ВЛИЯНИЕ АЛКОГОЛИЗАЦИИ МАТЕРЕЙ НА АКТИВНОСТЬ ГРЕЛИНОВОЙ СИСТЕМЫ В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ И РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ У ПОТОМСТВА КРЫС

УДК 616-092.9+618.33+615.015.6

© М. И. Айрапетов¹, П. П. Хохлов¹, Е. Р. Бычков¹, Э. А. Сексте¹, Н. Д. Якушина¹, А. А. Лебедев¹, Н. В. Лавров², П. Д. Шабанов¹

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

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

Ключевые слова:

дезацилгрелин; экспрессия мРНК; грелиновый рецептор; рецептор дофамина; структуры мозга; онтогенез; алкоголизация.

Резюме

Целью настоящей работы явилось изучение уровня деацилгрелина в сыворотке крови и экспрессии мРНК грелинового рецептора в структурах мозга у крыс в онтогенезе в условиях хронической алкоголизации. Представлены результаты экспериментальных исследований, доказывающие, что пренатальное действие алкоголя негативно влияет на созревание ДА-ергической и грелиновой систем мозга, а так же вовлечение грелиновой системы в механизмы алкогольной зависимости. Наблюдается снижение экспрессии мРНК КОМТ, но увеличение экспрессии D2 длинной и короткой изоформ ДА-рецепторов и дисбаланс грелиновой системы. Алкоголизация матерей приводит к снижению уровня деацилгрелина в сыворотке в ранний постнатальный период у плодов, однако экспрессия мРНК рецептора грелина в мозге увеличивается. Хроническая алкоголизация взрослых крыс также влияет на грелиновую систему. В процессе алкоголизации происходит уменьшение содержания деацилгрелина в сыворотке крови с компенсаторным увеличением экспрессии грелинового рецептора в мозге. В условиях отмены алкоголя наблюдается увеличение содержания деацилгрелина (тенденция к нормализации).

В головном мозге существует специализированная система нейронов, дофаминергических (ДА-ергических) по своей химической организации, которая опосредует эффекты психостимулирующих средств [3, 4]. Эта система имеет довольно четкую структурно-функциональную организацию и включает передний мозговой пучок, прилежащее ядро, вентральную область покрышки и медиальную префронтальную кору [3, 4, 8]. Она описывается как мезокортиколимбическая система мозга. По сути, эта система является жестко детерминированной исполнительной системой, которая в большинстве случаев отвечает на раздражение активацией (вве-

дение психостимуляторов) или угнетением (поддействием, например, нейролептиков). Возможности изменения активности мезокортиколимбической системы повышаются при действии на нее различных нейромодуляторов, прежде всего, пептидной природы, рецепторы которых локализованы на аксонах ДА-ергической проводящей системы [2]. В последние годы в качестве возможного эндогенного нейромодулятора подкрепляющих систем мозга рассматривается нейропептид грелин и исследуется его роль в процессах алкогольной зависимости [10]. Первоначально считалось, что грелиновая система ответственна исключительно за контроль потребления пищи [12] и регуляцию энергетического баланса [6, 12]. Однако последними исследованиями, показано, что система грелина вовлекается не только в регуляцию аппетита, но и в подкрепляющие эффекты наркотических субстанций [1].

В настоящей работе исследовали уровень грелина в плазме крови и экспрессию мРНК грелинового рецептора в структурах мозга в онтогенезе у крыс, рожденных от алкоголизированных матерей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 62 крысы Вистар, полученные из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при температуре 22±2 °С. Все опыты проведены в осенне-зимний период.

