

ПОИСК МАРКЕРОВ АЛКОГОЛИЗАЦИИ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ГРЕЛИНА

УДК 615.015.6

© П. П. Хохлов, Е. Р. Бычков, Р. О. Роик, А. А. Лебедев,
П. Д. Шабанов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

Ключевые слова:

грелин; дезацилгрелин; алкоголизация; отмена алкоголя;
биохимические маркеры.

Резюме

Твердофазным иммуноферментным анализом (SPiBIO, Франция) проведено количественное определение концентраций дезацил-грелина в образцах сывороток крови крыс в ходе хронической алкоголизации (6 мес) и последующей отмены приема алкоголя (через 1 и 7 суток). Дезацил-грелин выявлен во всех исследованных образцах опытных и контрольной групп. Данные анализировали разными методами параметрической и непараметрической статистики. В ходе хронической алкоголизации отмечено почти 2-кратное снижение средних значений концентрации дезацилгрелина в сыворотке крови. При отмене этанола уровень полипептида градуально повышался с максимумом на 7-е сутки отмены, но не достигая контрольных величин. Обсуждаются возможности использования динамики дезацилгрелина в качестве биохимического маркера алкоголизации и ее последствий.

Грелины представляют собой пептиды, состоящие из 28 аминокислот. В последние годы начали складываться представления о существовании единой сигнальной грелиновой системы, принимающей участие в эмоциогенных механизмах центральной нервной системы (ЦНС) [2, 3]. В систему включены 3 пептида, биосинтез которых контролируется одним геном. Гены грелина у грызунов (мышь) и человека близки по строению и имеют в своем составе по 5 экзонов [2]. Продуктами экспрессии грелинового гена являются 3 формы пептидов, а именно: ацилированный грелин, дезацилгрелин и обестатин (рис. 1). Кроме того, к системе грелинов относят грелиновые рецепторы.

Для ацилированного грелина характерна уникальная для олигопептидов посттрансляционная модификация, состоящая в присоединении остатка октановой кислоты к аминокислотному остатку серина путем сложноэфирной связи [11]. Это присутствие ацильного (алкильного) остатка является необходимым для связывания грелина с соответствующим рецептором в ЦНС, так называемым GHS (growth hormone secretagogue) рецептором типа 1 а

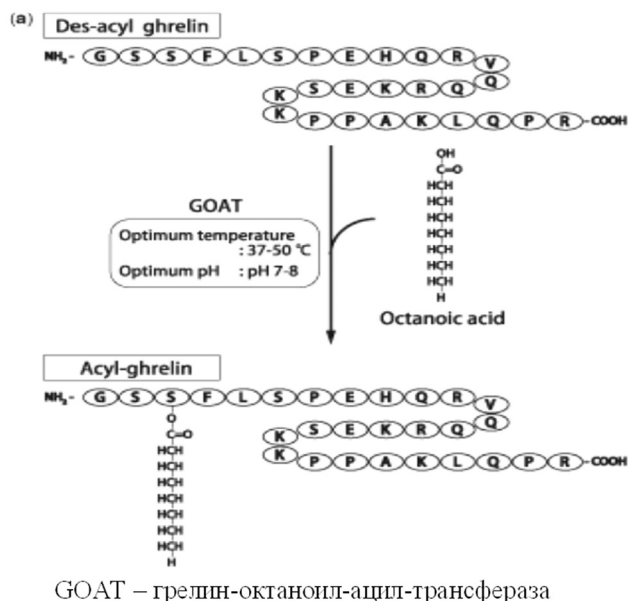
(GHS-R1a). Последний часто также обозначают как рецептор грелина (GRLN-R) [2, 11].

Сравнительно недавно опубликован ряд работ, подтверждающих участие грелиновой системы в механизмах подкрепления и формирования алкогольной и наркотической зависимости [3, 9]. Речь идет о модулирующем действии грелина и его разных форм (ацилированный грелин, дезацилгрелин, обестатин) на дофаминергическую систему подкрепления (награды) [3, 7]. Однако этот вопрос находится только на начальном этапе исследований. При этом важно оценить как роль разных форм грелинов в регуляторных механизмах ЦНС, так и возможную их причастность к формированию и поддержанию зависимости, тем более что грелины имеют как центральные, так и периферические (желудок, кровь) точки приложения. Целью настоящего исследования было изучение динамики профилей дезацилгрелина в сыворотке крови крыс в ходе экспериментальной хронической алкоголизации и после ее отмены.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 50 половозрелых крыс-самцов линии Вистар с начальной массой 180–200 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках в условиях вивария при свободном доступе к пище в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при температуре 22 ± 2 °C. Все опыты проведены в осенне-зимний период.

