

СОДЕРЖАНИЕ АКТГ И КРФ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АНТАГОНИСТОВ ОРЕКСИНА А ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

УДК 616-092.9+615.015.6

© П. М. Виноградов, И. Ю. Тиссен, П. П. Хохлов, Е. Р. Бычков, А. А. Лебедев, П. Д. Шабанов

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Ключевые слова:

алкоголизация; разные режимы; АКТГ; КРФ; антагонисты орексина; нейропептиды.

Резюме

В последнее время была продемонстрирована роль грелиновой и орексиновой систем в формировании алкогольной зависимости. Целью настоящего исследования было количественное сравнение концентраций кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) и адреноркортicotропного гормона (АКТГ) в экспериментальных моделях форсированной и хронической алкоголизации, а также выяснение фармакологического действия синтетического и рекомбинантного антагонистов орексина А на систему КРФ–АКТГ при экспериментальной алкоголизации. В работе использовали 89 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г. Экспериментальные животные были разделены на 10 групп, включая интактную, с хроническим и форсированным режимами алкоголизации, с интраназальным введением антагонистов орексина А на фоне алкоголизации и после отмены этанола. Хроническая (в течение 6 мес.) и форсированная (5 дней увеличивающимися дозами этанола до максимально переносимых доз) алкоголизация сходным образом повышала АКТГ и КРФ в крови. Отмена этанола снижала уровень обоих гормонов в крови. Интраназальное введение антагонистов орексина А (синтетического и рекомбинантного) умеренно снижало концентрации АКТГ и КРФ в сыворотке крови, в большей степени при форсированном режиме алкоголизации. В целом, системное действие антагонистов орексина А на центральные механизмы стресса при интраназальном введении препаратов выражено слабо. Значительных нарушений системы АКТГ–КРФ, как при различных вариантах алкоголизации, так и при интраназальном введении антагонистов орексина не наблюдается.

В настоящее время установлено, что в формирование аддикции вовлечен ряд сигнальных путей, причем в различных случаях зависимости эти пути могут быть различными [1, 2, 5]. В частности, в формировании алкогольной аддикции участвуют сигнальные системы грелинов, орексинов, нейропептида Y, рилизинг-факторов гипофизарных тропных гормонов и другие [1, 2, 4].

Работами последних лет продемонстрирован факт участия грелиновой и орексиновой систем

в формировании алкогольной зависимости. В тоже время следует констатировать, что изучение роли грелиновой и орексиновой и других пептидергических систем в механизмах подкрепления и формировании алкогольной аддикции только начинается. При этом немногочисленные исследования в этой области говорят о перспективности экспериментальных исследований значения указанных пептидергических систем в аддикции и возможности фармакологической коррекции элементов зависимости с помощью антагонистов пептидных медиаторов/модуляторов [1, 3, 6].

При фармакологическом воздействии на орексиновую сигнальную систему важно также оценить различия в реакции организма в зависимости от способа введения фармакологического препарата. Традиционным для нейротропных препаратов считают системное введение: внутривенное или внутрибрюшинное (в экспериментальных условиях). Нередко при таком введении системный или висцеральный эффекты превалируют над центральным эффектом в ЦНС. Недавно появившиеся результаты об успешном действии нейроактивных пептидов при интраназальном введении параллельно со снижением побочного системного и висцерального воздействия пептидных препаратов требуют обратить внимание на данный аспект исследования [1, 3, 5, 7].

