатуме исчезала. В остальных структу-

рах мозга под действием [D-Lys³]-GHRP-6 сохранялось симметричное содержание моноаминов и их метаболитов. При этом введение [D-Lys³]-GHRP-6 крысам, получавшим воду, вызывало достоверные изменения показателей моноаминергических систем только с одной стороны. Исчезновение исходной асимметрии по показателям дофаминергической и серотонинергической систем в мозге мышей при интраназальном введении другого пептидного препарата (окситоцина) было показано нами ранее [2]. Интересно, что большинство изменений моноаминергических систем, возникавших при билатеральном интраназальном введении окситоцина, были односторонними [2]. То же было характерно и для эффектов антагониста грелиновых рецепторов, обнаруженных в настоящей работе: под влиянием [D-Lys³]-GHRP-6 в основном происходили изменения серотонинергической системы. В частности,

в правом обонятельном бугорке возросло соотношение 5-ГИУК/5-ГТ, а в правом стриатуме — содержание 5-ГИУК, в левом гиппокампе повышался уровень 5-ГТ и уменьшалось соотношение 5-ГИУК/5-ГТ.

Изменения дофаминергической системы под влиянием [D-Lys³]-GHRP-6 были отмечены только в правом стриатуме: в этой структуре мозга увеличивалось содержание ДОФУК и ГВК. Уровень самого ДА при этом не изменялся. Согласно литературным данным системное введение грелина направлено преимущественно на мезолимбическую дофаминовую систему [11, 19]. Это подтверждает, что мишенью грелина являются грелиновые рецепторы, расположенные на поверхности дофаминергических клеток вентральной области покрышки среднего мозга. Таким образом, наши результаты не вполне согласуются с данными литературы, в соответствии с которыми локальное введение антагониста рецептора грелина в вентральную область покрышки уменьшает высвобождение ДА в прилежащем ядре [10].

Известно, что высвобождение дофамина в мезолимбической системе опосредует подкрепляющие свойства стимулов (таких как пища и алкоголь) [8, 20]. Однако, по нашим данным, хроническое потребление алкоголя вызывало достоверное увеличение уровня ДА только в правом гипоталамусе. Отсутствие изменений содержания ДА в обонятельном бугорке (являющегося также частью мезолимбической системы) косвенно подтверждает тот факт, что систематическое полупринудительное потребление алкоголя не обязательно приводит к формированию алкогольной зависимости. Среди крыс линии «Вистар», полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), только 65 % демонстрируют предпочтение места введения этанола [1].

По результатам настоящего исследования, хроническое потребление алкоголя вызывало достоверное увеличение содержания 5-ГТ в левом гиппокампе. Известно, что данная область у грызунов отвечает за обучение и память. В гиппокампе обнаружены грелиновые рецепторы [6]. Введение грелина способствует развитию длительной потенциации, повышению плотности нейронов в гиппокампе и увеличивает эффективность гиппокампзависимого обучения и запоминания. При этом действие грелина в гиппокампе связано с серотонином, так как ингибирование обратного захвата серотонина блокирует действие грелина [6, 9]. На основании этих данных мы предположили, что введение антагониста грелина крысам, длительно потреблявшим алкоголь, может вернуть содержание 5-ГТ в гиппокампе к уровню контроля. Вопреки ожиданиям, применение [D-Lys³]-GHRP-6 у крыс, хронически потреблявших 10 % этанол, не приводило к возврату моноаминергических систем в состояние, характерное для интактных животных. Так, в левом гиппокампе у алкоголизованных крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6, уровень 5-ГТ был выше, а соотношение 5-ГИУК/5-ГТ

ниже, чем у контрольных интактных животных. Кроме того, в правом стриатуме крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 на фоне хронической алкоголизации, было отмечено более высокое содержание метаболитов ДА, чем в соответствующей зоне мозга интактных контрольных животных.

У крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 на фоне хронического алкогольного воздействия, выявлено снижение ДА в левом гипоталамусе по сравнению с интактными животными, получавшими препарат. Таким образом, можно предположить, что хроническое воздействие этанола повышает чувствительность ДА-ергической системы гипоталамуса к антагонисту грелина.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев хронически алкоголизованные крысы, получавшие [D-Lys³]-GHRP-6, не отличались по параметрам состояния моноаминергических систем от хронически алкоголизованных крыс, получавших вместо [D-Lys³]-GHRP-6 физиологический раствор. Исключением из данной закономерности был правый стриатум, где у крыс, получавших [D-Lys³]-GHRP-6 на фоне потребления 10 % этанола, уровень ДОФУК оказался выше, чем у алкоголизованных животных, не получавших препарата.

Таким образом, можно заключить, что по своему влиянию на моноаминергические системы головного мозга [D-Lys³]-GHRP-6 не является антагонистом действия этанола, скорее, этанол при хроническом воздействии снижает реактивность большинства моноаминергических систем на антагонист грелина.

ВЫВОДЫ

1. Под действием хронического потребления 10 % раствора этанола исчезает исходная левосторонняя асимметрия по содержанию 5-ГИУК в стриатуме.
2. Этанол изменяет состояние серотонинергической системы в левом гиппокампе (увеличивая содержание 5-ГТ) и в правом обонятельном бугорке (повышая уровень 5-ГИУК).
3. Этанол изменяет состояние ДА-ергической системы в правом гипоталамусе (повышая содержание ДА).
4. Препарат [D-Lys³]-GHRP-6 при интраназальном введении интактным крысам способен изменять состояние серотонинергической системы в левом гиппокампе, правом стриатуме и правом обонятельном бугорке. При этом параметры ДА-ергической системы изменяются только в правом стриатуме.
5. Препарат [D-Lys³]-GHRP-6 при интраназальном введении интактным крысам не влияет на состояние моноаминергических систем гипоталамуса. Хроническое воздействие этанола повышает чувствительность ДА-ергической системы гипоталамуса к антагонисту грелина.

6. При воздействии [D-Lys³]-GHRP-6 на состояние моноаминергических систем крыс, хронически потреблявших этанол, выявлено единственное изменение: повышение уровня ДОФУК в правом стриатуме. Таким образом, этанол при хроническом потреблении снижает реактивность моноаминергических систем на введение антагониста грелина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов П.М., Тиссен И.Ю., Лебедев А.А., и др. Антагонист рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 снижает экспрессию условной реакции предпочтения места этанола у крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13. – № 2. – С. 27–33. [Vinogradov PM, Tissen IYu, Lebedev AA, et al. Antagonist receptorov grelina [D-Lys³]-GHRP-6 snizhaet ehkspressiyu uslovnoy reakcii predpochteniya mesta ehhtanola u kryis. *Review on Clinical Pharmacology and Medicinal Therapy*. 2015;13(2):27-33. (In Russ.)]
2. Карпова И.В., Михеев В.В., Марышева В.В., и др. Изменения содержания моноаминов в симметричных структурах мозга агрессивных мышей-изолянтов линии C57Bl/6 под влиянием окситоцина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – № 11. – С. 546–550. [Karpova IV, Mikheev VV, Marysheva VV, et al. Oxytocin-induced changes in monoamine level in symmetric brain structures of isolated aggressive C57Bl/6 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;160(5):605-609. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-016-3228-2.
3. Chen Ch-Y, Asakawa A, Fujimiya M, et al. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev*. 2009;61:430-481. doi: 10.1124/pr.109.001958.
4. Cory-Slechta DA, Weston D, Liu S, Allen JL. Brain hemispheric differences in the neurochemical effects of lead, prenatal stress, and the combination and their amelioration by behavioral experience. *Toxicol Sci*. 2013;132(2):419-30. doi: 10.1093/toxsci/kft015.
5. Davis KW, Wellman PJ, Clifford PS. Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regul Peptides*. 2007;140(3):148-152. doi: 10.1016/j.regpep.2006.12.003.
6. Diano S, Farr SA, Benoit SC, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience*. 2006;9:381-388. doi: 10.1038/nn1656.
7. Dickson SL, Eggecioglu E, Landgren S, et al. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;340:80-87. doi: 10.1016/j.mce.2011.02.017.
8. Engel JA, Fahlke C, Hulthe P, et al. Biochemical and behavioral evidence for an interaction between ethanol and calcium-channel antagonists. *Alcohol and Alcoholism*. 1988;23(3):A13-A113. doi: 10.1007/BF01244784.
9. Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A. Ghrelin in Central Neurons. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):37-49. doi: 10.2174/157015909787602779.
10. Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, Engel JA. Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addiction Biology*. 2011;16(1):82-91. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00231.x.
11. Jerlhag E, Eggecioglu E, Dickson SL, et al. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *European Neuropsychopharmacology*. 2008;18(7):508-518. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.02.006.
12. Jerlhag E, Eggecioglu E, Landgren S, et al. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106 (27):11318-11323. doi: 10.1073/pnas.0812809106.
13. Kaur S, Ryabinin AE. Ghrelin receptor antagonism decreases alcohol consumption and activation of perioculomotor urocortin-containing neurons. *Alcoholism – Clinical and Experimental Research*. 2010;34(9):1525-1534. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01237.x.
14. Kern A, Mavrikaki M, Ullrich C, et al. Hippocampal Dopamine/DRD1 signaling dependent on the ghrelin receptor. *Cell*. 2015;163(5):1176-1190. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.062.
15. Krasnova IN, Bychkov ER, Lioudyno VI, et al. Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. *Neuroscience*. 2000;95(1):113-117. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00400-5.
16. Moulin A, Demange L, Berge G, et al. Toward potent ghrelin receptor ligands based on trisubstituted 1,2,4-triazole structure. 2. Synthesis and pharmacological *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50:5790-5806. doi: 10.1021/jm0704550.
17. Nagaya N, Itoh T, Murakami S, et al. Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD. *Chest*. 2005;128:1187-93. doi: 10.1378/chest.128.3.1187.
18. Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, et al. Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2008;149(9):601-611. doi: 10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00003.
19. Quarta D, Di Francesco C, Melotto S. Systemic administration of ghrelin increases extracellular dopamine in the shell but not the core subdivision of the nucleus accumbens. *Neurochemistry International*. 2009;54(2):89-94. doi: 10.1016/j.neuint.2008.12.006.
20. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving – an incentivesensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*. 1993;18(3):247-291. doi: 10.1016/0165-0173(93)90013-P.
21. Rosen GD, Finklestein S, Stoll AL, et al. Neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum, and

