

АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ ГРЕЛИНА [D-LYS³]-GHRP-6 СНИЖАЕТ ЭКСПРЕССИЮ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ ПРЕДПОЧТЕНИЯ МЕСТА ЭТАНОЛА У КРЫС

УДК 616-092.9+615.015.6

© П. М. Виноградов, И. Ю. Тиссен, А. А. Лебедев, Е. Р. Бычков, Е. А. Боткин, Н. В. Лавров, П. Д. Шабанов

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Ключевые слова:

грелин, [D-Lys³]-GHRP-6; условная реакция предпочтения места; подкрепление; эмоции.

Резюме

Грелин, гормон пептидной природы, синтезируется в желудке и секретируется в общий кровоток. Он является системным гормоном голода и увеличивает потребление пищи. Наибольшее внимание исследователей нейронаук связано с ацилированной формой грелина, которая является специфическим лигандом для рецепторов подкорковых ядер головного мозга. Целью настоящего исследования был анализ действия грелина и его антагонистов на экспрессию условной реакции предпочтения места (УРПМ) этанола. Для выработки УРПМ алкоголя у крыс использовали двухкамерную установку. В последний день выработки УРПМ животные проводили в ассоциированной с введением алкоголя камере 74 % времени эксперимента. У крыс, получавших интраназально антагонист рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 (10 мкг), наблюдали снижение пребывания в камере, ассоциированной с алкоголем, до 46% времени эксперимента ($p < 0,05$). Крысы, получавшие интраназально грелин, проводили в камере, ассоциированной с алкоголем, до 60 % времени. Затем производили угашение УРПМ в течение семи дней, которое заключалось в ежедневном тестировании УРПМ без введения алкоголя и иных препаратов. На 7-й день угашения УРПМ не регистрировалась. На 14-й день эксперимента (после 7 суток угашения УРПМ) производили введение этанола, и регистрировали возобновление УРПМ. Части животных вводили антагонист рецепторов GHS-R1A грелина 10 мкг в 20 мкл интраназально за 5 минут до введения этанола для определения влияния на возобновление УРПМ. Животные, получавшие антагонист рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 параллельно с этанолом, проводили 50% времени в камере, ассоциированной с алкоголем, т.е. возобновления УРПМ этанола не происходило. Таким образом, показана важная роль грелина в механизмах подкрепляющего действия алкоголя и перспектива использования антагонистов грелина в коррекции патологического влечения к алкоголю.

Грелин участвует в регуляции пищевого поведения и веса тела, перистальтики желудка и кишечника,

эндокринной функции, регуляции метаболизма липидов и глюкозы, а также в формировании наркотической и алкогольной зависимости [30, 36, 40]. Грелин — это желудочный гормон пептидной природы, содержащий 28 аминокислотных остатков, полученный последовательной протеолитической деградацией белкового предшественника препрогрелина и прогрелина. В плазме грелин существует в двух формах: ацилированный (ацилированный) грелин и деацетилированный грелин (дезацилгрелин). Также обнаружена еще одна форма — обестатин, которая к настоящему времени мало изучена. Посттрансляционное ацилирование грелина, по-видимому, необходимо для повышения его функциональной активности.

Наибольшее внимание исследователей в области нейронаук было обращено именно к ацилированной форме грелина, специфическому лиганду к рецепторам головного мозга [12, 29]. В последнее время дезацилгрелину отводят роль в реализации механизмов системной и местной регуляции функций [35]. Механизмы, посредством которых грелин обеспечивает свои физиологические эффекты, до конца не изучены. В физиологических условиях грелин является системным гормоном голода и увеличивает потребление пищи через активацию орексигенных нейрональных систем в дугообразном ядре гипоталамуса [8, 13]. У грызунов как системное, так и центральное введение высоких доз грелина вызывают быстрый орексигенный ответ [7, 40], а хроническая активация его рецепторов или введение синтетического стимулятора секреции гормона роста повышает массу жира у грызунов [14, 36, 30]. Уровень грелина повышается перед приемом пищи и коррелирует с уровнем голода здоровых субъектов [10, 11, 37, 38]. Это указывает на то, что в физиологических условиях острые изменения уровня грелина могут играть роль в регуляции потребления пищи и/или выполнять роль циркулирующего в крови гормона голода. В исследованиях на грызунах орексигенные эффекты грелина были выявлены при введении в отдельные области мозга, в частности в гипоталамус, в ядро одиночного пути ствола мозга, в центральное ядро миндалины и в мезолимбические дофаминергические структуры (вентральную область покрышки и прилежащее

