

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИЗМЕНЯЕТСЯ В ЭМОЦИОГЕННЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И ПРИ ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА

Айрапетов М.И.^{1,2}, Ереско С.О.³, Бычков Е.Р.¹, Лебедев А.А.¹, Шабанов П.Д.^{1,4}

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

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследования последних лет предоставили убедительные доказательства того, что длительное употребление этанола приводит к активации механизмов нейроиммунной сигнализации. В последнее время большое внимание исследователей направлено на изучение toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs), которые играют одну из ключевых ролей в механизмах активации врожденной иммунной системы в структурах головного мозга в последствии употребления алкоголя. Известно, что активация TLRs приводит к высвобождению многих провоспалительных цитокинов с вытекающим отсюда нейровоспалительным процессом. Имеются предположения, что TLRs могут быть вовлечены и в модуляцию нейромедиаторных систем головного мозга, внося тем самым свой вклад в формирование патологической зависимости к этанолу. Цель нашей работы заключалась в исследовании уровня экспрессии генов TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) и генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , CCL2) в различных структурах мозга крыс (миндалевидное тело, гиппокамп, медиальная энторинальная кора, стриатум) в условиях длительной алкоголизации и на разных сроках отмены этанола, что ранее исследователями не изучалось.

Длительная алкоголизация крыс этанолом не привела к изменениям уровней мРНК TLRs в исследуемых структурах головного мозга крыс, за исключением повышения уровня мРНК TLR3 в гиппокампе длительно алкоголизованных крыс и небольшого увеличения уровня мРНК TLR3 в mEC. Однако экспрессия генов TLRs подвергается изменениям во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс на разных сроках отмены алкоголя. При этом особого внимания заслуживает повышенный уровень экспрессии как TLRs, так и провоспалительных генов в период отмены алкоголя в гиппокампе мозга крыс, что свидетельствует о наличии стойкого нейровоспалительного процесса в данной структуре мозга в период отмены алкоголя, которая, вероятно, поддерживается при участии TLR-зависимой сигнализации. Изучение механизмов активации воспалительного процесса посредством TLR-зависимой сигнализации в различных структурах мозга может открыть новые мишени с целью воздействия на них лекарственными препаратами. Такие лекарственные средства могут быть использованы в комплексной терапии алкоголизма.

Ключевые слова: мозг, гиппокамп, алкоголизм, отмена алкоголя, Toll-подобные рецепторы, нейровоспаление

Адрес для переписки:

Айрапетов Марат Игоревич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Address for correspondence:

Airapetov Marat I.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Образец цитирования:

М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов «Уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 77–86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-1836

© Айрапетов М.И. и соавт., 2020

For citation:

M.I. Airapetov, S.O. Eresko, E.R. Bychkov, A.A. Lebedev, P.D. Shabanov "Expression of Toll-like receptors in emotogenic structures of rat brain is changed under long-term alcohol consumption and ethanol withdrawal", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 77–86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-1836

DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-1836

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN EMOTIOGENIC STRUCTURES OF RAT BRAIN IS CHANGED UNDER LONG-TERM ALCOHOL CONSUMPTION AND ETHANOL WITHDRAWAL

Airapetov M.I.^{a, b}, Eresko S.O.^c, Bychkov E.R.^a, Lebedev A.A.^a, Shabanov P.D.^{a, d}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

^d S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Recent studies have provided strong evidence that long-term ethanol consumption leads to activation of the mechanisms of neuroimmune signaling. Recently, much attention has been focused on the study of toll-like receptors (Toll-like receptors, TLRs), which play one of the key roles in the mechanisms of activation of the innate immune system in brain structures subsequently ethanol consumption. It is known that the activation of TLRs leads to the release of many proinflammatory cytokines with the resulting neuroinflammatory process. There are suggestions that TLRs may also be involved in the modulation of neurotransmitter systems of the brain, thereby contributing to the formation of pathological dependence on ethanol. The goal of our work was to study the level of expression the genes of TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) and pro-inflammatory cytokine genes (IL-1 β , CCL2) in the rat brain (amygdala, hippocampus, medial entorhinal cortex, striatum) under conditions of prolonged alcoholization and on different periods of alcohol withdrawal, which was previously not studied by researchers. Prolonged alcoholization of rats with ethanol did not lead to changes in levels mRNA of TLRs in the studied structures of the rat brain, with the exception of a small increase in the level of TLR3 mRNA in the hippocampus of prolonged alcoholized rats and a slight increase in the level of TLR3 mRNA in mEC. However, gene expression of TLRs undergoes changes in all the structures of the rat brain studied by us at different periods of alcohol withdrawal. The increased level of expression of both TLRs and proinflammatory genes in the period of alcohol withdrawal in the rat brain hippocampus deserves special attention, which indicates the presence of a persistent neuroinflammatory process in this brain structure in the period of alcohol withdrawal, which is probably supported with the participation of TLR-dependent signaling. The study of the mechanisms of inflammatory process activation by TLR-dependent signaling in different brain structures can open new targets for drug exposure. Such drugs can be used in the treatment of alcoholism.

