

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИСТЕМЫ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КОРЕ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА МОЗГА КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЛКОГОЛЯ

М.И. Айрапетов^{1,3}, С.О. Ереско^{1,2}, П.Д. Игнатова¹, Д.А. Скабелкин¹, А.А. Михайлова¹,
Д.А. Ганьшина¹, А.А. Лебедев¹, Е.Р. Бычков¹, П.Д. Шабанов¹*

¹Институт экспериментальной медицины,
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12; *эл. почта: interleukin1b@gmail.com
²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова,
195067, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

³Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6, лит. Ж

Этанол служит причиной длительных изменений в системе toll-подобных рецепторов (TLR), способствуя активации путей нейровоспаления. Употребление алкоголя во время беременности вызывает нейровоспалительный процесс у плода, что может приводить к развитию симптомов фетального алкогольного спектра нарушений (ФАСН). В нашем исследовании показано, что пренатальное воздействие алкоголя вызывает долгосрочные изменения в экспрессии генов системы TLR-сигнализации (*Tlr3*, *Tlr4*, *Ticam*, *Hmgb1*, генов цитокинов) в коре переднего отдела мозга крысят. Применение рифампицина (Rif), способного снижать уровень провоспалительных медиаторов при различных патологических состояниях нервной системы, нормализовало изменённый уровень экспрессии исследуемых генов TLR-сигнализации. Это свидетельствует о том, что Rif может предотвращать развитие стойких нейровоспалительных явлений в коре переднего отдела мозга крысят, вызванных дисрегуляцией в системе TLR.

Ключевые слова: мозг; ПВА; алкоголь; toll-подобные рецепторы; нейровоспаление; рифампицин

DOI: 10.18097/PBMC20236904228

ВВЕДЕНИЕ

Пренатальные повреждения центральной нервной системы (ЦНС) приводят к развитию неврологических и когнитивных расстройств у детей [1–4]. Пренатальное воздействие алкоголя (ПВА) служит причиной фетального алкогольного спектра нарушений (ФАСН) [5], в котором особое место занимает спектр нарушений со стороны ЦНС, которая является одной из наиболее чувствительных к поступающему со стороны матери алкоголю [5–8].

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что медиаторы воспаления, в том числе цитокины, задействованы в механизмах регуляции высших функций мозга [9]. Однако в мировой литературе до сих пор мало работ, посвящённых изучению состояния нейроиммунных взаимодействий в развивающемся мозге при ПВА, и практически отсутствуют сведения о влиянии ПВА на систему врождённого иммунитета в ЦНС.

Цель нашей работы заключалась в получении новых сведений о влиянии ПВА на уровень экспрессии генов системы врождённого иммунитета у крыс в коре переднего отдела мозга в неонатальном периоде развития и фармакологической коррекции нейроиммунных механизмов в мозге крысят с ПВА при помощи рифампицина (Rif). Ранее Rif показал противовоспалительные и нейропротекторные свойства на различных моделях патологических состояний нервной системы [10–13].

МЕТОДИКА

Животные

В эксперименте были использованы взрослые самцы (250–300 г, n=3) и самки (200–250 г, n=6) крыс породы Wistar, приобретённые в питомнике “Рапполово” (Россия). Животных содержали в отдельных пластиковых клетках с неограниченным доступом к воде и корму. Каждый самец был спарен с двумя самками. Первый день беременности устанавливали на основании обнаружения у самок сперматозоидов в вагинальном мазке. При обнаружении сперматозоидов самок животных маркировали, определяли массу тела, отсаживали её в отдельную клетку и начинали отсчёт срока беременности.

Моделирование пренатального воздействия алкоголя (ПВА)

Беременные крысы были разделены на две группы: группа полупринудительной алкоголизации 15% раствором этанола в качестве единственного источника жидкости (n=3) и контрольная группа, получающая воду (n=3). В каждом помёте было по 8–10 крысят, для продолжения эксперимента оставляли по 6 крысят в помёте (18 крысят с ПВА, 18 крысят без ПВА). При измерении массы тела животных (беременных крыс и потомства) значительных различий между группами обнаружено не было.