В течение 6 мес животных подвергали полусильственной алкоголизации 15%-м раствором этанола в качестве единственного источника жидкости при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Контрольная группа крыс (группа I) в качестве источника жидкости получала воду. Экспериментальные животные были разделены на три группы: с алкоголизацией в течение 6 мес (группа II), с отменой этанола через 24 ч (группа III) и с отменой этанола через 7 дней после алкоголизации (группа IV). После алкоголизации или ее отмены крыс декапитировали, собирали вытекшую кровь, инкубировали в течение 30 мин при +4 °C и далее центрифугировали при температуре +4 °C и ускорении 400 g в тече-



■ Рисунок 1. Основные формы грелина (деацилгрелин, ацилированный грелин) и их энзиматические превращения [12]

ние 10 мин. Полученные образцы сыворотки крови замораживали и хранили при –90 °C до проведения иммуноферментного анализа.

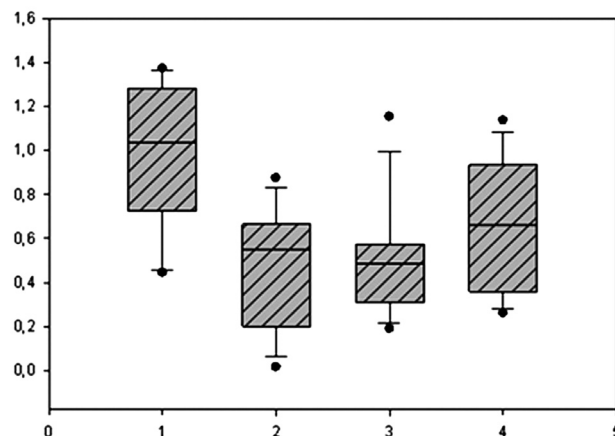
Концентрации деацилгрелина в образцах сывороток крови определяли путем твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «rat unacylated ghrelin enzyme immunoassay kit, SPIBIO» (Франция).

Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ Graph Pad Prizm v.4; SPSS Sigma Stat 3.0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а также критерии попарных сравнений групп Стьюдента-Ньюмена-Кейлса и Данна. Из непараметрических критериев использовали критерий Краскела-Уоллиса для сравнения групп. Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова-Смирнова.

■ Таблица 1. Основные показатели описательной статистики различных экспериментальных групп животных (нг/мл деацилгрелина)

Группа	N	M	SD	SEM	CIM	R	Max	Min	Me.	C25%	C75%
I	10	0,986	0,343	0,108	0,245	0,932	1,374	0,443	1,035	0,778	1,286
II	13	0,476	0,265	0,0734	0,160	0,860	0,875	0,0148	0,552	0,205	0,654
III	13	0,497	0,251	0,0695	0,151	0,965	1,154	0,189	0,486	0,311	0,559
IV	14	0,669	0,291	0,0777	0,168	0,877	1,137	0,261	0,663	0,373	0,925

Примечание. n — число животных в группе; M — средний показатель для экспериментальной группы; SD — стандартное отклонение; SEM — стандартная ошибка среднего; CIM — доверительный интервал 95%; R — размах значений между наибольшим и наименьшим; Max — наибольшее значение в группе; Min — наименьшее значение в группе; Me. — медиана; C25% — центиль 25%; C75% — центиль 75%



■ Рисунок 2. Распределение концентраций деацилгрелина в сыворотке крови при экспериментальной хронической алкоголизации. По оси абсцисс — концентрация деацилгрелина (нг/мл); по оси ординат: 1 — контрольная группа; 2 — хроническая алкоголизация в течение 6 мес; 3 — 1-е сут после отмены этанола; 4 — 7-е сут после отмены

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Всего в эксперименте было использовано 50 крыс, в том числе в контрольную группу вошли 10 крыс, 40 крыс подвергали полунасильственной алкоголизации 15%-м раствором алкоголя в качестве единственного источника жидкости. 13 крыс были обследованы непосредственно после процедуры хронической алкоголизации. Наконец, 13 и 14 животных составили группы, где деацилгрелин определяли через 1 и 7 сут после отмены этанола.

С помощью высокочувствительного иммуноферментного метода деацилгрелин выявлен в образцах сывороток всех обследованных животных. Распределение концентраций деацилгрелина в образцах сывороток отражено в форме диаграмм (рисунке 2, а основные статистические показатели соответственно в таблице 1.