ядро) [16, 32, 33, 38, 39]. Грелин увеличивает потребление пищи, активируя гипоталамус, ствол мозга и систему подкрепления [15, 16, 34]. Определение обратных связей механизма подкрепления как ключевой функции грелина привело к пониманию его роли в аддикции [16, 25, 28]. Системное введение антагониста GHS-R1A рецепторов грелина ослабляет подкрепляющие свойства амфетамина и кокаина [22]. Ограничение потребления пищи, вызывающее повышение уровня грелина, также увеличивает и вызванную амфетамином и кокаином локомоторную активность, усиливает поведение поиска кокаина и повышает самовведение кокаина и амфетамина у крыс [18]. В экспериментах с применением антагонистов GHS-R1A рецепторов у крыс было показано снижение подкрепляющих свойств этанола, которые трактовали по изменению обмена дофамина в прилежащем ядре, локомоторному поведению в актометре и выработке УРПМ. Введение грелина (внутрижелудочковое или локальное в латеродорзальную или вентральную область покрышки) повышает потребление алкоголя у мышей [25]. Действие грелина у грызунов, которые потребляли алкоголь, наиболее выражено, так как введение грелина крысам, не потреблявшим ранее алкоголь, незначительно повышает его потребление [31]. Таким образом, грелин и его рецепторы GHS-R1A могут включаться в регуляцию потребления и поиска подкрепляющих агентов среды. Поэтому лечение пациентов с алкогольной зависимостью с помощью фармакологических веществ, действующих на грелиновую систему, может оказаться перспективным направлением современной психофармакологии и биологической наркологии. Целью настоящего исследования был анализ действия грелина и его антагониста на экспрессию условной реакции предпочтения места (УРПМ) этанола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали 26 половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г, полученных 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 освещения в течение 8.00–20.00 при температуре 22 ± 2 °С. Все опыты проведены в весенне-летний период.

Тестирование животных. В качестве метода моделирования элементов зависимости (аддикции) была использована методика условной реакции предпочтения места (УРПМ). Для выработки УРПМ этанола у крыс использовали двухкамерную установку с гладким и решетчатым полами [1, 3, 4]. Во время выработки УРПМ животных последовательно помещали в две камеры, разделенные между собой перегородкой на 30 мин с интервалом между посадками 1 ч в течение 4 дней. В течение 1 ч между

посадками крыс содержали в домашней клетке. Перед посадкой в 1-ую камеру крысы получали внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора, перед посадкой во 2-ую камеру животным внутрибрюшинно вводили этанол в дозе 0,5 г/кг. Контрольной группе во 2-й камере вводили физиологический раствор. Для исключения влияния текстуры пола на выработку УРПМ этанола животных экспериментальной группы разделяли на две подгруппы. Крысы 1-й подгруппы первоначально помещались в отсек с решетчатым полом, 2-й подгруппы — с гладким полом. Для оценки выработки УРПМ этанола у животных на 5-й день эксперимента регистрировали время нахождения в отсеках с различной текстурой пола в течение 15 мин в условиях беспрепятственного перемещения крыс в 2-камерной установке. Полученные данные представляли в процентах по времени пребывания в отсеке, ассоциированном с введением алкоголя, к общему времени исследования. В последующих экспериментах использовали животных, которые проводили более 60% времени в отсеке, ассоциированном с алкоголем (предпочтение места). Данные животные на 6-й день эксперимента получали интраназально антагонист рецепторов GHS-R1A грелина [D-Lys³]-GHRP-6 10 мкг (в 20 мкл) интраназально за 5 мин до алкоголизации. Контрольные животные интраназально получали аналогичную дозу физиологического раствора. Затем производилось угашение УРПМ в течение семи дней, которое заключалось в ежедневном тестировании УРПМ без введения алкоголя и иных препаратов. На 7-й угашения день УРПМ не воспроизводилась. На 14-й день эксперимента (после 7 суток угашения УРПМ) производили введение этанола 0,5 г/кг, что приводило к возобновлению УРПМ, т.е. восстановлению предпочтения камеры, ассоциированной с алкоголем. Части животных вводили антагонист рецепторов GHS-R1A грелина 10 мкг в 20 мкл интраназально за 5 минут до введения этанола для определения влияния на возобновление УРПМ.