Keywords: brain, hippocampus, alcoholism, alcohol withdrawal, Toll-like receptors, neuroinflammation

Введение

Алкоголизм представляет собой большую социально значимую проблему во всем мире. На данный момент имеются убедительные доказательства того, что длительное употребление алкоголя приводит к множественным изменениям механизмов нейротрансмиссии в головном мозге, что приводит к развитию алкоголизма [1, 2, 3, 4, 7, 19]. В последнее время все большее внимание исследователей привлекают изменения нейроиммунных механизмов, возникающих в мозге при длительной алкоголизации [2, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 20]. В экспериментах на грызунах и при исследовании посмертных образцов мозга людей, страдающих алкоголизмом, было показано, что этанол повышает уровень экспрессии TLR3, TLR4 и TLR7 (Toll-like receptor, TLR, Toll-подобные рецепторы) [13, 15, 16]. В головном мозге TLR4 расположен на поверхности цитоплазматической мембраны клеток микроглии,

тогда как TLR3 и TLR7 являются внутриклеточными рецепторами и локализованы на мембранах эндосом клеток микроглии. Имеются сведения и том, что некоторые подтипы TLRs могут быть локализованы и на других типах клеток микроглии [15]. Активация TLRs служит сигналом для запуска сложных внутриклеточных каскадов реакций, которые приводят к повышению уровня экспрессии многих генов врожденной иммунной системы (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN α , IFN β , MCP-1, CCL2, CXCL10 и др.) [2, 15, 16], что служит основой для развития нейровоспалительного процесса в головном мозге, результатом чего является повышенный уровень нейротоксичности с последующей гибелью нейронов и клеток микроглии [8, 9]. Помимо вовлеченности TLRs в развитие нейротоксического эффекта в ЦНС, предполагается, что они вносят свой вклад и в дисрегуляцию нейромедиаторных систем [20]. Поэтому представляется интересным изучить, как изменяется уровень экспрессии TLRs в раз-

личных структурах мозга, которые в первую очередь подвержены изменениям в ходе длительной алкоголизации. **Цель данной работы** – оценить уровень экспрессии TLR3, TLR4, TLR7, а также генов противовоспалительных цитокинов IL-1 β и CCL2 в период длительной алкоголизации и на разных сроках отмены алкоголя в следующих структурах головного мозга крыс: гиппокамп, миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора (mEC, medial entorhinal cortex) и стриатум. Выбранные для исследования структуры мозга подвержены изменениям в первую очередь в условиях длительной алкоголизации. Предполагается, что данные подтипы TLRs вносят свой вклад в развитие нейровоспалительного процесса в данных структурах головного мозга.

Материалы и методы

Длительная алкоголизация

В работе были использованы 42 крысы-самца линии Вистар, полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область), с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (выписка из протокола заседания локального этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» №2/15). В экспериментах с длительной алкоголизацией половозрелых крыс (начальный возраст 3–4 месяца) подвергали полунасильственной алкоголизации 20%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 1 месяца. Контрольная группа крыс в качестве источника жидкости получала воду.

Отмена этанола

Отмена длительной алкоголизации проводилась через 1 мес. алкоголизации. Крыс декапитировали на 1-е (n = 8), 7-е (n = 8) и 14-е (n = 8) сут. отмены алкоголя и производили забор биоматериала.

Забор биоматериала

Образцы необходимых структур мозга (гиппокамп, стриатум, миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора) выделялись на холоде. Границы структур мозга были определены в соответствии с атласом мозга [17]. Выделенные структуры мозга немедленно замораживали в жидком

азоте и хранили при температуре -80 °C до проведения этапа гомогенизации и выделения тотальной РНК.

Реал-тайм ПЦР

Выделение тотальной РНК проводили из 20 мг пробы мозга 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 продукта. Синтез кДНК проводили методом ОТ в 25 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV обратной транскриптазы, Promega, США). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green («Евроген», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1), синтезированных в компании Beagle (Россия). Последовательность праймеров подбиралась с рассчитанной температурой отжига 55 °C в программе Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Аmplификацию для всех пар праймеров проводили по программе: начальная денатурация 95 °C, 5 мин; затем 40 циклов – 95 °C, 20 с; 55 °C, 20 с; 72 °C, 35 с. Затем для ПЦР-продуктов строили «кривую плавления» от 55 до 95 °C. Полученные данные нормировались к уровню гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Gapdh) и рассчитывались в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v. 6. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики: среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение. Для сравне-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. PRIMER SEQUENCE

Ген Gene	Праймеры Primers	
	Прямой (5'-3') Right (5'-3')	Обратный (5'-3') Reverse (5'-3')
Gapdh	CGGAGACGAATGGAAATTAG	AAATCCGTTACACCGAC
TLR3	AACTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTTT
TLR4	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
TLR7	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA
IL-1 β	TGATGTTCCCATTAGACAGC	GAGAATACCACTTGTTGGCT
CCL2	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT

ния групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Распределение отвечало критерию нормальности (критерий Колмогорова—Смирнова). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Корреляционный анализ также был выполнен в программе Graph Pad Prism v. 6. Уровень взаимосвязи между двумя сравниваемыми переменными определяли по коэффициенту детерминации (R^2) [6].

Результаты

Уровень мРНК TLR3 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

В условиях длительной алкоголизации в гиппокампе и mEC уровень мРНК TLR3 повышен по отношению к группе контроля, в стриатуме и миндалевидном теле изменений не выявлено. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК TLR3 повышен на всех сроках отмены; в миндалевидном теле уровень мРНК повышен на 1-е сут., на 7-е сут. показатель достигает уровня контроля, на 14-е сут. показатель снижается ниже уровня контрольных значений; в стриатуме показатель снижается на 1-е сут. и повышается на 7-е и 14-е сут. отмены; в mEC уровень мРНК TLR3 снижается на 1-е сут., на 7-е и 14-е сут. увеличивается, превысив уровень контрольных значений на 14-е сут. отмены алкоголизации (рис. 1).