Использование в опыте небольших выборок, а также их неравнозначность вынудило прибегнуть к оценке нормальностей распределений каждой выборки, то есть соответствия гауссовым распределениям для оценки правомочности использования традиционных параметрических критериев при

■ Таблица 2. Оценка соответствия распределений концентраций дезацилгрелина нормальному (гауссову распределению) в опытных и контрольных выборках с помощью критерия нормальности Колмогорова–Смирнова

Экспериментальная группа	K-S Dist.	P	Соответствие нормальности
I	=0,276	=0,030	Не соответствует
II	=0,192	>0,200	Соответствует
III	=0,199	=0,169	Соответствует
IV	=0,132	>0,200	Соответствует

Примечание. K-S Dist. — «максимальное отклонение» для критерия нормальности Колмогорова–Смирнова; P — уровень значимости

■ Таблица 3. Результаты оценки значимости различий между экспериментальными группами путем однофакторного дисперсионного анализа

Характер дисперсии	DF	SS	MS	F	P
Дисперсия между группами	3	1,827	0,609	7,468	P < 0,001
«Остаточная» дисперсия	46	3,752	0,0816		
Общая дисперсия	49	5,579			

Примечание. DF — число степеней свободы; SS — сумма квадратов; MS — средние квадратов; F — F-статистика; P — уровень значимости

■ Таблица 4. Попарное множественное сравнение групп (критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса)

Сравнение групп	D. M.	p	q	P	P < 0,050
I и II	0,511	4	6,012	<0,001	Значимо
I и III	0,489	3	5,758	<0,001	Значимо
I и IV	0,317	2	3,790	0,010	Значимо
II и IV	0,194	3	2,491	0,194	Не значимо
III и IV	0,172	2	2,214	0,124	Не опред.
II и III	0,0215	2	0,272	0,849	Не опред.

Примечание. D.M. — разность между средними; p — число степеней свободы; P — уровень значимости

статистической обработке количественных данных. Для этого были проведены оценки каждой выборки с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, а результаты представлены в таблице 2.

Поскольку распределения в трех экспериментальных группах соответствовали условиям нормальности, было признано рациональным для оценки значимости различий применить однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Результаты дисперсионного анализа приведены в таблице 3. По результатам дисперсионного анализа четырех исследованных групп следует вывод о значимости различий между всеми группами ($P < 0,001$).

В дополнение к тривиальному варианту дисперсионного анализа (ANOVA) были также проведены попарные сравнения групп между собой с помощью

критерия Стьюдента–Ньюмена–Кейлса и попарные сравнения каждой опытной группы с контрольной с помощью критерия Данна для неравнозначных групп. Соответствующие результаты приведены в таблицах 4 и 5.

Поскольку контрольная группа не соответствовала критерию нормальности (табл. 2) и группы были не равны по объему, было признано целесообразным также оценить первичные данные с помощью менее мощных, но более универсальных непараметрических критериев. Значимость различий между медианами в группах оценивали при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса, а значимость различий между средними — непараметрического критерия Фридмана. Соответствующие данные приведены в таблицах 6 и 7.

■ Таблица 5. Множественное сравнение относительно контрольной группы (критерий Данна для неравнозначных групп)

Сравнение групп	D.M.	q	P < 0,050
I и II	0,511	4,251	Значимо
I и III	0,489	4,072	Значимо
I и IV	0,317	2,680	Значимо

Примечание. D.M. — разность между средними; P — уровень значимости

■ Таблица 6. Оценка различий между медианами с помощью критерия Краскела–Уоллиса

Значение P	0,0025
Аппроксимация распределением	Гауссово (нормальное)
Значимы ли значения медиан ($P < 0,05$)?	Да
Число групп	4
Показатель (статистика) Краскела–Уоллиса	14,30

Таблица 7. Оценка различий между средними при помощи непараметрического критерия Фридмана

Значение P	0,0087
Аппроксимация распределением	Гауссово (нормальное)
Значимы ли различия между средними ($P < 0,05$)?	Да
Число групп	4
Показатель (статистика) Фридмана	11,64

Проведенные эксперименты и последующая обработка данных показывают, что в ходе экспериментальной хронической алкоголизации концентрация дезацилгрелина в сыворотках крыс была достоверно снижена по сравнению с контрольной группой. Во всех случаях концентрации дезацилгрелина находились в интервале от 0,148 до 1,374 нг/мл. Средние величины составили соответственно 0,956 нг/мл и 0,476 нг/мл, тогда как медианы выборок составили 1,035 нг/мл и 0,552 нг/мл. Уровень значимости различий не превысил $P < 0,001$.