Введение рифампицина (Rif)

Из каждого помёта случайным образом было отобрано по 2 животных. На протяжении первых 7 суток неонатального развития животным с ПБА (группа “ПБА + Rif”, n=6) внутривенно (в/в) вводили рифампицин 50 мг/кг, (“Белмедпрепараты”, Беларусь). Rif растворяли в физиологическом растворе (физ. р-р). Второй (“ПБА + физ. р-р”; n=4) и третьей (“контроль”; n=6) группе крысят на протяжении первых 7 суток неонатального развития в/в вводили физ. р-р в эквивалентном объёме. На 8 сутки постнатального развития был произведён забор коры переднего отдела мозга. Образцы немедленно замораживали и хранили при -78°C.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Тотальную РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб проводили с использованием ДНКазы (“Promega”, США). Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 (“Implen”, Германия). Чистоту выделенного продукта оценивали по отношению A_{260}/A_{280} (в норме $\geq 1,8$). Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit (“Евроген”) в полном соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени проводили в амплификаторе Mx3005P (“Stratagene”, США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green MIX (“Biolabmix”, Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (“Beagle”, Россия), подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (таблица). Полученные данные нормировали к уровню

гена *Gapdh* и рассчитывали в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена (таблица) методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [14].

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Graph Pad Prism v. 6. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых малых выборок. Нормальность распределения проверяли тестом Д’Агостино-Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ПБА на уровень экспрессии генов TLR

На 8 сутки после рождения в коре переднего отдела мозга животных группы “ПБА + физ. р-р” были повышены уровни мРНК TLR3 (в 1,46 раз) и TLR4 (в 1,75 раз). Уровень мРНК TLR7 значимо не изменялся (рис. 1). Анализ содержания мРНК адаптерных белков (MYD88, TICAM) (рис. 2) и транскрипционных факторов (NF- κ B, IRF1, IRF3, IRF7) (рис. 3), вовлечённых в TLR-опосредованную сигнализацию, выявил повышение содержания мРНК TICAM (в 1,73 раза) (рис. 2). Исследование содержания мРНК для ряда провоспалительных (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , CCL2) (рис. 4) и противовоспалительных цитокинов (TGF- β , IL-13, IL-10, IL-11, IL-4) (рис. 5) показало, что на 8 сутки в коре переднего отдела мозга животных был повышен уровень мРНК: IL-1 β (в 1,38 раз), TNF- α (в 1,54 раза), IFN- γ (в 1,94 раза), CCL2 (в 1,29 раз), IL-13 (в 1,88 раз), IL-10 (в 3,64 раза), IL-11 (в 2,24 раза), IL-4 (в 1,71 раза). Также был отмечен повышенный уровень мРНК HMGB1 — белка, который опосредует активацию TLR4-сигнализации, которая приводит к экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов (в 1,54 раза) (рис. 6).