Фармакологические средства. В работе были использованы следующие фармакологические агенты: этанол, который вводили внутрибрюшинно в дозе 0,5 мг/кг; грелин и антагонист грелиновых GHS-R1A рецепторов [D-Lys³]-GHRP-6 (Tocris, England), которые разводили в воде из расчета 0,5 мг/мл и вводили интраназально в дозе 10 мкг (в 20 мкл, по 10 мкл в каждую ноздрю). Контролем служил 0,9%-ный раствор хлорида натрия.

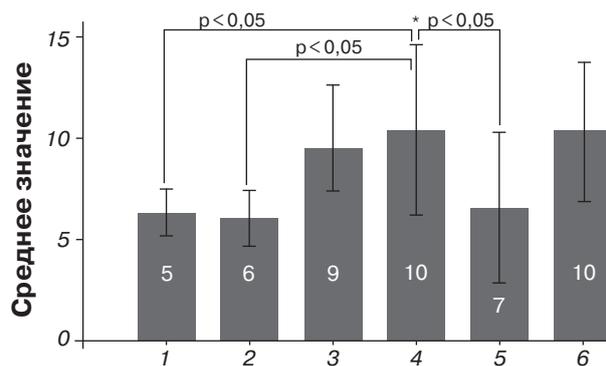
Статистика. Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ Graph Pad Prizm v.5, SPSS SigmaStat 3.0 и Minitab 14. Для оценки соответствия распределений случайных величин гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова–Смирнова. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона для парных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из 26 крыс в экспериментальную группу, у которой удалось выработать УРПМ этанола, вошли 17 животных. Из 17 животных 6 составили контрольную группу, 7 — получали интраназально грелин, 8 — получали интраназально антагонист рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 (рис. 1).

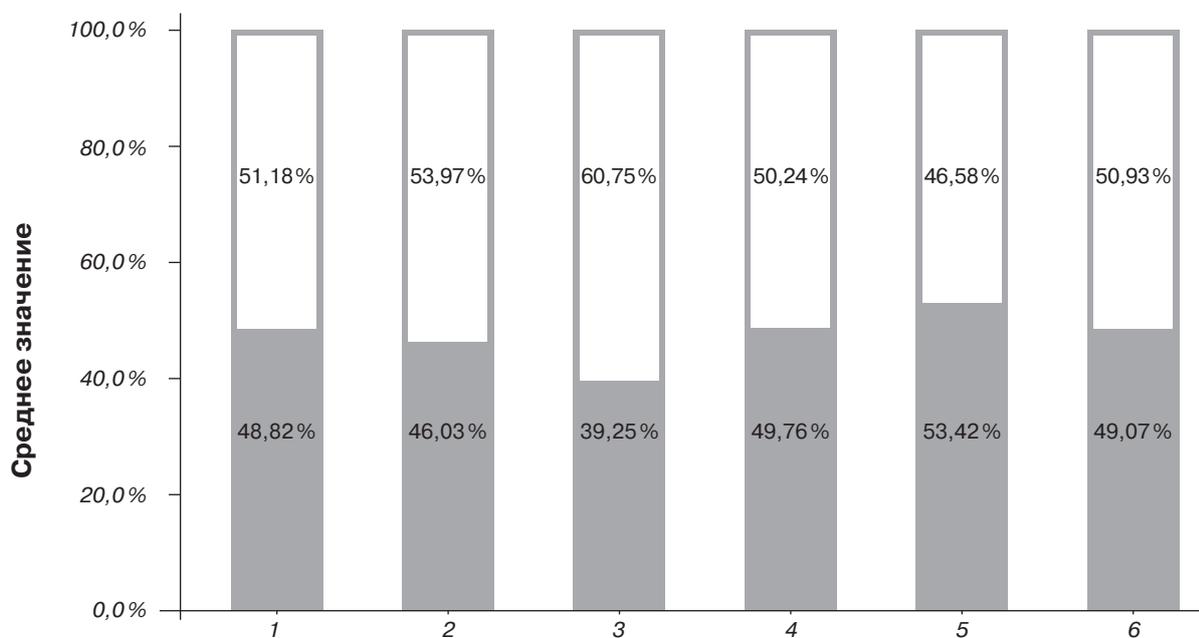
Крысы, вошедшие в экспериментальную группу, проводили в ассоциированной с введением алкоголя камере в среднем $74,1 \pm 11,7\%$ времени эксперимента ($p < 0,05$). Животные с выработанной УРПМ этанола, получавшие интраназально 20 мкл физиологического раствора (активный контроль), проводили в камере, ассоциированной с алкоголем, в среднем 461 ± 51 с ($51,2\%$ времени эксперимента), демонстрируя тем самым сохранение реакции предпочтения места. Крысы, получавшие антагонист рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6, снизили среднее пребывание в камере, ассоциированной с алкоголем, до 419 ± 103 секунды ($46,6\%$ времени). У крыс, получавших интраназально грелин 10 мкг, наблюдали повышение времени пребывания в камере, ассоциированной с алкоголем, до $546,71 \pm 131,05$ с ($60,75\%$ времени).