Уровень мРНК TLR4 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК TLR4 не имел статистически достоверных изменений ни в одной из исследуе-

мых структур головного мозга в группе длительной алкоголизации. В период отмены алкоголя в гиппокампе наблюдается пониженный уровень мРНК TLR4 только на 7-е сут. отмены алкоголя; в миндалевидном теле показатель повышается на 1-е сут. по отношению к группе длительной алкоголизации, на 7-е сут. снижается, достигнув уровня контрольных значений; на 14-е сут. уровень мРНК приобрел значение ниже уровня контрольных значений; в стриатуме уровень мРНК TLR4 повышается на 1-е и 7-е сут. отмены алкоголя, на 14 сут. уровень мРНК TLR4 в стриатуме мозга крыс снижается, достигая уровня контрольных значений; в mEC показатель повышен на 1-е сут. отмены, на 7-е сут. снижается, достигнув уровня контрольных значений и на 14-е сут. уровень мРНК приобрел значение ниже уровня контрольных значений (рис. 2).

Уровень мРНК TLR7 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК TLR7 не изменяется ни в одной из исследуемых групп в группе длительной алкоголизации. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК TLR7 повышен на всех сроках отмены; в миндалевидном теле уровень мРНК увеличивается на 1-е сут. отмены, далее на 7-сут. и 14-е сут. снижается, приобретая значение уровня мРНК ниже уровня контроля; в стриатуме показатель понижен на всех сроках отмены алкоголя; в mEC не наблюдается изменений на уровне мРНК на протяжении всего эксперимента (рис. 3)

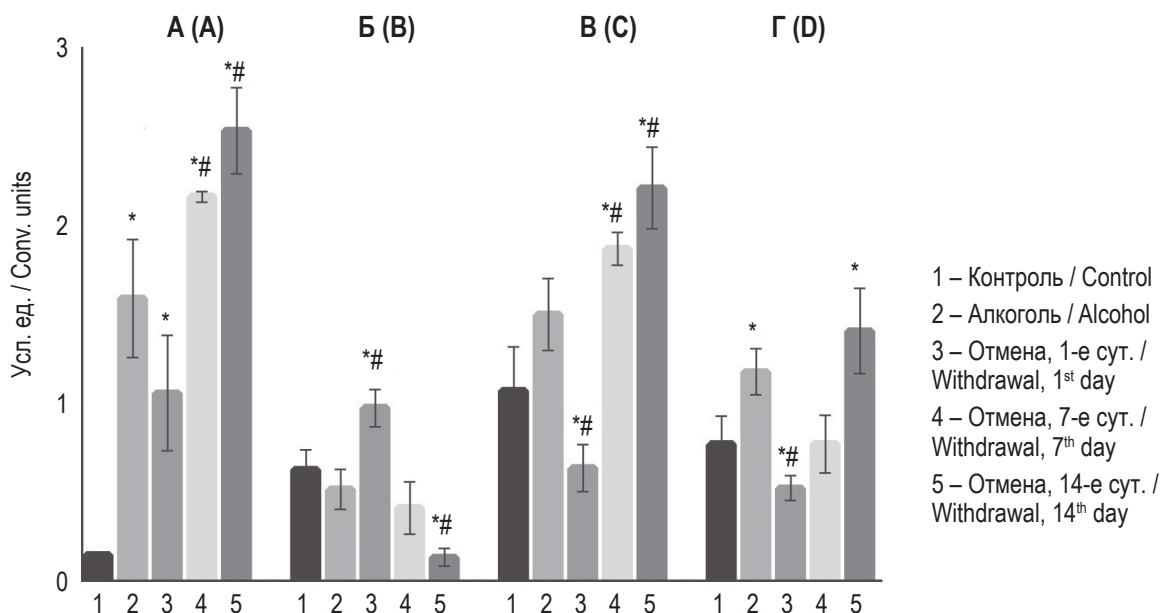


Рисунок 1. Уровень мРНК TLR3 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), mEC (Г) мозга крыс

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе контроля; # – $p < 0,05$ по отношению к группе алкоголизации.

Figure 1. Levels of mRNA of TLR3 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain

Note. *, $p < 0.05$ relative to the control group; #, $p < 0.05$ relative to the alcoholization group.

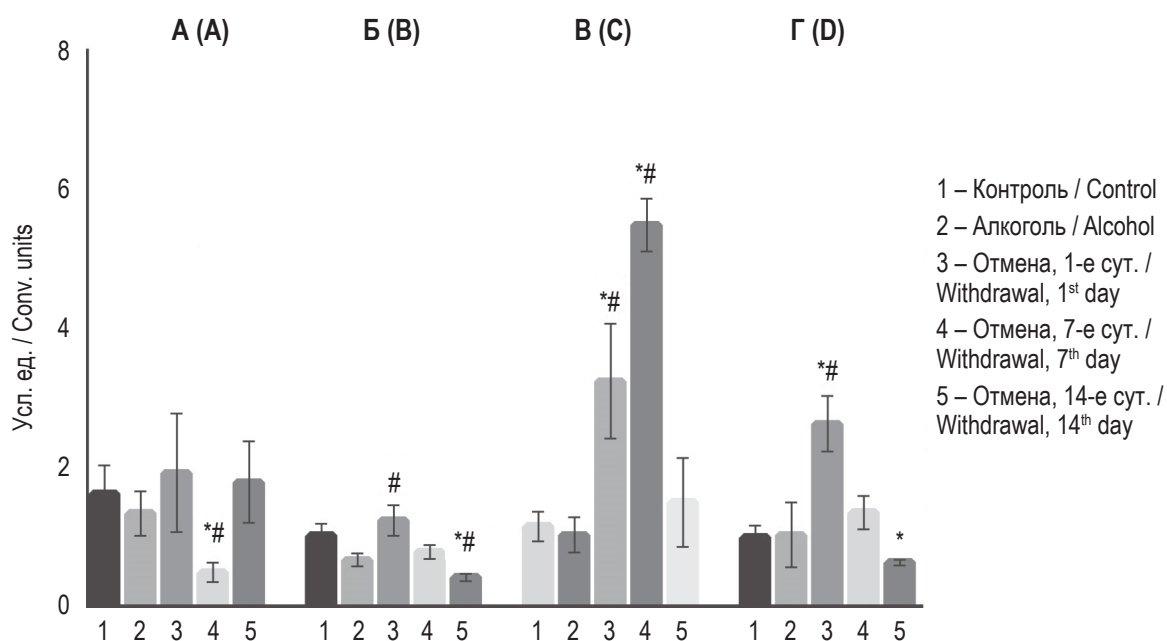


Рисунок 2. Уровень мРНК TLR4 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), мЕС (Г) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Levels of mRNA of TLR4 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