Самок крыс подвергали полунасильственной хронической алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости при свободном доступе к брикетированному сухому корму, начиная с 1-го дня беременности до ее окончания (21–22-й день). Половину животных после рождения ими детенышей переводили на водный режим, вторую половину крыс продолжали алкоголизировать до 17-го дня постнатального развития крысят. Контролем служили 17 самок крыс, содержавшихся на обычном водном режиме. Дете-

■ Таблица 1. Структура праймеров и зондов для оценки уровня экспрессии генов рецептора грелина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

Ген	Название праймера, пробы	Нуклеотидная последовательность
Рецептор грелина	Прямой	5'-CCTGGTGTCTTTGTCCTCTTCTAC-3'
	Обратный	5'-GTTCTGCCTCCTCCCAAGTCCC-3'
	Зонд	JOE 5'-CTCCGCCATCGCTCATTGCTCTACACCC-3' BHQ-1
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	Прямой	5'-TGCACCACCACTGCTTAG-3'
	Обратный	5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3'
	Зонд	FAM 5'-ATCACGCCACAGCTTCCAGAGGG-3' BHQ-1

ныши, рожденные от них, служили контролем крыс, матери которых были подвергнуты алкоголизации. Беременных крыс на 13-й и 17-й дни гестации декапитировали, извлекали плоды, у них выделяли мозг на холоду, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения анализа. Аналогично выделяли мозг у крысят в возрасте 4-х, 10-ти и 17-ти дней жизни. У крысят так же тотально собирали вытекшую кровь.

Суммарную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol («Ambion», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб ДНКазой проводили с использованием ДНКазы («Promega», США) в полном соответствии с инструкцией производителя. После обработки ДНКазой концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре «Implen NanoPhotometer P330» («Implen», Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата. Для последующей работы пробы выравнивали по концентрации РНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием M-MuLV обратной транскриптазы («Promega», США). Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили методом Taq-Man с использованием Taq-полимеразы («Медиген», Россия) и специфических праймеров (табл. 1).

Расчет относительной экспрессии грелинового рецептора проводили по методу дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), используя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу в качестве нормировочного гена. Относительный уровень экспрессии гена грелинового рецептора рассчитывали по индуктивной формуле $R = 2^{-[\Delta\Delta\text{Ct}]}$ [7].

Концентрации дезацилгрелина в образцах сывороток крови определяли путем твердофазного иммуноферментного анализа с использованием готовой тест-системы «Rat unacylated ghrelin enzyme immunoassay kit» («SPI-BIO», Франция) в полном соответствии с инструкцией производителя.

Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ GraphPadPrizm v.4; SPSSSigmaStat 3,0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, критерии попарных сравнений групп Стьюдента–Ньюмена–Кейлса и Данна, критерий Краскела–Уоллиса). Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова — Смирнова. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Онтогенез грелиновой системы изучен недостаточно, а влияние алкоголя на ее развитие вообще не освещено в литературе. У грызунов грелин и мРНК рецептора грелина обнаруживаются в эмбрионах уже на стадии морулы и продолжают быть выраженными в процессе внутриутробного развития [5]. У крыс высокий уровень экспрессии мРНК грелина обнаруживается на 12-й день гестации, а на 17-й день плод содержит уже значительные уровни ацилированного и деацилированного грелина в крови [9, 11].

В пренатальный период концентрацию дезацилгрелина определить не удалось в связи с недостаточным количеством крови у плодов для постановки пробы. В наших экспериментах показано, что в раннем постнатальном развитии в физиологических условиях отмечается рост концентрации сывороточного дезацилгрелина (табл. 2).

Так, на 4-й день после рождения в контрольной группе содержание дезацилгрелина в сыворотке составляет $5,49 \pm 0,09$ нг/мл и на 17-й день достигает $9,50 \pm 2,29$ нг/мл. В группе плодов крыс, рожденных от матерей, употребляющих алкоголь на 17-й день

■ Таблица 2. Влияние алкоголизации матерей на содержание дезацилгрелина в сыворотке крови рожденных от них крысят в ранний постнатальный период (нг/мл)

	4-й день жизни	10-й день жизни	17-й день жизни
Контроль (потребляли воду)	$5,49 \pm 0,09$	$5,77 \pm 0,33$	$9,50 \pm 2,29$
Алкоголизация во время беременности и кормления	$5,41 \pm 0,06$	$5,41 \pm 0,06$	$5,36 \pm 0,05^*$
Отмена алкоголя после рождения детенышей	$5,44 \pm 0,04$	$5,50 \pm 0,13$	$5,69 \pm 0,19^*$

* — $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе

■ Таблица 3. Влияние алкоголизации крыс в период беременности на экспрессию мРНК рецептора грелина в структурах переднего мозга крысят в пренатальный и ранний постнатальный периоды (у. е.)