Тест угашения УРПМ этанола показал, что в камере, ассоциированной с введением этанола, животные проводили $473,0 \pm 5,2$ с ($52,3\%$ времени эксперимента). После введения этанола крысы демонстрировали возобновление УРПМ (проводили в ассоциированной с введением алкоголя камере в среднем $71,1 \pm 10,2\%$ времени эксперимента, $p < 0,05$). Животные, получавшие антагонист



■ Рисунок 2. Число переходов в камеру 2-камерной установки, где проводили выработку УРПМ этанола. 1 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении физиологического раствора; 2 — возобновление УРПМ при интраназальном введении физиологического раствора; 3 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении грелина; 4 — возобновление УРПМ при интраназальном введении грелина; 5 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении антагониста грелина; 6 — возобновление УРПМ при интраназальном введении антагониста грелина

рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6, находились в ассоциированной с введением алкоголя камере $458,4 \pm 96,2$ с ($50,9\%$ времени). Время нахождения животных, получавших грелин и этанол, в данной камере составило $452,17 \pm 122,4$ с ($50,2\%$ общего времени), демонстрируя спектр реакций от резкого предпочтения до избегания места введения этанола. Более наглядно полученные данные иллюстрируют показатели переходов в предпочитаемую камеру 2-камерной установки после введения исследованных фармакологических агентов (рис. 2).



■ Рисунок 1. Время нахождения крыс в 2-камерной установке при экспрессии УРПМ. Белым цветом обозначены значения, соответствующие времени нахождения в камере, ассоциированной с введением этанола. Темное поле соответствует значениям времени нахождения в камере, ассоциированной с введением физиологического раствора. Цифры означают процент нахождения животного в камере от общего времени нахождения в установке. 1 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении физиологического раствора; 2 — возобновление УРПМ при интраназальном введении физиологического раствора; 3 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении грелина; 4 — возобновление УРПМ при интраназальном введении грелина; 5 — экспрессия УРПМ при интраназальном введении антагониста грелина; 6 — возобновление УРПМ при интраназальном введении антагониста грелина

Видно, что интраназальное введение грелина способствует поддержанию и возобновлению УРПМ (группы 3 и 4, число переходов 9 и 10 соответственно). Напротив, выработка УРПМ заметно замедлялась после введения антагониста рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 (группа 5, число переходов 7, $p < 0,05$ по отношению к грелиновой группе), хотя антагонист грелина по данному показателю достоверно не влиял на возобновление УРПМ.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, в настоящей работе показано, что интраназальное введение пептидного антагониста грелина [D-Lys³]-GHRP-6 в дозе 10 мкг блокировало экспрессию УРПМ этанола на 30% ($p < 0,05$). Экспрессия УРПМ этанола после двух дней ее угашения также снижалась антагонистом грелина [D-Lys³]-GHRP-6 на 35–40%. Это согласуется с литературными данными. В частности, было показано, что грелиновая система в головном мозге вовлекается в процессы внутримозгового подкрепления, активируемого наркотическими веществами [16, 25, 28, 34]. Так, введение антагониста GHS-R1A рецепторов грелина [D-Lys³]-GHRP-6 значительно снижало подкрепляющие свойства амфетамина, а также психомоторного стимулятора кокаина [6, 27].