При отмене этанола в качестве единственного источника жидкости наблюдали градуальное повышение концентрации дезацилгрелина. Показатели у исследованной группы после первых суток отмены не имели значимых отличий от показателей в ходе алкоголизации. Средние значения и медианы двух выборок составили соответственно 0,476 нг/мл; 0,497 нг/мл; 0,552 нг/мл и 0,486 нг/мл. После 7 суток отмены этанола наблюдали значимое повышение концентрации дезацилгрелина ($P < 0,001$). В последней исследованной группе среднее значение и медиана составили соответственно 0,669 и 0,663 нг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из сложившихся в последнее десятилетие представлений о регуляторной системе грелинов, наибольшее внимание исследователей было обращено, прежде всего, на ацилированную форму грелина, являющуюся специфическим лигандом для рецепторов подкорковых ядер головного мозга [3, 5]. Не ацилированную форму грелина, или дезацилгрелин, первоначально принимали за предшественник или продукт метаболизма ацилированной формы. В последнее время дезацилгрелину отводят самостоятельную роль в механизмах системной и местной регуляции [10]. Обестатин представляет собой полипептид из 23 аминокислотных остатков вместо 28 у остальных производных грелинового гена, он пока исследован недостаточно.

Грелины, прежде всего, относятся к гормонам пищеварительной системы, поскольку секретируются главным образом клетками желудка и, в меньшей степени, других отделов желудочно-кишечного тракта [2]. В кровотоке грелины циркулируют в виде двух основных молекулярных форм: ацилированной и дезацилированной [4, 6]. Дезацилгрелин представляет собой наиболее стабильную и долгоживущую форму грелина, циркулирующую в плазме крови. Относительное содержание дезацилгрелина к общему грелину, по данным разных авторов, составляет от 60 до 90%, тогда как ацилированный грелин составляет лишь 10% общего содержания обеих форм грелина [6, 10]. Помимо этого ацилированный грелин быстро деградирует в образцах плазмы или сыворотки и достоверное его определе-

ние часто связано с определенными методическими трудностями [4, 10]. Несмотря на это, дезацилгрелин исследован заметно меньше по сравнению с ацилированной формой. Разные формы грелинов обладают различной способностью проникать через гематоэнцефалический барьер.

Данные о связи содержания грелинов в кровеносном русле с потреблением алкоголя немногочисленны и касаются главным образом ацилированной формы, которая во всех отношениях наиболее исследована. Отмечено снижение содержания ацилированного грелина как при острой, так и хронической алкоголизации в эксперименте [1, 3, 7, 9]. Клинические исследования продемонстрировали снижение уровня грелина у пациентов с выраженной алкогольной зависимостью и возрастание уровня грелинов в период отмены алкоголя [7, 9]. Одни авторы указывают на отсутствие связи между уровнем грелинов и пристрастием к алкоголю, другие констатируют наличие такой связи [9]. В целом различные исследователи склоняются к мнению, что изменение секреции грелинов может отражать процессы развития пристрастия к повышенному потреблению пищи, алкоголя и психостимуляторов. Существуют также данные о том, что в эксперименте голодание способствует повышению уровня пептида, тогда как состояние сытости связано, наоборот, со снижением уровня грелина в крови [5].

Исследование содержания дезацилгрелина на системном уровне в условиях контролируемого эксперимента по хронической алкоголизации продемонстрировало определенную динамику концентрации пептида. Оценка первичных количественных данных с помощью всесторонних и всеобъемлющих статистических показателей позволяет уверенно говорить о значимом снижении концентрации пептида в сыворотке крови при хронической алкоголизации и последующем росте его уровня в ходе отмены алкоголя. Важным фактом также является доказательство возможности определения дезацилгрелина в образцах сывороток при традиционных физиологических приемах получения образцов, несмотря на относительную нестабильность грелинов в сыворотке и плазме крови [4, 10]. Можно также говорить о том, что концентрация дезацилгрелина в сыворотке экспериментальных животных может служить биохимическим маркером хронической алкоголизации и достаточно адекватно отражать ее уровень.

ВЫВОДЫ

1. Высококчувствительный иммуноферментный метод определения дезацилгрелина позволяет выявить его у всех экспериментальных крыс и определять пептид в образцах сывороток крови, полученных при декапитации.
2. Определяемые концентрации дезацилгрелина в сыворотках сопоставимы с соответствующими

величинами, полученными другими исследователями для образцов плазмы.