Целью настоящего исследования было проведение количественного сравнения концентраций кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) и адреноркортicotропного гормона (АКТГ) в крови при разных способах алкоголизации: форсированном режиме и хронической алкоголизации. Параллельную задачу составляло выяснение фармакологического действия синтетического и рекомбинантного антагонистов орексина А на систему КРФ — АКТГ на фоне экспериментальной алкоголизации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали 89 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г, полученных из питомника Рапполово ПАМН (Ленинградская область). В экспериментальных группах число животных составляло от 8 до 10 особей. 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 весенне-летний период. 28 крысам этанол вводили внутривентрально, 50 крыс в течение 6 месяцев подвергали полунасильственной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Животные контрольной группы в качестве источника жидкости получали воду. Экспериментальные животные были разделены на 10 групп, включая контрольную (получали воду), с хронической (в течение 6 мес.) алкоголизацией и форсированным режимом алкоголизации (этанол вводили 5 дней возрастающими вдвое дозами с 0,5 г/кг до 8 г/кг), с введением синтетического антагониста орексина А SB-4081245 мкг интраназально, с введением рекомбинантного антагониста орексина АНТ35 мкг интраназально, а также в сходных условиях эксперимента, но с отменой этанола и определением концентраций КРФ и АКТГ на 2-е и 7-е сутки после отмены. Использовали два антагониста орексина А: синтетический SB-408124 (Сигма, США) и рекомбинантный (АНТ3, получен в ФГБНУ «ИЭМ»), которые вводили в дозе 5 мкг интраназально в течение 5 дней. Обозначения групп представлены в таблице 1.

Экспериментальных животных декапитировали непосредственно после алкоголизации или алкоголизации и введения препаратов (группы II, III, IV, VIII), или через 2 и 7 суток после отмены алкоголя (группы V–VII, IX и X). Непосредственно после декапитации тотально собирали аутопсийную кровь, инкубировали в течение 30 мин при +4 °С и далее центрифугировали при температуре +4 °С и ускорении 300 г в течение 10 мин. Полученные образцы сыворотки крови замораживали и хранили при –90 °С до проведения иммуноферментного анализа.

Концентрации АКТГ и КРФ в образцах сывороток крови определяли путем высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы S-1181 CRF (human, mouse, rat) enzyme immunoassay kit: Extraction Free. Peninsuls laboratories, LLC (США). Концентрация АКТГ была определена также путем высокочувствительного твердофазного ИФА с использованием тест-системы S-1130 АСНТ (mouse, rat) enzyme immunoassay kit. Peninsuls laboratories, LLC (США). 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. План статистического анализа состоял из описательной и сравнительной статистик. В описательной статистике были вычислены: медиана, среднее, стандартное отклонение, ошибка среднего, 95%-ный доверительный интервал. Проводили проверку гипотезы о нормальности распределения при помощи критерия нормальности Колмогорова–Смирнова.

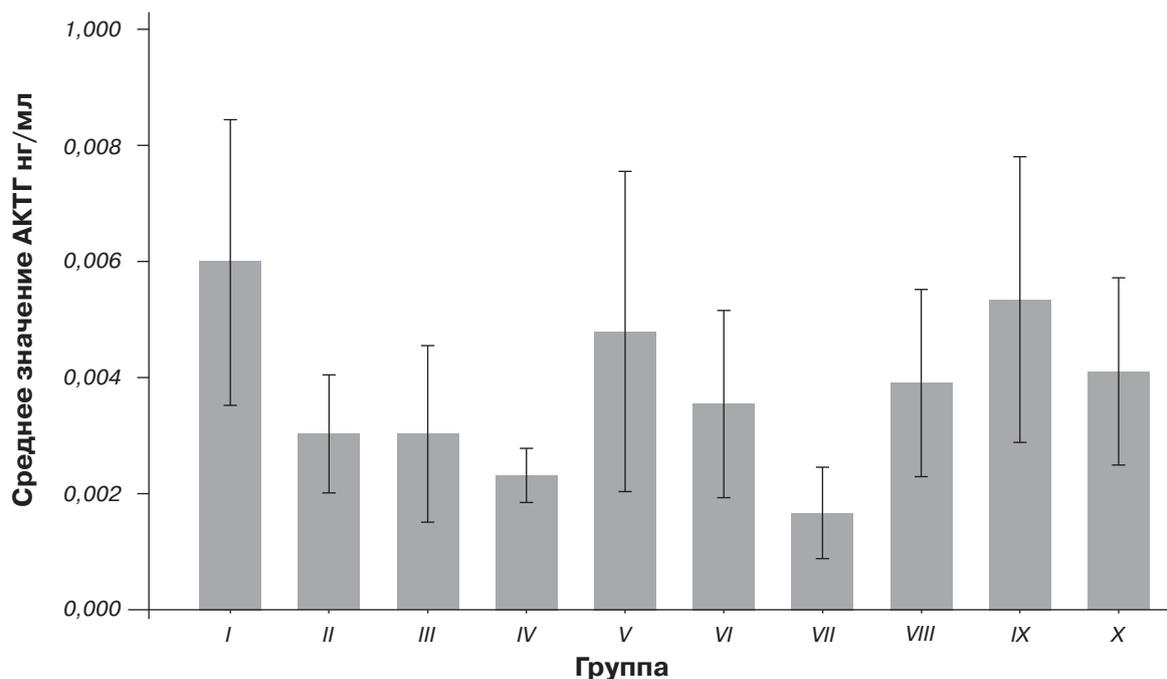
Данный анализ показал нормальное распределение во всех группах. Сравнительный анализ был выполнен при помощи дисперсионного анализа (ANOVA). В качестве уточняющего статистического показателя был проведен апостериорный анализ (post-hoc) при помощи критерия Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Всего в эксперименте были использованы 89 животных, в том числе в контрольную группу вошли 9 крыс, которые получали воду. Все экспериментальные животные были разбиты на 10 групп. Животные I–VII группы были обследованы непосредственно после процедуры алкоголизации (форсированный