Пренатальный период			
	13-й день	17-й день	
Контроль (потребляли воду)	1,03±0,09	0,99±0,09	
Алкоголизация во время беременности	1,32±0,20	1,12±0,19	
Постнатальный период			
	4-й день жизни	10-й день жизни	17-й день жизни
Контроль (потребляли воду)	1,18±0,22	1,01±0,09	1,32±0,10
Алкоголизация во время беременности и кормления	1,14±0,09	1,36±0,19	1,97±0,25*
Отмена алкоголя после рождения детенышей	1,32±0,40	1,18±0,22	2,16±0,32*

* — p<0.05 по отношению к контрольной группе

* — $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе

после рождения выявлялось достоверное снижение уровня сывороточного грелина по сравнению с контролем соответственно до $5,36 \pm 0,05$ нг/мг при алкоголизации во время беременности и кормления и $5,69 \pm 0,19$ нг/мг при отмене алкоголя после рождения детенышей.

Алкоголизация матерей приводит к снижению уровня дезацилгрелина в сыворотке крови в ранний постнатальный период у плодов. Однако экспрессия мРНК грелина в мозге компенсаторно увеличивается только на 17-й день после рождения (табл. 3).

Это свидетельствует о нарушении формирования грелиновой системы и ее дисрегуляции. Видно, что в группе плодов, матери которых продолжали потреблять алкоголь после рождения детенышей, изменения были сильнее, чем в группе плодов, матери которых перешли на потребление воды после рождения детенышей (хотя и не достоверно).

Таким образом, в раннем постнатальном периоде при алкоголизации происходит дисрегуляция формирования грелиновой системы, что характеризуется снижением уровня грелина сыворотки и увеличением экспрессии мРНК рецептора в структурах мозга.

- Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta Ct]$ method. *Methods*; 2001; 25: 402–8.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W. et al. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 189–225.
- Nakahara K., Nakagawa M., Baba Y. et al. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*. 2006; 147: 1333–42.
- Perello M., Sakata I., Birnbaum S. et al. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry*. 2010; 67 (9): 880–6.
- Torsello A., Scibona B., Leo G. et al. Ontogeny and tissue-specific regulation of ghrelin mRNA expression suggest that ghrelin is primarily involved in the control of extraendocrine functions in the rat. *Neuroendocrinology*. 2003; 77: 91–9.
- Wren A. M., Small C. J., Ward H. L. et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000; 141 (11): 4325–8.

EFFECT OF MOTHER ALCOHOLIZATION ON THE ACTIVITY OF GHRELIN SYSTEM IN PRENATAL AND EARLY POSTNATAL PERIODS OF RAT OFF-SPRING

M. I. Airapetov, P. P. Khokhlov, E. R. Bychkov, E. A. Sekste, N. D. Yakushina, A. A. Lebedev, N. V. Lavrov, P. D. Shabanov

◆ **Summary:** The purpose of the paper was to study both the desacylghrelin (unacylated ghrelin) level in the blood serum and expression of mRNA ghrelin receptor in the brain structures in ontogeny after chronic alcoholization in rats. The results proved that the prenatal effect of ethanol negatively affected the maturation of dopaminergic and ghrelin systems of the brain as well as involvement of ghrelin system in mechanisms of alcohol dependence formation. The decrease of COMT mRNA expression simultaneously with the increase of expression of D2 long and short isoforms of dopaminergic receptors and misbalance of ghrelin system were observed. Alcoholization of mothers reduced desacylghrelin level in the blood serum in early postnatal period in offsprings although mRNA expression of ghrelin receptor in the brain was elevated. Chronic alcoholization of adult rats also affected the ghrelin system. In the alcoholization process, the reduced contents of desacylghrelin in the blood serum with compensatory increase of ghrelin receptor expression in the brain were registered. After withdrawal of ethanol, the recovery of desacylghrelin level (tendency to normalization) was observed.