3. Экспериментальная хроническая алкоголизация значимо (вдвое) снижает концентрацию дезацилгрелина в сыворотке крови крыс.
4. При отмене алкоголя после его хронического потребления концентрация дезацилгрелина в сыворотке крови постепенное возрастает, однако не достигая уровня контрольных животных через 7 дней отмены.
5. Содержание дезацилгрелина в сыворотке экспериментальных животных может рассматриваться как достаточно стабильный маркер хронической алкоголизации в условиях эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Calissendorff J., Danielsson O., Brismar K., Röjdmarm S.* Alcohol ingestion does not affect serum levels of peptide YY but decreases both total and octanoylated ghrelin levels in healthy subjects // *Metabolism*. — 2006. — Vol. 55, N 12. — P. 1625–1629.
2. *Chen Ch.-Y., Asakawa A., Fujimiya M.* at al. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility // *Pharmacol Rev.* — 2009. — Vol. 61. — P. 430–481.
3. *Dickson S. L., Eggecioglu E., Landgren S.* at al. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2011. — Vol. 340. — P. 80–87.
4. *Hosoda H., Doi K., Nagaya N., Okumura H.* at al. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: Octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples // *Clin. Chemistry*. — 2004. — Vol. 50, N 6. — P. 1077–1080.
5. *Inhoff T., Mönnikes H., Noetzel S.* at al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats // *Peptides*. — 2008. — Vol. 29, N 12. — P. 2159–2168.
6. *Kempinski R., Demissie M., Jasinska M., Paradowski L.* Plasma ghrelin concentration in celiac patients // *Gastroenterologia Polska*. — 2008. — Vol. 15, N 6. — P. 375–377.

♦ Информация об авторах

Хохлов Платон Платонович — к. б. н., профессор, научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: platonkh@list.ru.

Бычков Евгений Рудольфович — к. м. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: bychkov@mail.ru.

Роик Роман Олегович — к. м. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: dr.roik@mail.ru.

Лебедев Андрей Андреевич — д. б. н., профессор, старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Шабанов Петр Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

7. *Kim D.-J., Yoon S.-J., Choi B.* at al. Increased fasting plasma ghrelin levels during alcohol abstinence // *Alcohol Alcoholism*. — 2005. — Vol. 40, N 1. — P. 76–79.
8. *Landgren S., Engel J. A., Hyytiä P.* at al. Expression of the gene encoding the ghrelin receptor in rats selected for differential alcohol preference // *Behav. Brain Res.* — 2011. — Vol. 221, N 1. — P. 182–188.
9. *Leggio L.* ESBRA-nordmann 2008 award lecture. Understanding and treating alcohol craving and dependence: Recent pharmacological and uroendocrinological findings // *Alcohol Alcoholism*. — 2009. — Vol. 44, N 4. — P. 341–352.
10. *Rauh M., Groschl M., Rascher W.* Simultaneous quantification of ghrelin and desacyl-ghrelin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in plasma, serum, and cell supernatants // *Clin. Chemistry*. — 2007. — Vol. 53, N 5. — P. 902–910.
11. *Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y.* at al. Structure, regulation and function of ghrelin // *J. Biochem.* — 2012. — Vol. 151, N 2. — P. 119–128.

SEARCH OF MARKERS OF ALCOHOLIZATION AMONG GHRELIN DERIVATIVES

Khokhlov P. P., Bychkov E. R., Roik R. O., Lebedev A. A., Shabanov P. D.

♦ **Summary:** The quantitative determination of unacylated ghrelin in rat sera in the course of prolonged (chronic) alcoholization during 6 months followed by alcohol withdrawal (in 1 and 7 days) was made by means of the rat unacylated ghrelin enzyme immunoassay kit (SPIBIO, France). Unacylated ghrelin was revealed in all samples both in control and experimental groups. The row data were treated by means of parametric and nonparametric statistic tests. The level of unacylated ghrelin was shown to double reduce in the course of prolonged alcoholization in rats. Ethanol withdrawal recovered the polypeptide content gradually with maximal indexes in 7 days after alcohol abolition but lower than in control rats. The possibilities of the use of unacylated ghrelin as a biochemical marker of alcoholization and its consequences are discussed.

♦ **Key words:** ghrelin; unacylated ghrelin; alcoholization; alcohol withdrawal; biochemical markers.

Khokhlov Platon Platonovich — PhD (Biochemistry), researcher, Anichkov Dept. of NeuroPharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: platonkh@list.ru.

Bychkov Yevgeniy Rudolfovich — M.D., PhD (Biochemistry), senior researcher, Anichkov Dept. of NeuroPharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: bychkov@mail.ru.

Roik Roman Olegovich — M.D., PhD (Pharmacology), senior researcher, Anichkov Dept. of NeuroPharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: dr.roik@mail.ru.

Lebedev Andrey Andreyevich — PhD, D.Sci. (Physiology), Professor, senior researcher, Anichkov Dept. of NeuroPharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Anichkov Dept. of NeuroPharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.