■ Таблица 1. Группы экспериментальных животных

Экспериментальные группы	Обозначения
Контрольная группа (вода)	I
Форсированное введение алкоголя в возрастающих дозах с 0,5 г/кг до 8 г/кг внутривентрально, 5 дней	II
Форсированное введение алкоголя в возрастающих дозах внутривентрально + антагонист орексина А SB-4081245 мкг интраназально, 5 дней	III
Форсированное введение алкоголя в возрастающих дозах внутривентрально + антагонист орексина А АНТ3 (рекомбинантный) 5 мкг интраназально, 5 дней	IV
Форсированное введение алкоголя внутривентрально с отменой этанола, 2 сутки	V
Форсированное введение алкоголя в возрастающих дозах внутривентрально + антагонист орексина А SB-4081245 мкг интраназально 5 дней + отмена этанола, 2 сутки	VI
Форсированное введение алкоголя в возрастающих дозах внутривентрально + антагонист орексина А АНТ35 мкг интраназально 5 дней + отмена этанола, 2 сутки	VII
Хроническая алкоголизация (6 мес.) 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости	VIII
Хроническая алкоголизация (6 мес.) с отменой этанола, 2-е сутки	IX
Хроническая алкоголизация (6 мес.) с отменой этанола, 7-е сутки	X



Столбцы ошибок: 95% дов. инт.

■ Рисунок 1. Влияние алкоголизации и ее отмены на содержание АКТГ (нг/мл)

вариант алкоголизации и форсированная алкоголизация с отменой алкоголя). Животных VIII–X групп обследовали после двух или семи суток отмены этанола после хронической алкоголизации.

Для животных контрольной группы средние значения концентрации КРФ и АКТГ составили $2,401 \pm 0,66$ нг/мл и $0,574 \pm 0,24$ нг/мл соответственно. Для того чтобы оценить значимость статистических различий между группами, была проведена оценка соответствия распределений в группах нормальному (гауссовому) путем использования критерия нормальности Колмогорова–Смирнова. Вследствие малого и неоднородного объема выборок в группах с учетом отрицательных показателей критерия нормальности было сочтено целесообразным использование непараметрических критериев сравнения, в частности ANOVA.