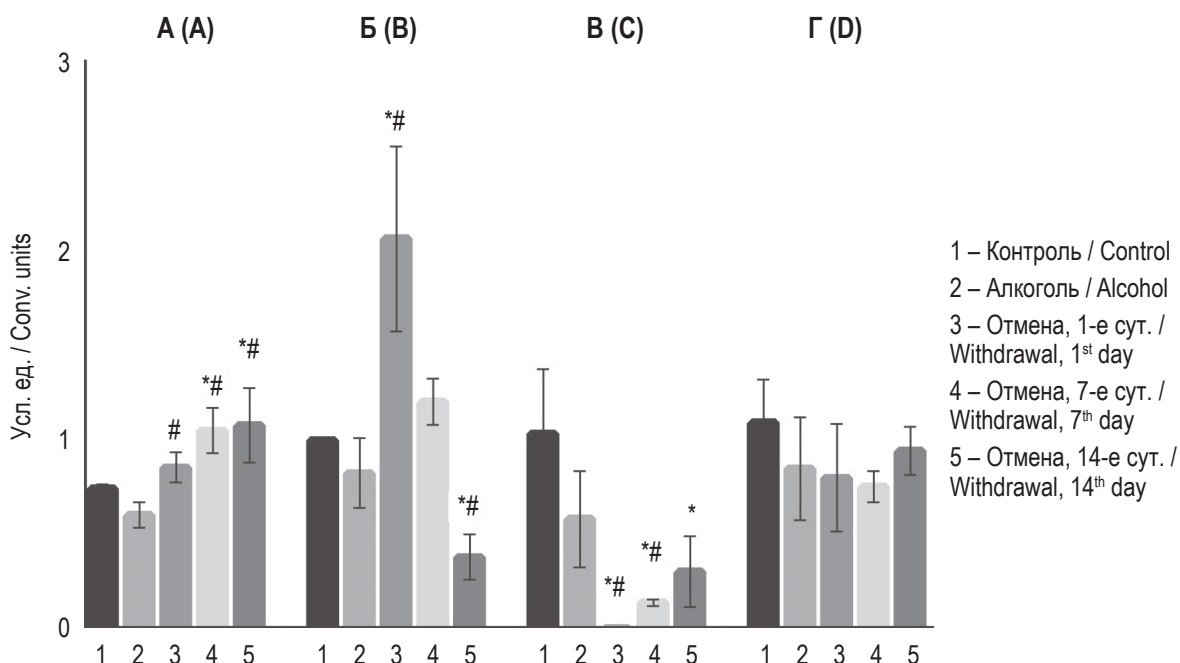


Рисунок 3. Уровень мРНК TLR7 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), стриатуме (В), мЕС (Г) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Levels of mRNA of TLR7 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the striatum (C), the mEC (D) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в условиях алкоголизации и при отмене алкоголя

Уровень мРНК IL-1 β в условиях длительной алкоголизации не изменяется в гиппокампе, повышен в миндалевидном теле и mEC. В период отмены алкоголя в гиппокампе уровень мРНК понижен на 7-е сут. и повышается на 14-е сут. В миндалевидном теле мозга крыс уровень мРНК повышен на 1-е сут. по отношению к группе контроля и понижается на 7-е и 14-е сут. отмены алкоголя по отношению к группе алкоголизации. В mEC наблюдается повышенный уровень мРНК IL-1 β в группах отмены алкоголя на 1-е и 7-е сут., однако на 14-е сут. отмены уровень мРНК IL-1 β достигает вновь уровня контрольных значений (рис. 4).

Уровень мРНК CCL2 в условиях длительной алкоголизации повышается в гиппокампе мозга крыс и не изменяется в миндалевидном теле и mEC. В период отмены алкоголя в гиппокампе показатель повышен на 1-е и 7-е сут., на 14-е сут. достигает уровня контрольных значений; в миндалевидном теле небольшое снижение на 1-е сут., на 7-е и 14-е сут. изменений не обнаружено, в mEC отмечается лишь небольшое снижение на 7-е сут. отмены (рис. 5).

Обсуждение

Уровень мРНК TLR3 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

В экспериментах на мышах показано, что TLR3-сигнализация вовлечена в развитие про-