Внутрибрюшинное введение этанола в диапазоне доз от 0,5 до 1,5 г/кг может активировать как подкрепляющие, так и аверсивные механизмы, что, возможно, связано с индивидуальными особенностями животных в исследуемой неоднородной популяции [2, 5]. В настоящей работе нами показано участие грелиновой системы мозга в механизмах патологического влечения к алкоголю и возможность использования антагонистов грелина для снижения подкрепляющих свойств этанола. **Это вполне согласуется с данными, описанными другими исследователями.** Так, ограничение потребления пищи, вызывающее повышение уровня грелина [9, 18], также увеличивает и вызванную амфетамином и кокаином локомоторную активность, усиливает поведение поиска кокаина и повышает самовведение кокаина и амфетамина у крыс [12, 23, 24]. Введение грелина (внутрижелудочковое или локальное в вентральную область покрышки) повышало потребление алкоголя у мышей [25–27]. Кроме того, было показано, что действие грелина наиболее выражено у грызунов, которые ранее уже потребляли алкоголь, так как периферическое введение грелина крысам, не потреблявшим ранее алкоголь, незначительно повышает его потребление [19–21, 31]. Таким образом, грелин и его GHS-R1A рецепторы могут регулировать уровень потребления и контролировать поиск аддиктивных веществ. Поэтому лечение пациентов с алкогольной зависимостью с помощью фармакологических веществ, действующих на грелиновую систему, может оказаться перспективным направлением современной психофармакологии и биологической наркологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П. Д. Психофармакология. СПб.: Н-Л, 2008. 384 с.
2. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. Угнетение самостимуляции латерального гипоталамуса опиатами и опиоидами, вводимыми в центральное ядро миндалины у крыс. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2010; 97 (2): 180–8.
3. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Мещеров Ш. К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. СПб.: Лань, 2002. 208 с.
4. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Стрельцов В. Ф. Гормональные механизмы подкрепления. СПб.: Н-Л, 2008. 208 с.
5. Шабанов П. Д., Сапронов Н. С. Психонейроэндокринология. СПб.: Информ-Навигатор, 2010. 984 с.
6. Asakawa A., Inui A., Kaga T., Katsuura G., Fujimiya M., Fujino M. A., Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. Gut. 2003; 52: 947–52.
7. Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Ueno N., Makino S., Fujimiya M., Nijima A., Fujino M. A., Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. Gastroenterol. 2001; 120 (2): 337–45.
8. Cowley M. A., Smith R. G., Diano S., Tschop M., Pronchuk N., Grove K. L., Strasburger C. J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M. L., Garcia-Segura L. M., Nillni E. A., Mendez P., Low M. J., Sotonyi P., Friedman J. M., Liu H., Pinto S., Colmers W. F., Cone R. D., Horvath T. L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron. 2003; 37: 649–61.
9. Cummings D. E., Clement K., Purnell J. Q., Vaisse C., Foster K. E., Frayo R. S., Schwartz M. W., Basdevant A., Weigle D. S. Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. Nature. 2002; 8 (7): 643–4.
10. Cummings D. E., Frayo, R. S., Marmionier C., Aubert R., Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. Amer. J. Physiol. Endocrinol. and Metab. 2004; 287 (2): E297–E304.
11. Cummings D. E., Purnell J. Q., Frayo R. S., Schmidova K., Wisse B. E., Weigle D. S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes. 2001; 50 (8): 1714–9.
12. Dickson S. L., Egecioglu E., Landgren S., Skibicka K. P., Engel J. A., Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. Mol. Cell Endocrinol. 2011; 340: 80–7.
13. Dickson S. L., Hrabovszky E., Hansson C., Jerlhag E., Alvarez-Crespo M., Skibicka K. P., Molnar C. S., Liposits Z., Engel J. A., Egecioglu E. Blockade of central nicotinic acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents. Neuroscience. 2010; 171 (4): 1180–6.
14. Dickson S. L., Leng G., Robinson I. C. Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. Neuroscience. 1993; 53 (2): 303–6.
15. Dickson S. L., Luckman S. M. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. Endocrinology. 1997; 138 (2): 771–7.
16. Egecioglu E., Jerlhag E., Salome N., Skibicka K. P., Haage D., Bohlooly Y. M., Andersson D., Bjursell M., Perissoud D., Engel J. A., Dickson S. L. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. Addict. Biol. 2010; 15(3): 304–11.
17. Egecioglu E., Skibicka K. P., Hansson C., Alvarez-Crespo M., Friberg A., Jerlhag E., Engel J. A., Dickson S. L.

- Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev. Endocrinol. Metab. Disor.* (Epub ahead of print). doi:10.1007/s11154-011-9166-4.
18. Gualillo O., Caminos J. E., Nogueiras R., Seoane L. M., Arvat E., Ghigo E., Casanueva F. F., Dieguez C. Effect of food restriction on ghrelin in normal-cycling female rats and in pregnancy. *Obesity Res.* 2002; 10 (7): 682–7.
 19. Jerlhag E. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addic. Biol.* 2008; 13: 3–4.
 20. Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S. L., Andersson M., Svensson L., Engel J. A. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addic. Biol.* 2006; 11 (1): 45–54.
 21. Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S. L., Douhan A., Svensson L., Engel J. A. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addic. Biol.* 2007; 12 (1): 6–16.
 22. Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S. L., Engel J. A. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacol.* (Berl.) 2010; 211 (4): 415–22.
 23. Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S. L., Engel J. A. Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addic. Biol.* 2011; 16 (1): 82–91.
 24. Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S. L., Svensson L., Engel J. A. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008; 18 (7): 508–18.
 25. Jerlhag E., Egecioglu E., Landgren S., Salome N., Heilig M., Moechars D., Datta, R., Perrissoud D., Dickson S. L., Engel J. A. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2009; 106 (27): 11318–23.
 26. Jerlhag E., Grotli M., Luthman K., Svensson L., Engel J. A. Role of the subunit composition of central nicotinic acetylcholine receptors for the stimulatory and dopamine-enhancing effects of ethanol. *Alcohol Alcoholism.* 2006; 41 (5): 486–93.
 27. Jerlhag E., Landgren S., Egecioglu E., Dickson S. L., Engel J. A. The alcohol induced locomotor stimulation and accumbal dopamine release is suppressed in ghrelin knockout mice. *Alcohol.* (Epub ahead of print) doi:10.1016/j.alcohol.2010.10.002.
 28. Kaur S., Ryabinin A. E. Ghrelin receptor antagonism decreases alcohol consumption and activation of periolomotor urocortin-containing neurons. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (9): 1525–34.
 29. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402 (6762): 656–60.
 30. Lall S., Tung L. Y. C., Ohlsson C., Jansson J. O., Dickson S. L. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2001; 280 (1): 132–8.
 31. Lyons A. M., Lowery E. G., Sparta D. R., Thiele T. E. Effects of food availability and administration of orexigenic and anorectic agents on elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2008; 32 (11): 1962–8.
 32. Olszewski P. K., Grace M. K., Billington C. J., Levine A. S. Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides.* 2003; 24 (6): 919–23.
 33. Olszewski P. K., Li D. H., Grace M. K., Billington C. J., Kotz C. M., Levine A. S., Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides.* 2003; 24 (4): 597–602.
 34. Perello M., Sakata I., Birnbaum S., Chuang J. C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky S. A., Woloszyn J., Yanagisawa M., Lutter M., Zigman J. M. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry.* 2010; 67 (9): 880–6.
 35. 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; 53 (5): 902–10.
 36. Tschop M., Smiley D. L., Heiman M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000; 407 (6806): 908–13.
 37. Tschop M., Wawarta R., Riepl R. L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 2001; 24 (6): Rc19–Rc21.
 38. Wren A. M., Seal L. J., Cohen M. A., Brynes A. E., Frost G. S., Murphy K. G., Dhillon W. S., Ghatei M. A., Bloom S. R. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 2001; 86 (12): 5992–5.
 39. Wren A. M., Small C. J., Abbott C. R., Dhillon W. S., Seal L. J., Cohen M. A., Batterham R. L., Taheri S., Stanley S. A., Ghatei M. A., Bloom S. R. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes.* 2001; 50 (11): 2540–7.
 40. Wren A. M., Small C. J., Ward H. L., Murphy K. G., Dakin C. L., Taheri S., Kennedy A. R., Roberts G. H., Morgan D. G. A., Ghatei M. A., Bloom S. R. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinol.* 2000; 141 (11): 4325–8.