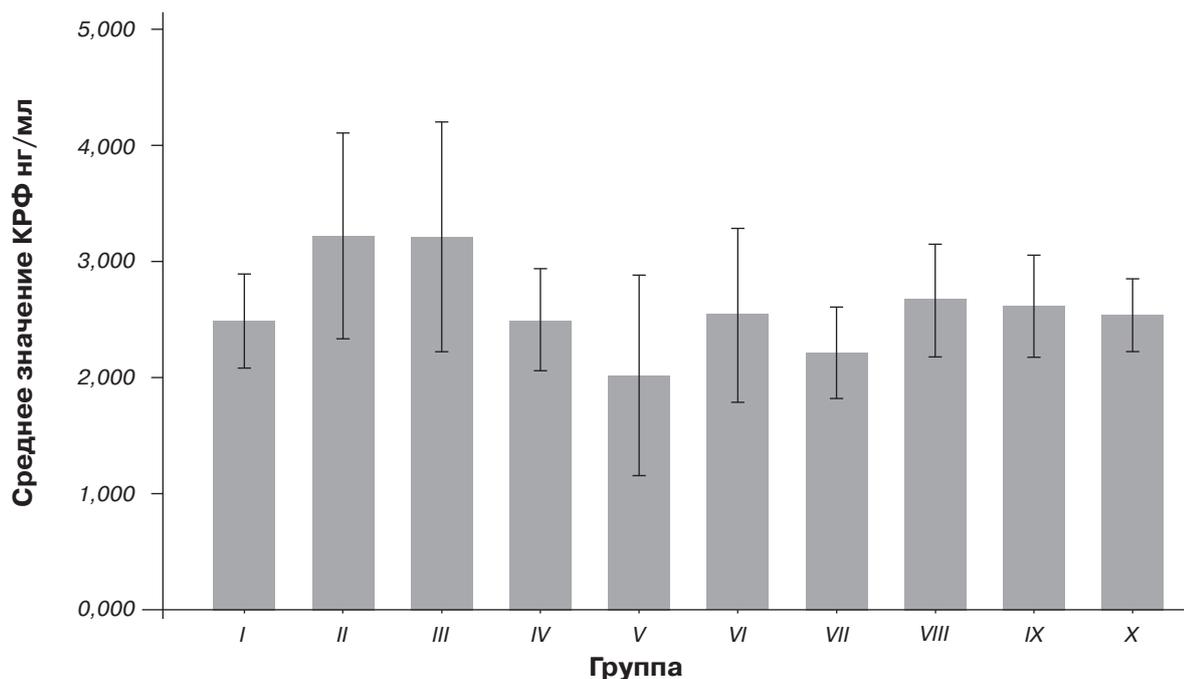
Средние значения концентраций КРФ для алкоголизации в форсированном режиме $3,16 \pm 0,64$ нг/мл и полупринудительной алкоголизации $2,59 \pm 0,34$ нг/мл не демонстрировали значимых различий для рассматриваемых экспериментальных групп. То же самое следует сказать о содержании АКТГ, которое соответствовало $0,28 \pm 0,086$ нг/мл для форсированного режима и $0,50 \pm 0,34$ нг/мл для хронической (6 мес.) алкоголизации. Проведение алкоголизации как в форсированном, так и в длительном хроническом режиме приводило к практически одинаковому возрастанию уровней обоих гормонов (рис. 1 и 2).

Интраназальное введение синтетического антагониста не влияло на эффект алкоголизации, проведенной в форсированном режиме, по показателям содержания АКТГ и КРФ. Введение рекомбинантного антагониста также не снижало эффекта алкоголизации в форсированном режиме.

Проведенные эксперименты и последующая обработка данных показали, что в ходе экспериментальной хронической алкоголизации концентрация АКТГ и КРФ в сыворотках имела тенденцию к повышению, хотя различия не были статистически значимы, скорее всего в силу малого объема выборки. Также была определена корреляция для переменных концентраций КРФ и АКТГ. Результаты проведенного анализа показали наличие положительной корреляционной зависимости для контрольной группы, группы форсированной алкоголизации и группы хронической алкоголизации. Уровни статистической значимости корреляций составили, соответственно, $p=0,01$, $p=0,02$ и $p=0,022$.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время нейроэндокринологи различают гипофизарное и экстрагипофизарное действие КРФ [1, 2, 4]. Под гипофизарным действием понимают стимуляцию продукции АКТГ клетками аденогипофиза с последующей активацией всей оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники. Под экстрагипофизарным действием КРФ понимают активацию сигнальных путей посредством связывания КРФ с рецепторами в различных отделах головного мозга. Одновременно проведенное в единой серии опытов определение КРФ и АКТГ позволило оценить, насколько различные формы экспериментальной алкоголизации затрагивают систему КРФ–АКТГ, т. е. гипофизарную составляющую действия КРФ. Как показали проведенные экспериментальные исследования, имеет место практически одинаковое возрастание уровня КРФ и АКТГ в сыворотке, как при алкоголизации в форсированном режиме, так



Столбцы ошибок: 95 % дов. инт.