ЛИТЕРАТУРА

- Айрапетов М. И., Сексте Э. А., Хохлов П. П. и др. Влияние хронической алкоголизации и отмены этанола на уровень экспрессии мРНК грелинового рецептора в мозге крыс. *Наркология*. 2013; 9 (141): 61–5.
- Лебедев А. А., Любимов А. В., Шабанов П. Д. Механизмы возобновления потребления наркотических веществ. *Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии*. 2011; 9 (4): 3–17.
- Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63(1): 182–217.
- Bjorklund A., Dunnett S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007; 30 (5): 194–202.
- Kawamura K., Sato N., Fukuda J. et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*. 2003; 144: 2623–33.
- Lall S., Tung L. Y. C., Ohlsson C. et al. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280 (1): 132–8.

◆ **Key words:** desacylgghrelin; expression of mRNA; ghrelin receptor; dopamine receptor; brain structures, ontogeny, alcoholization.

REFERENCES

1. Airapetov M.I., Sekste E.A., Khokhlov P.P. et al. Vliyanie khronicheskoy alkogolizatsii i otmeny etanola na uroven' ekspressii mRNK grelinovogo retseptora v mozge krysa [The effects of chronic alcoholization and withdrawal on mRNA level of grelin receptor in rat brain]. *Narkologia*. 2013; 9 (141): 61–5. (in Russian).
2. Lebedev A.A., Lyubimov A.V., Shabanov P.D. Mekhanizmy vobnovleniya potrebleniya narkogennykh veshchestv [The mechanisms of reinstatement of drug abuse craving] *Obz. Klin. Farmakologii i Lekarsvennoi Terapii*. 2011; 9 (4): 3–17. (in Russian).
3. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63 (1): 182–217.
4. Bjorklund A., Dunnett S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007; 30 (5): 194–202.
5. Kawamura K., Sato N., Fukuda J. et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Endocrinology*. 2003; 144: 2623–33.
6. Lall S., Tung L.Y.C., Ohlsson C. et al. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280 (1): 132–8.
7. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[-\Delta\Delta Ct]$ method. *Methods*. 2001; 25: 402–8.
8. Missale C., Nash S.R., Robinson S.W. et al. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 1998. 78: 189–225.
9. Nakahara K., Nakagawa M., Baba Y. et al. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*. 2006; 147: 1333–42.
10. Perello M., Sakata I., Birnbaum S. et al. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry*. 2010; 67 (9): 880–6.
11. Torsello A., Scibona B., Leo G. et al. Ontogeny and tissue-specific regulation of ghrelin mRNA expression suggest that ghrelin is primarily involved in the control of extraendocrine functions in the rat. *Neuroendocrinology*. 2003. 77: 91–9.
12. Wren A.M., Small C.J., Ward H.L. et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000; 141 (11): 4325–8.

◆ Информация об авторах

Айрапетов Марат Игоревич — младший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Хохлов Платон Платонович — к. биол. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

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

Сексте Эдгар Артурович — к. биол. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Якушина Наталья Дмитриевна — аспирант, отдел нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Лебедев Андрей Андреевич — д. биол. н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Лавров Никанор Васильевич — к. м. н., ассистент кафедры фармакологии. ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6.

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

Airapetov Marat Igorevich — Junior Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Khokhlov Platon Platonovich — PhD (Biochemistry), Senior Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia.

Bychkov Eugeny Rudolfovich — PhD (Biochemistry), Senior Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: bychkov@mail.ru.

Sekste Edgar Arturovich — PhD (Biochemistry), Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia.

Yakushina Natalia Dmitrievna — Post-Graduate Student, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia.

Lebedev Andrei Andreevich — Dr. Biol. Sci. (Pharmacology), Professor, Leading Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru.

Lavrov Nikanor Vasilievich — PhD (Pharmacology), Assistant Professor, Dept. of Pharmacology. S.M. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Doct. of Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.