[D-LYS³]-GHRP-6, AN ANTAGONIST OF GHRELIN RECEPTORS, DECREASES EXPRESSION OF CONDITIONED PLACE PREFERENCE REACTION OF ETHANOL IN RATS

P. M. Vinogradov, I. Yu. Tissen, A. A. Lebedev, E. R. Bychkov, E. A. Botkin, N. V. Lavrov, P. D. Shabanov

◆ **Summary:** Ghrelin is a peptide hormone synthesized and secreted by the stomach into the bloodstream. The greatest attention of neuroscience research is devoted to investigation of acylated form of ghrelin, which is a specific ligand for the receptor subcortical nuclei of the brain. The aim of this study was to analyze the action of ghrelin and its antagonist on the expression of conditioned place preference (CPP) of ethanol. To develop CPP of alcohol we used a two-chamber apparatus. Rats were spent 74% of time experiment in chamber associated with alcohol. Rats receiving intranasal receptor ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 (10 μg) reduced the time of staying in the chamber associated with alcohol for 46% (p < 0.05). Rats treated with intranasal ghrelin spent in the chamber, associated with alcohol, for 60% of time. Then the extinction of CPP was produced when rats was replaced into the apparatus every day for 7 days without administration alcohol or any substances. On the 7th day of extinction, CPP was not reproduced. But after administration of ethanol on the 7th day CPP was reinstated. Animals received GHS-R1A receptor ghrelin antagonist [D-Lys³]-GHRP-6 (10 μg) and ethanol spent 50% of time in chamber associated with the administration of ethanol, i.e. CPP was not reinstated. Animals treated with ghrelin, demonstrated a range of reactions from a sharp preference to avoidance of the place associated with ethanol. Thus, the present study shows the important role of ghrelin in the mechanisms of the reinforcing effects of alcohol and demonstrates the prospect for using of ghrelin antagonists in the correction of pathological craving in addictive disorders.

◆ **Key words:** ghrelin; [D-Lys³]-GHRP-6; the conditional place preference response; reinforcement; emotions.