■ Рисунок 2. Влияние алкоголизации и ее отмены на содержание КРФ (нг/мл)

и длительной хронической алкоголизации. Полученные данные говорят о том, что система КРФ–АКТГ реагирует на алкоголизацию слабее по сравнению с изученной ранее грелиновой системой [2, 3]. Соответственно, КРФ и АКТГ представляют собой менее эффективные индикаторы алкоголизации, чем, например, неацилированный грелин, способный связываться в том числе и с рецепторами КРФ в головном мозге.

В результате интраназального введения синтетического и рекомбинантного антагониста орексина А отмечено незначительное, статистически незначимое снижение концентраций КРФ и АКТГ по сравнению с животными, подвергнутыми алкоголизации в форсированном режиме. Данный факт можно интерпретировать как отсутствие заметного системного воздействия в отношении системы КРФ — АКТГ при интраназальном введении антагонистов орексина А. Тем самым подтверждается мнение о том, что интраназальное введение нейроактивных пептидов позволяет минимизировать побочные системные и периферические воздействия нейротропных препаратов за пределами ЦНС [5, 6].

ВЫВОДЫ

1. Хроническая (в течение 6 мес.) и форсированная (введение алкоголя в возрастающих дозах до максимально переносимых) алкоголизация повышает содержание АКТГ и КРФ в крови практически на одинаковую величину.
2. Отмена этанола после форсированной или хронической алкоголизации приводит к снижению повышенного уровня обоих гормонов вследствие алкоголизации.

3. Антагонисты орексина А (синтетический и рекомбинантный) при интраназальном введении умеренно снижают концентрации КРФ и АКТГ, повышенные при алкоголизации.
4. Система КРФ–АКТГ отличается высокой устойчивостью при алкоголизации, а также введении антагонистов орексина А.

Благодарность

Авторы статьи выражают благодарность Е. А. Боткину за помощь в статистическом анализе данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хохлов П. П., Лебедев А. А., Бычков Е. Р., Роик Р. О., Шабанов П. Д. Динамика содержания дезацелированной формы грелина в сыворотке крови крыс при хронической алкоголизации: поиск маркеров алкоголизации в исследовании с малыми выборками и разными методами статистической обработки. Наркология. 2014; 3: 23–8.
2. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Стрельцов В. Ф. Гормональные механизмы подкрепления. СПб.: Н-Л, 2008. 278 с.
3. Aréchiga-Ceballos F., Alvarez-Salas E., Matamoros-Trejo G., Amaya M. I., García-Luna C., de Gortari P. Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. J. Endocrinol. 2014; 221 (1): 77–88.
4. Chapman C. D., Frey W. H., Craft S., Danielyan L., Hall-schmid M., Schiöth H. B., Benedict C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. Pharm. Res. 2013; 30: 2475–84.
5. Khokhlov P. P., Bychkov E. R., Lebedev A. A., Shabanov P. D. Ghrelin and steroid hormones in serum of the chronically alcoholized rats. Eur. Neuropsychopharmacol. 2013; 23 (Suppl. 2): S552–S553.
6. Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. J. Biochem. 2012; 151 (2): 119–28.

7. Stamatelou F., Deligeorgiou E., Vrachnis N., Iliodromiti S., Iliodromiti Z., Sifakis S., Farmakides G., Creatsas G. Corticotropin-releasing hormone and progesterone plasma levels association with the onset and progression of labor. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2013; 40 (4): 568–71.
8. Vengeliene V., Bilbao A., Molander A., Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Brit. J. Pharmacol.* 2008; 154: 299–315.
9. Vinogradov P. M., Tissen I. Y., Khokhlov P. P., Bychkov E. R., Botkin E. A., Lebedev A. A., Shabanov P. D. Hormones of Hypothalamus–Pituitary–Adrenal axis in experimental alcoholization and after Administration of Orexin A antagonists. *Steroids and Nervous System. 8th Int. Meet. Torino–Orbassano, Italy, 2015*; 181–2.