- nucleus accumbens. *Life Sci.* 1984;34(12):1143-8. doi: 10.1016/0024-3205(84)90085-7.
22. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, et al. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem.* 2012;151(2):119-128. doi: 10.1093/jb/mvr134.
23. Schneider ER, Darby R, Leibowitz SF, Hoebel BG. Orexin, but not ghrelin, injected in the lateral hypothalamus increases alcohol intake in alcohol-drinking rats. *Alcoholism – Clinical and Experimental Research.* 2007;31(6):199A.

◆ Информация об авторах

Инесса Владимировна Карпова — канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: inessa.karpova@gmail.com.

Евгений Рудольфович Бычков — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; преподаватель кафедры фармакологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ; доцент кафедры общей и практической психологии ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации»; доцент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург. E-mail: bychkov@mail.ru.

Илья Юрьевич Тиссен — научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: iljatis@mail.ru.

Андрей Андреевич Лебедев — д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры общей и практической психологии, ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации», Санкт-Петербург. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Петр Дмитриевич Шабанов — д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фармакологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ. Санкт-Петербург. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

◆ Information about the authors

Inessa V. Karpova — PhD, Docent, Senior Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: inessa.karpova@gmail.com.

Eugenii R. Bychkov — PhD (Biochemistry), Leading Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, dept. of Pharmacology, Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation; Assistant Professor, dept. of General psychology, National Guard Military Academy of the Russian Federation; Assistant Professor, dept. of Pharmacology, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: bychkov@mail.ru.

Ilya Yu. Tissen — Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: iljatis@mail.ru.

Andrei A. Lebedev — Dr Biol Sci (Pharmacology), Leading Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; Professor, dept. of General psychology, National Guard Military Academy of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Petr D. Shabanov — Dr Med Sci, Professor, Head, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; Head of the dept. of Pharmacology, Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.