Таблица. Последовательность праймеров

| Ген | Праймеры | |
|--------------|------------------------|-------------------------|
| | Прямой (5'-3') | Обратный (5'-3') |
| <i>Tlr3</i> | AACTGGAGAACCTCCAAGA | CACCCTGGAGAAAACCTCTTT |
| <i>Tlr4</i> | ACTCTGATCATGGCATTGTT | GTCTCAATTTACACACCTGGA |
| <i>Tlr7</i> | TGAAAATGGTATTTCCAATGTG | TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA |
| <i>Hmgbl</i> | CTCTGATGCAGCTTATACGA | AAAAGACTAGCTTCCCCTTG |
| <i>Myd88</i> | TCATTGAGAAAAGGTGTCGT | AGTGCAGATAGTGATGAAC |
| <i>Ticam</i> | GCTCAGCTAGATGATGTGAT | TGACAGTGCAGACCTGG |
| <i>Nfkb</i> | ATACTGCTTTGACTCACTCC | AGGTATGGGCCATCTGTT |
| <i>Irf1</i> | CGGAAGTTACCTTCTAGCTC | CGGAAGTTACCTTCTAGCTC |
| <i>Irf3</i> | AATTCCTCCCCTGGCTC | CATGGGATCCTGAACCTTTGT |
| <i>Irf7</i> | TTGGTTACACTATCTGTGGC | CTACTGACCTCACCCAAGA |
| <i>Il1b</i> | TGTCTGACCCATGTGAGCTG | TTTGGGATCCACACTCTCCAG |
| <i>Ccl2</i> | AAGATGATCCCAATGAGTCG | TGGTGACAAATACTACAGCTT |
| <i>Il10</i> | CTGCAGGACTTTAAGGGTTA | CCTTTGCTTGGAGCTTATT |
| <i>Il6</i> | ACTTCAACAAGTCGAGGCTT | AATTGCCATTGCACAACCTTTTC |
| <i>Tnfα</i> | CACGTCGTAGCAAACCAC | TATGAAATGGCAAATCGGCT |
| <i>Tgfβ</i> | GGACTACTACGCCAAAGAAG | GGTTTTGTGCATAGATTGCGTT |
| <i>Il13</i> | TGTAACCAAAAGGCCTCGGA | TGGCCATAGCGGAAAAGTTG |
| <i>Il4</i> | CGGTGAACCTGAGGAACT | TCAGTGTTGTGAGCGTGG |
| <i>Ifnγ</i> | AGCCTAGAAAAGTCTGAAGAAC | ATTTTCGTGTTACCGTCCTTT |
| <i>Il11</i> | GGGACATGAACTGTGTTTGT | GGTAGGTAGGGAGTCCAGAT |
| <i>Gapdh</i> | GCCAGCCTCGTCTCATA | GTGGGTAGAGTCATACTGGA |

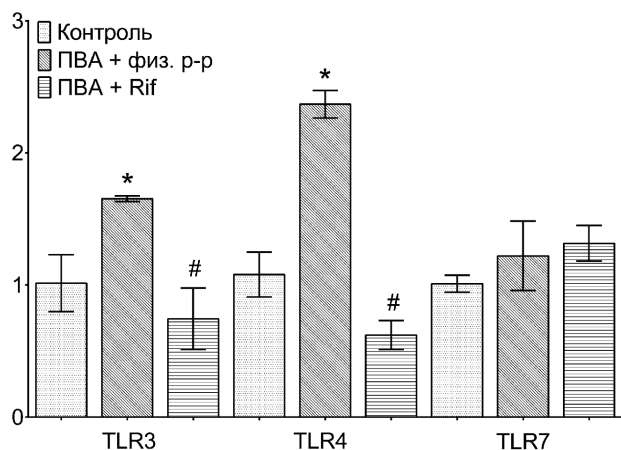


Рисунок 1. Содержание мРНК TLR в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю, # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе ПВА).

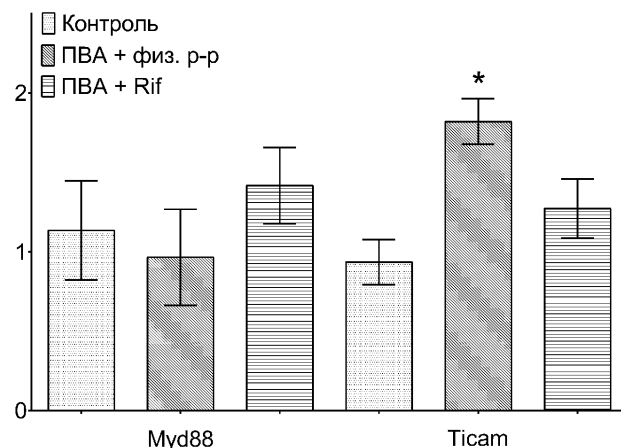


Рисунок 2. Содержание мРНК адаптерных белков в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю).