воспалительного ответа при употреблении алкоголя, а также опосредует механизмы патологического влечения к алкоголю и, следовательно, повышению уровня его потребления [20]. Однако данных совсем немного, чтобы можно было сделать полноценные выводы о вкладе TLR3 в патогенез алкоголизма. Совсем нет работ, которые бы показывали, что происходит с экспрессией гена TLR3 в лимбических структурах мозга, таких как гиппокамп и миндалевидное тело. Отсутствуют данные и об изменении экспрессии гена TLR3 в головном мозге в период отмены алкоголя на разных сроках после длительной алкоголизации. Мы получили, что уровень мРНК TLR3 в условиях алкоголизации изменяется только в гиппокампе мозга крыс, однако в период отмены алкоголя наблюдаются изменения в экспрессии гена TLR3 на уровне мРНК во всех исследуемых нами структурах головного мозга. К 14-му дню отмены уровень мРНК ниже уровня контрольных значений в миндалевидном теле (в 4,6 раза), выше уровня контрольных значений в гиппокампе (в 15,5 раз) и в стриатуме (в 2,1 раза), менее значительные изменения в медиальной энторинальной коре (выше уровня контроля в 1,9 раза) (рис. 1). Из литературных данных известно, что TLR3-зависимая сигнализация может оказывать влияние на уровень добровольного потребления алкоголя в эксперименте на грызунах [20]. Так, однократное введение внутрибрюшинно агониста TLR3 (поли (I:C)) мышам приводит к увеличению уровня добровольного потребления алкоголя в двухпоилочном тесте [20]. При ис-

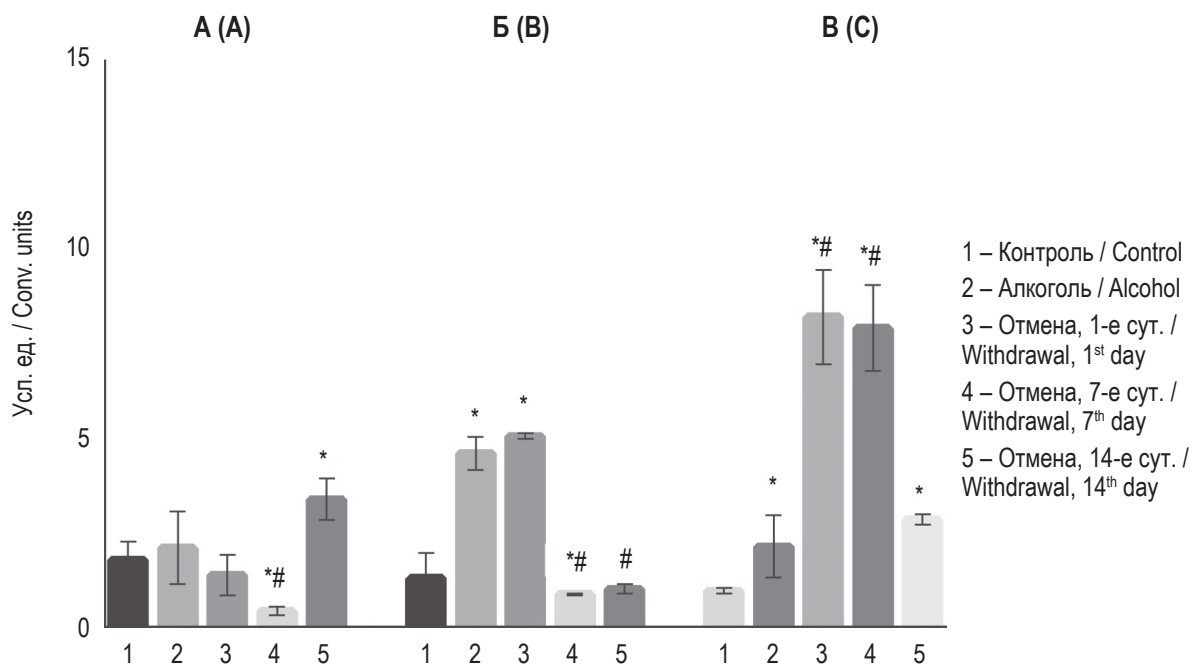


Рисунок 4. Уровень мРНК IL-1 β в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), mEC (В) мозга крыс

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Levels of mRNA of IL-1 β in the hippocampus (A), the amygdala (B), the mEC (C) of the rat brain

Note. As for Figure 1.

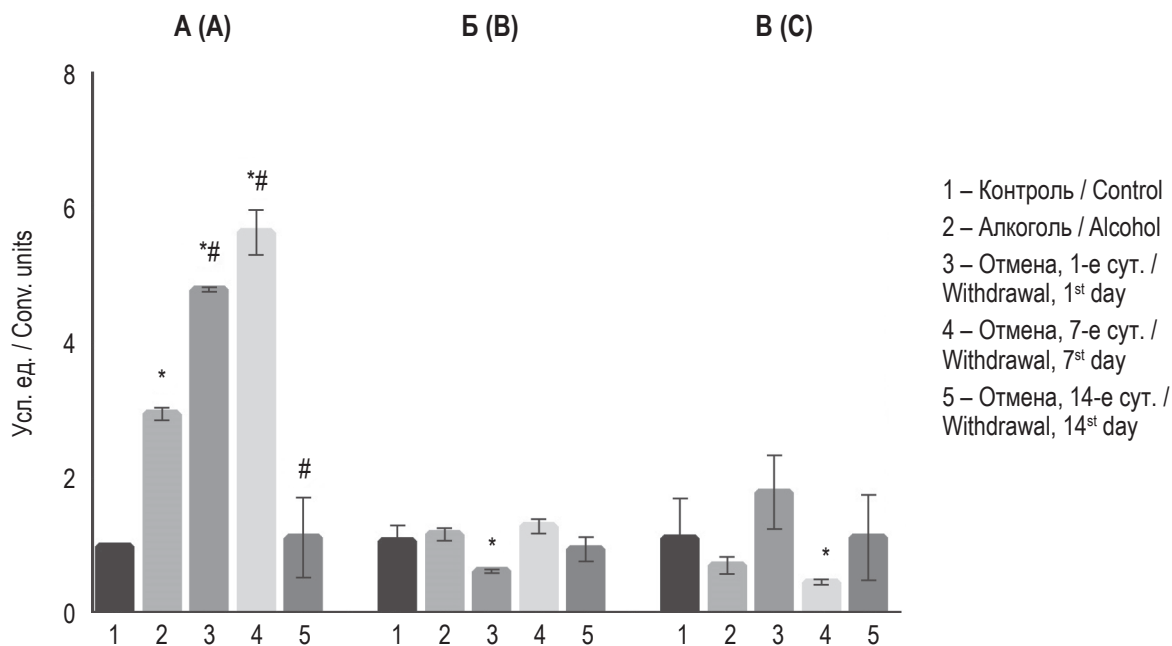


Рисунок 5. Уровень мРНК CCL2 в гиппокампе (А), миндалевидном теле (Б), мЕС (В) мозга крыс
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Levels of mRNA of CCL2 in the hippocampus (A), the amygdala (B), the mEC (C) of the rat brain
Note. As for Figure 1.