CONTENTS OF ACTH AND CRF IN THE RAT BLOOD SERUM AFTER ADMINISTRATION OF OREXIN A ANTAGONISTS IN EXPERIMENTAL ALCOHOLIZATION

P. M. Vinogradov, I. Yu. Tissen, P. P. Khokhlov, E. R. Bychkov, A. A. Lebedev, P. D. Shabanov

◆ **Summary:** In recent years, the role of ghrelin and orexin systems in the formation of alcoholic addiction has been demonstrated. The aim of the present investigation was to compare quantitatively the CRF and ACTH blood concentrations in the forced and chronic models of alcoholization, as well as the assessment of pharmacological action of synthetic and recombinant antagonists of orexin A on the system CRF–ACTH after experimental alcohol abuse. 89 adult male Wistar rats weighing 250–300 g Wistar were used in the experiment. All experimental animals were divided into 10 groups: intact, with chronic and forced alcoholization, with intranasal administration of orexin A antagonists on alcoholization process and after its withdrawal. The chronic (during 6 months) and forced (5 days by means of elevating doses up to maximal ones) alcoholization slightly increased ACTH and CRF levels in the blood serum. The withdrawal of ethanol decreased the hormones level. Intranasal administration of orexin A antagonists (both synthetic and recombinant) slightly decreased the ACTH and CRF concentrations in the blood, in more degree after the forced alcoholization. In general, the systemic action of orexin A antagonists on the central stress mechanisms were expressed in little degree. The significant disorders in the ACTH–CRF system were not registered also, both after different regimens of alcoholizations and after intranasal administrations of orexin A antagonists.

◆ Информация об авторах

Виноградов Петр Михайлович — аспирант отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Тиссен Илья Юрьевич — аспирант 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.

◆ **Key words:** alcoholization; different regimens; ACTH; CRF; orexin antagonists; neuropeptides.

REFERENCES

1. Khokhlov P. P., Lebedev A. A., Bychkov E. R., Roik R. O., Shabanov P. D. Dinamika sodержaniya dezatsilirovannoy formy grelina v syvorotke krovi kryis pri khronicheskoy alkogolizatsii: poisk markerov alkogolizatsii v issledovanii s malymi vyborkami i raznymi metodami statisticheskoy obrabotki [Dynamics of desacylated form of ghrelin in the blood serum of rats with chronic alcohol abuse: the search for markers of alcohol abuse in the study with a small sample size and different methods of statistical processing]. *Narkologia.* 2014; 3: 23–8. (in Russian).
2. Shabanov P. D., Lebedev A. A., Streltsov V. F. Gormonal'nye mekhanizmy podkrepleniya [Hormonal mechanisms of reinforcement]. SPb.: N-L, 2008. 278 p. (in Russian)
3. Aréchiga-Ceballos F., Alvarez-Salas E., Matamoros-Trejo G., Amaya M. I., García-Luna C., de Gortari P. Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *J. Endocrinol.* 2014; 221 (1): 77–88.
4. Chapman C. D., Frey W. H., Craft S., Danielyan L., Hall-schmid M., Schiöth H. B., Benedict C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm. Res.* 2013; 30: 2475–84.
5. Khokhlov P. P., Bychkov E. R., Lebedev A. A., Shabanov P. D. Ghrelin and steroid hormones in serum of the chronically alcoholized rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2013; 23 (Suppl. 2): S552–S553.
6. Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* 2012; 151 (2): 119–28.
7. Stamatelou F., Deligeorgiou E., Vrachnis N., Iliodromiti S., Iliodromiti Z., Sifakis S., Farmakides G., Creatsas G. Corticotropin-releasing hormone and progesterone plasma levels association with the onset and progression of labor. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2013; 40 (4): 568–71.
8. Vengeliene V., Bilbao A., Molander A., Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Brit. J. Pharmacol.* 2008; 154: 299–315.
9. Vinogradov P. M., Tissen I. Y., Khokhlov P. P., Bychkov E. R., Botkin E. A., Lebedev A. A., Shabanov P. D. Hormones of Hypothalamus–Pituitary–Adrenal axis in experimental alcoholization and after Administration of Orexin A antagonists. *Steroids and Nervous System. 8th Int. Meet. Torino–Orbassano, Italy, 2015*; 181–2.

Vinogradov Petr Mikhailovich — Post-Graduate Student, S. V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Tissen Ilya Yurievich — Post-Graduate Student, 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.

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.

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.

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.

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.