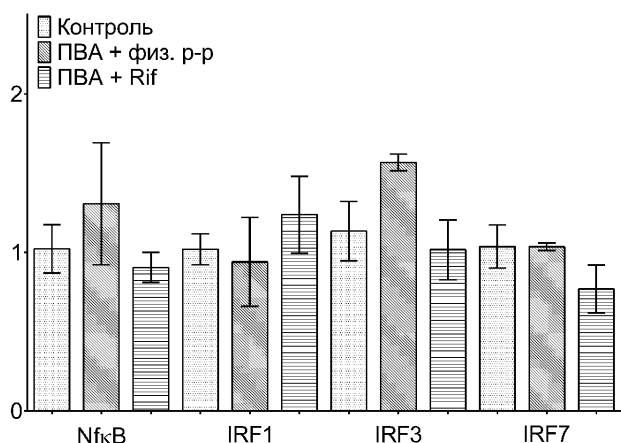


Рисунок 3. Содержание мРНК транскрипционных факторов в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю, # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе ПВА).

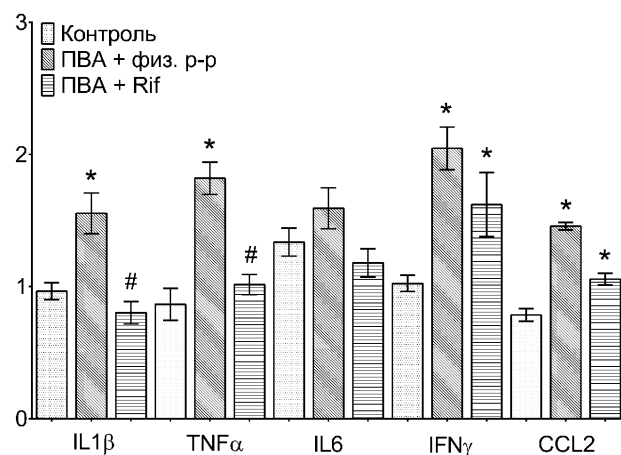


Рисунок 4. Содержание мРНК провоспалительных цитокинов в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю, # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе ПВА).

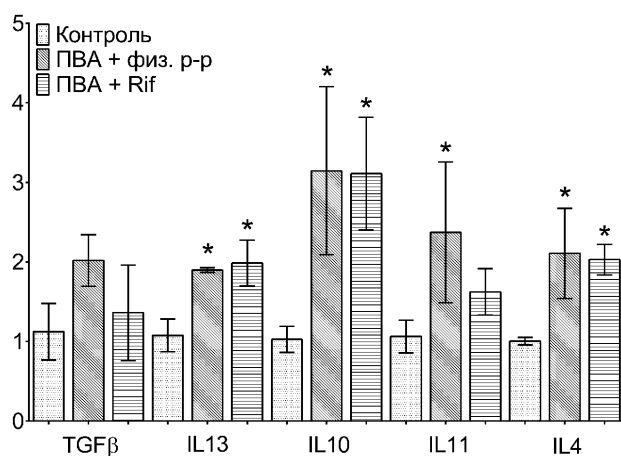


Рисунок 5. Содержание мРНК противовоспалительных цитокинов в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю).

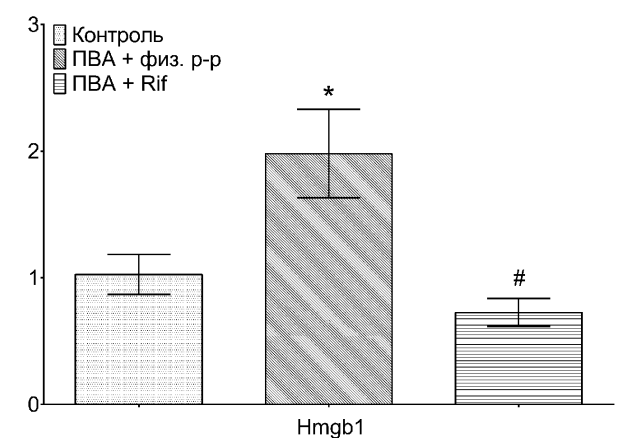


Рисунок 6. Содержание мРНК HMGB1 в коре переднего мозга крысят на 8 сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения \pm SEM; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю, # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе ПВА).