следовании последствия применения поли (I:C) на экспрессию генов в прилежащем ядре мозга крыс было показано, что активация TLR3 приводит к увеличению уровней мРНК TLR3, COX2 (сусlooxygenase 2, циклооксигеназа 2), а также и генов глутаматергической системы (mGluR2 – metabotropic glutamate receptor 2, метаботропный рецептор глутамата 2; mGluR3; GLT1 – glutamate transporter 1, глутаматный транспортер 1) и гена BDNF (brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический мозговой фактор) в прилежащем ядре мозга (NAcc, nucleus accumbens). Кроме того, увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением уровня мРНК TLR3. Данные результаты свидетельствуют о том, что работа глутаматергической системы подвергается изменениям при активации TLR3 [18]. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что полученные изменения TLR3 на уровне мРНК в исследуемых структурах головного мозга в период отмены алкоголя могут быть связаны не только с вовлеченностью TLR3 в активацию экспрессии провоспалительных генов, но и в развитие механизмов, направленных по повышению уровня патологического влечения к алкоголю в период отмены алкоголя. Так что вполне возможно, что в изучаемых нами структурах роль TLR3 может связана с опосредованной их вовлеченностью в дисрегуляцию нейромедиаторных систем, что может и приводить, например, к мотивации употребить алкоголь в период его отмены. Для подтверждения полученных предположений необхо-

димо в дальнейшем проведение дополнительных исследований.

Уровень мРНК TLR4 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Наибольшее количество работ было направлено на изучение вовлеченности TLR4 в механизмы активации провоспалительного сигналинга в результате потребления этанола, однако большинство таких работ выполнено на культурах клеток и на коре головного мозга мышей [8, 9, 20]. Мы же сосредоточили свое внимание на изучении уровня экспрессии гена TLR4 на уровне мРНК в таких структурах мозга крыс, как миндалевидное тело, медиальная энторинальная кора (mEC), стриатум и гиппокамп. Результаты нашего эксперимента не показали существенных изменений в структурах длительно алкоголизируемого мозга спустя 1 мес. алкоголизации. Однако в период отмены алкоголя уровень мРНК изменяется во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс. Так, к 14-му дню отмены уровень мРНК TLR4 снижается в миндалевидном теле (в 2,4 раза) и медиальной энторинальной коре (в 1,6 раза) ниже уровня контрольных значений, в стриатуме и гиппокампе возвращается до уровня контрольных значений (рис. 2). Большое количество выполненных исследований на крысах и мышах с применением генетических и фармакологических манипуляций (нокаут TLR4 и применение антагонистов) показали, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола, но, тем не менее, наблюдаются изменения в TLR4-опосредованном сигналинге

после употребления алкоголя [8, 9, 20]. Однако, несмотря на то, что TLR4 непосредственно не вовлечен в формирование патологического влечения к алкоголю, он участвует в процессах активации провоспалительных генов, результатом чего служит развитие нейровоспалительного процесса в ЦНС. Также имеются предположения о том, что TLR4-MуD88-зависимый сигналинг может изменять активность ГАМК-ергической трансмиссии в ЦНС [8], что указывает и на иные физиологические роли TLR4, отличающиеся от активации генов врожденной иммунной системы. Имеются данные и о том, что TLR4 образует гетеродимеры с рецептором кортиколиберина второго типа (CRFR2) в ЦНС [5]. Введение внутривентрикулярно LPS (lipopolysaccharide, липополисахарида), экзогенного лиганда TLR4, ускоряет развитие тревожного поведения у животных, впоследствии подвергающихся воздействию этанола [16]. Мыши, лишённые TLR4 или MyD88, становились менее чувствительными к седативным и опьяняющим эффектам от этанола, тогда как мыши, лишённые TLR2, не отличались от контрольных мышей в этих тестах [8]. Все это указывает на то, что TLR4 может опосредованно изменять активность нейромедиаторных систем, что может также вносить свой вклад в патогенез алкоголизма.

Уровень мРНК TLR7 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя

Помимо уже описанных TLR3 и TLR4, небольшое количество исследований было направлено на изучение вклада TLR7 в патогенез алкоголизма [11]. При этом уровень экспрессии гена TLR7 в различных структурах мозга ранее не изучался. В нашем эксперименте мы получили, что уровень мРНК TLR7 в длительно алкоголизированном мозге не изменяется ни в одной из исследуемых структур головного мозга. В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК TLR7 был понижен в миндалевидном теле (в 3,2 раза) и стриатуме (в 3,5 раза), повышен в гиппокампе (в 8,5 раз), в медиальной энторинальной коре изменений на уровне мРНК не выявлено (рис. 3). Относительно полученных изменений на уровне мРНК сложно сделать какие-либо существенные выводы, так как работ, уделяющих внимание TLR7-зависимой сигнализации в головном мозге, не так много.

Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в условиях алкоголизации и при отмене алкоголя

Высокий уровень мРНК провоспалительных цитокинов может свидетельствовать о наличии нейровоспалительного процесса в головном мозге крыс [10, 11, 12, 15, 16]. В нашем эксперименте уровень мРНК IL-1 β повышен в миндалевидном теле (в 2,5 раза) и в mEC (в 2,2 раза), в гиппокампе отмечается небольшое снижение (в 1,6 раза). В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК IL-1 β приходит к норме, достигнув

уровня контрольных значений, в миндалевидном теле и в mEC, однако в гиппокампе уровень мРНК IL-1 β к 14-дню отмены превышает уровень контроля в 13,6 раза (рис. 4). Уровень мРНК CCL2 незначительно изменяется в условиях алкоголизации, к 14-му дню отмены этанола во всех исследуемых структурах мозга уровень мРНК находится на уровне контрольных значений. Однако стоит отметить то, что в гиппокампе на 7-е сут. отмены уровень мРНК CCL2 превышает уровень контроля в 9,1 раза (рис. 5). Хорошо известно, что цитокин CCL2 является важнейшим хемокином, который отвечает за миграцию моноцитов к очагу воспаления [5, 14]. Следовательно, повышенная экспрессия гена CCL2 на 7-е сут. отмены алкоголя свидетельствует о наличии нейровоспалительного процесса в гиппокампе, при этом уровень мРНК провоспалительного гена IL-1 β в гиппокампе также повышен в 4,3 раза на 7-е сут. отмены и в 13,6 раза к 14-му дню отмены. Все эти данные свидетельствуют о наличии длительного нейровоспалительного процесса в гиппокампе мозга крыс в период отмены алкоголя.

Корреляционный анализ

Задача заключалась в попытке выявить вклад разных подтипов TLRs (TLR3, TLR4, TLR7) в активацию выбранных нами генов врожденной иммунной системы (IL-1 β и CCL2) в исследуемых нами структурах головного мозга крыс. Корреляционный анализ показал взаимосвязь между динамикой изменчивости уровней мРНК провоспалительных цитокинов и TLRs в исследуемых нами структурах головного мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя. Так, были получены данные о том, что уровень мРНК TLR3 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс ($R^2 = 0,872$). Полученная корреляция может указать на вовлеченность TLR3-зависимой сигнализации в повышении экспрессии гена провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе мозга крыс. В других же структурах мозга (стриатум, миндалевидное тело, mEC) уровень мРНК TLR3 не коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β , что может указывать нам на то, что активация TLR3-зависимой сигнализации в других структурах мозга может приводить к развитию иных событий на уровне внутриклеточной сигнализации. К примеру, известно, что TLR3-зависимая сигнализация, наряду с TLR4-зависимой сигнализацией, может приводить к активации транскрипционных факторов интерферонов (IRF3), что в дальнейшем приводит уже к повышенной экспрессии генов интерферонов [5]. Далее корреляционный анализ показал нам, что уровень мРНК TLR4 коррелирует с уровнем мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе ($R^2 = 0,872$) и в mEC ($R^2 = 0,872$). На основе данной корреляции также можем сделать вывод, что TLR4-зависимая сигнализация, вероятно, также вовлечена в активацию экспрес-

сии провоспалительного гена IL-1 β в mEC и гиппокампе. Ранее исследователями было показано, что активация TLR4 приводит к повышению активности уровня не только IL-1 β , но и CCL2 [13, 14, 15]. Однако в нашем эксперименте уровень мРНК TLR4 не коррелирует ни в одной из структур мозга с уровнем цитокина CCL2. Полученный результат может объясняться выбранной нами иной методикой алкоголизации или отобранными экспериментальными группами для исследования уровня мРНК. Также возможно, что в исследуемых нами структурах мозга активация TLR4 не приводит к активации гена провоспалительного цитокина CCL2, но приводит в других, как это было показано ранее, например в префронтальной коре мозга в эксперименте на мышах [16]. Наблюдаемые изменения активности гена TLR4 на уровне мРНК в других структурах мозга, где уровень мРНК не коррелирует с IL-1 β , может объясняться тем, что TLR4-зависимая сигнализация в миндалевидном теле и стриатуме, возможно, приводит к активации иных провоспалительных генов. Известно, что как TLR4, так и TLR3 способны активировать транскрипционные факторы интерферонов (IRF3), что приводит к повышению экспрессии генов интерферонов [5]. Уровень мРНК TLR7 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс ($R^2 = 0,872$), что может также указывать на вовле-

ченность TLR7-зависимой сигнализации в активацию провоспалительных генов в данной структуре мозга. В других же структурах мозга на уровне мРНК TLR7 не наблюдается такой корреляции, что указывает на то, что TLR7-зависимая сигнализация в других структурах мозга может играть иную роль.

Выводы

Исследование показало, что экспрессия Toll-подобных рецепторов подвергается изменениям в результате потребления алкоголя во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс в период отмены алкоголя. При этом особого внимания заслуживает повышенный уровень экспрессии как TLRs, так и провоспалительных генов в период отмены алкоголя в гиппокампе мозга крыс, что свидетельствует о наличии стойкого нейровоспалительного процесса в данной структуре мозга в период отмены алкоголя, которая, вероятно, поддерживается при участии TLR-зависимой сигнализации. Изучение механизмов активации нейровоспалительного процесса посредством TLR-зависимой сигнализации в различных структурах мозга может открыть новые мишени с целью воздействия на них лекарственными препаратами [2, 15]. Такие лекарственные средства могут быть использованы в комплексной терапии алкоголизма.