REFERENCES

- Shabanov P.D. Psikhofarmakologiya [Psychopharmacology]. St.Petersburg: H-L Publ., 2008. 384 p. (in Russian).
- Shabanov P.D., Lebedev A.A. Ugnetenie samostimulyatsii lateral'nogo gipotalamusa opiatami i opioidami, vvodimymi v tsentral'noe yadro mindaliny u krysa [Inhibition of self-stimulation of the lateral hypothalamus of opiates and opioids administered in the central core of the amygdala in rats]. *Russ. Fiziol. Zh. Im IM Sechenov.* 2010; 97 (2): 180–8. (in Russian).
- Shabanov P.D., Lebedev A.A., Meshcherov S.K. Dofamin i podkrepliyayushchie sistemy mozga [Dopamine and the reinforcing system of the brain]. St.Petersburg: Lan, 2002. 208 p. (in Russian).
- Shabanov P.D., Lebedev A.A., Streltsov V.F. Gormonal'nye mekhanizmy podkrepleniya [Hormonal mechanisms of reinforcement]. St. Petersburg: H-L, 2008. 208 p. (in Russian).
- Shabanov P.D., Saponov N.S. Psikhoneuroendokrinologiya [Psychoneuroendocrinology]. St.Petersburg: Inform Navigator, 2010. 984 p. (in Russian).
- Asakawa A., Inui A., Kaga T., Katsuura G., Fujimiya M., Fujino M.A., Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut.* 2003; 52: 947–52.
- Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Ueno N., Makino S., Fujimiya M., Niiijima A., Fujino M.A., Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterol.* 2001; 120 (2): 337–45.
- Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschop M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D., Horvath T.L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 2003; 37: 649–61.
- Cummings D.E., Clement K., Purnell J.Q., Vaisse C., Foster K.E., Frayo R.S., Schwartz M.W., Basdevant A., Weigle D.S. Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. *Nature.* 2002; 8 (7): 643–4.
- Cummings D.E., Frayo R.S., Marmonier C., Aubert R., Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. and Metab.* 2004; 287 (2): E297–E304.
- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E., Weigle D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 2001; 50 (8): 1714–9.
- Dickson S.L., Eggecioglu E., Landgren S., Skibicka K.P., Engel J.A., Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Mol. Cell Endocrinol.* 2011; 340: 80–7.
- Dickson S.L., Hrabovszky E., Hansson C., Jerlhag E., Alvarez-Crespo M., Skibicka K.P., Molnar C.S., Liposits Z., Engel J.A., Eggecioglu E. Blockade of central nicotine acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents. *Neuroscience.* 2010; 171 (4): 1180–6.
- Dickson S.L., Leng G., Robinson I.C. Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. *Neuroscience.* 1993; 53 (2): 303–6.
- Dickson S.L., Luckman S.M. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GHreleasing peptide-6. *Endocrinology.* 1997; 138 (2): 771–7.
- Eggecioglu E., Jerlhag E., Salome N., Skibicka K.P., Haage D., Bohlooly Y.M., Andersson D., Bjursell M., Perrissoud D., Engel J.A., Dickson S.L. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict. Biol.* 2010; 15(3): 304–11.
- Eggecioglu E., Skibicka K.P., Hansson C., Alvarez-Crespo M., Friberg A., Jerlhag E., Engel J.A., Dickson S.L. Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev. Endocrinol. Metab. Disor. (Epub ahead of print).* doi:10.1007/s11154-011-9166-4.
- Gualillo O., Caminos J.E., Nogueiras R., Seoane L.M., Arvat E., Ghigo E., Casanueva F.F., Dieguez C. Effect of food restriction on ghrelin in normal-cycling female rats and in pregnancy. *Obesity Res.* 2002; 10 (7): 682–7.
- Jerlhag E. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addic. Biol.* 2008; 13: 3–4.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Andersson M., Svensson L., Engel J.A. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addic. Biol.* 2006; 11 (1): 45–54.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Douhan A., Svensson L., Engel J.A. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addic. Biol.* 2007; 12 (1): 6–16.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Engel J.A. Ghrelin receptor antagonism attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release, and conditioned place preference. *Psychopharmacol. (Berl.)* 2010; 211 (4): 415–22.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Engel J.A. Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addic. Biol.* 2011; 16 (1): 82–91.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Svensson L., Engel J.A. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008; 18 (7): 508–18.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Landgren S., Salome N., Heilig M., Moechars D., Datta R., Perrissoud D., Dickson S.L., Engel J.A. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2009; 106 (27): 11318–23.
- Jerlhag E., Grotli M., Luthman K., Svensson L., Engel J.A. Role of the subunit composition of central nicotinic acetylcholine receptors for the stimulatory and dopamine-enhancing effects of ethanol. *Alcohol Alcoholism.* 2006; 41 (5): 486–93.
- Jerlhag E., Landgren S., Eggecioglu E., Dickson S.L., Engel J.A. The alcohol induced locomotor stimulation and accumbal dopamine release is suppressed in ghrelin knockout mice. *Alcohol. (Epub ahead of print)* doi:10.1016/j.alcohol.2010.10.002.
- Kaur S., Ryabinin A.E. Ghrelin receptor antagonism decreases alcohol consumption and activation of periaqueductal urocortin-containing neurons. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2010; 34 (9): 1525–34.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402 (6762): 656–60.
- Lall S., Tung L.Y.C., Ohlsson C., Jansson J.O., Dickson S.L. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2001; 280 (1): 132–8.
- Lyons A.M., Lowery E.G., Sparta D.R., Thiele T.E. Effects of food availability and administration of orexigenic and

- anorectic agents on elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2008; 32 (11): 1962–8.
32. Olszewski P.K., Grace M.K., Billington C.J., Levine A.S. Hypothalamic paraventricular injections of ghrelin: effect on feeding and c-Fos immunoreactivity. *Peptides.* 2003; 24 (6): 919–23.
 33. Olszewski P.K., Li D.H., Grace M.K., Billington C.J., Kotz C.M., Levine A.S., Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides.* 2003; 24 (4): 597–602.
 34. Perello M., Sakata I., Birnbaum S., Chuang J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky S.A., Woloszyn J., Yanagisawa M., Lutter M., Zigman J.M. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry.* 2010; 67 (9): 880–6.
 35. 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; 53 (5): 902–10.
 36. Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000; 407 (6806): 908–13.
 37. Tschop M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 2001; 24 (6): Rc19–Rc21.
 38. Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillon W.S., Ghatei M.A., Bloom S.R. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 2001; 86 (12): 5992–5.
 39. Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillon W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A., Bloom S.R. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes.* 2001; 50 (11): 2540–7.
 40. Wren A.M., Small C.J., Ward H.L., Murphy K.G., Dakin C.L., Taheri S., Kennedy A.R., Roberts G.H., Morgan D.G.A., Ghatei M.A., Bloom S.R. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinol.* 2000; 141 (11): 4325–8.

◆ 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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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

Botkin Eugeny Alexandrovich — 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.

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.