Список литературы / References

1. Айрапетов М.И., Сексте Э.А., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Хроническая алкоголизация приводит к изменению уровня мРНК рецептора орексина первого типа (OX1R) в эмоциогенных структурах мозга крыс // Биомедицинская химия, 2018. Т. 64, № 5. С. 451-454. [Airapetov M.I., Sekste E.A., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. Chronic alcoholism leads to a change in the level of mRNA of the receptor of the first type of orexin (OX1R) in emotiogenic structures of the brain of rats. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2018, Vol. 64, no. 5, pp. 451-454. (In Russ.)]
2. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Сексте Э.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Употребление алкоголя приводит к активации нейроиммунной системы посредством белка HMGB1 // Наркология, 2019. Т. 18, № 5. С. 96-102. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Sekste E.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. The use of alcohol leads to activation of the neuroimmune system via protein HMGB1. *Narkologiya = Narcology*, 2019, Vol. 18, no. 5, pp. 96-102. (In Russ.)].
3. Айрапетов М.И., Хохлов П.П., Бычков Е.Р., Сексте Э.А., Якушина Н.Д., Лебедев А.А., Лавров Н.В., Шабанов П.Д. Влияние алкоголизации матерей на активность грелиновой системы в пренатальный и ранний постнатальный периоды развития у потомства крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2015. Т. 13, № 2. С. 10-13. [Airapetov M.I., Khokhlov P.P., Bychkov E.R., Sekste E.A., Yakushina N.D., Lebedev A.A., Lavrov N.V., Shabanov P.D. Influence of alcoholization of mothers on the activity of the grelin system in the prenatal and early postnatal periods of development in the offspring of rats. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2015, Vol. 13, no. 2, pp. 10-13. (In Russ.)]
4. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Сексте Э.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Отмена хронической алкоголизации приводит к увеличению количества мРНК CRFR2 в вентральной тегментальной области мозга у крыс // Биомедицинская химия, 2019. Т. 65, № 5. С. 385-387. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Sekste E.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. Ethanol withdrawal leads to an increase in the CRFR2 mRNA level in the ventricular tegmental region of the rat brain. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2019, Vol. 65, no. 5, pp. 385-387. (In Russ.)].
5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образ распознающих рецепторов. М.: Ленанд, 2017. 256 с. [Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immunology of image-recognizing receptors]. Moscow: Lenand, 2017. 256 p.
6. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 384 с. [Trukhacheva N.V. Mathematical statistics in biomedical research with the use of Statistica]. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 384 p.

7. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. Гормональные механизмы подкрепления. СПб.: Элби-СПб, 2008. 272 с. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Streltsov V.F. Hormonal mechanisms of reinforcement]. St. Petersburg: Elby-SPb, 2008. 272 p.
8. Blednov Y.A., Black M., Benavidez J.M., da Costa A., Mayfield J., Harris R.A. Sedative and motor incoordination effects of ethanol in mice lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2017, Vol. 41, no. 3, pp. 531-540.
9. Blednov Y.A., Ponomarev I., Geil C., Bergeson S., Koob G.F., Harris R.A. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict. Biol.*, 2012, Vol. 17, pp. 108-120.
10. Coleman L.G., Crews F.T. Innate immune signaling and alcohol use disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2018, Vol. 248, pp. 369-396.
11. Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 1-15.
12. Coleman L.G., Zou J., Qin L., Crews F.T. HMGB1/IL-1 β complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 72, pp. 61-77.
13. Crews F.T., Vetreno R.P. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2014, Vol. 118, pp. 315-357.
14. Crews F.T., Vetreno R.P. Mechanisms of neuroimmune gene induction I alcoholism. *Psychopharmacology*, 2016, Vol. 233, pp. 1543-1557.
15. Crews F.T., Walter T.J., Coleman L.G., Vetreno R.P. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology*, 2017, Vol. 234, no. 9-10, pp. 1483-1498.
16. Guerri C., Pascual M. Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2019, Vol. 77, pp. 89-98.
17. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates: compact. 7th ed. 2017. 388 p.
18. Randall P.A., Vetreno R.P., Makhijani V.H., Crews F.T., Besheer J. The Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C) induces rapid and lasting changes in gene expression related to glutamatergic function and increases ethanol self-administration in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2018, Vol. 43, no. 1, pp. 48-60.
19. Shabanov P.D., Airapetov M.I., Sekste E.A., Khokhlov P.P., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Vinogradov P.M., Roik R.O., Pavlenko V.P. Serum unacylated ghrelin concentrations and expression of GHSR mRNA in the rat brain structures after chronic alcoholization and ethanol withdrawal. *Eur. Neuropsychopharmacology*, 2014, Vol. 24, Suppl. 2, p. 653.
20. Warden A.S., Azzam M., DaCosta A., Mason S., Blednov Y.A., Messing R.O., Harris R.A. Toll-like receptor 3 dynamics in female C57BL/6J mice: Regulation of alcohol intake. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 77, pp. 66-76.

Авторы:

Айрапетов М.И. — к.м.н., доцент, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ереско С.О. — аспирант, мегафакультет биотехнологий и низкотемпературных систем ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

Бычков Е.Р. — к.м.н., заведующий лабораторией, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Лебедев А.А. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией, отдел нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шабанов П.Д. — д.м.н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фармакологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Airapetov M.I., PhD (Medicine), Associate Professor, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; Department of Pharmacology with a Course of Clinical Pharmacology and Pharmacoeconomics, St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, Russian Federation

Eresko S.O., Postgraduate Student, Mega-faculty of Biotechnologies and Low-temperature Systems, St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

Bychkov E.E., PhD (Medicine), Head of Laboratory, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shabanov P.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine; S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.07.2019
Отправлена на доработку 27.09.2019
Принята к печати 03.12.2019

Received 25.07.2019
Revision received 27.09.2019
Accepted 03.12.2019