Влияние Rif на уровень экспрессии генов TLR-сигнальных путей цитокинов в коре переднего отдела мозга животных с ПБА

В/бр введение Rif (50 мг/кг) животным с ПБА с 1 по 7 сутки неонатального развития вызвало снижение уровня мРНК TLR3 (в 2,23 раза) и TLR4 (в 3,02 раза) до уровня контрольных значений (рис. 1). Статистически значимых различий между группами “ПБА + Rif” и контрольной выявлено не было. В группе животных “ПБА + Rif” не было выявлено значимых изменений мРНК исследуемых адаптерных белков (рис. 2) и транскрипционных факторов (рис. 3). Однако в/бр введение Rif нормализовало уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β ($p \leq 0,05$) и TNF- α ($p \leq 0,05$) (рис. 4), а также содержание мРНК HMGB1 ($p \leq 0,05$) до уровня контрольных значений (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Поступление алкоголя в организм вызывает различные изменения в системе TLR-сигнализации в структурах головного мозга [15–20]. С помощью агонистов и антагонистов к TLR, а также генетических манипуляций несколькими группами исследователей был подтвержден тот факт, что изменение активности TLR-сигнальной системы опосредует развитие нейровоспалительных явлений в нервной ткани [18–19, 21–27].

Имеются сведения, что все подтипы TLR экспрессируются в головном мозге, начиная с самых ранних стадий онтогенеза [28–29]. Обнаружены изменения в системе TLR-сигнализации мозга у потомства при некоторых пренатальных патологиях [30–33]. Мы предположили, что в развивающемся мозге ПБА может быть причиной долгосрочных изменений в системе TLR-сигнализации.

Выполненное нами моделирование ПБА позволило получить данные о том, что в коре переднего отдела мозга животных с ПБА на 8 сутки постнатального развития повышен уровень мРНК TLR3 и TLR4. Нами не выявлено изменений в содержании мРНК TLR7 в коре переднего отдела мозга животных с ПБА. Возможно, система TLR7 более устойчива к ПБА в коре или изменения в экспрессии гена *Tlr7* носят менее длительный характер.

В/бр введение Rif в нашем эксперименте понизило уровень мРНК TLR3 и TLR4 в группе животных с ПБА до уровня контрольных значений. Данное соединение нами было выбрано исходя из того, что на разных моделях нейровоспаления была показана способность Rif снижать уровень провоспалительных цитокинов, содержание β -амилоида в модели болезни Альцгеймера, α -синуклеина в модели болезни Паркинсона [33–36].

Выполненное нами исследование показало, что в группе животных с ПБА в коре переднего отдела мозга на 8 сутки постнатального развития был повышен уровень мРНК HMGB1. Во внеклеточном пространстве HMGB1 способен

взаимодействовать с TLR2, TLR4, TLR5 и TLR7, что служит причиной активации соответствующих этим рецепторам путей внутриклеточной сигнализации [37, 38]. В/бр введение Rif понизило уровень мРНК HMGB1 до контрольных значений. Определение уровня мРНК компонентов TLR-сигнализации показало повышенное содержание мРНК TICAM и IRF3 в коре переднего отдела мозга животных с ПБА на 8 сутки постнатального развития. При этом в группе животных “ПБА + Rif” уровень мРНК IRF3 соответствовал контрольным значениям.

В группе животных “ПБА+физ. р-р” уровень мРНК IL-1 β , TNF- α , IFN- γ и CCL2 был повышен. Это свидетельствует о том, что состояние экспрессии генов провоспалительных цитокинов подвержено длительным изменениям в развивающемся мозге с ПБА. Однако молекулярные причины, инициирующие эти события, а также последствия таких изменений (включая изменение уровня кодируемых этими генами белков) ещё предстоит исследовать, как предстоит исследовать и то, насколько изменение уровня мРНК противовоспалительных цитокинов приводит к изменению соответствующих белковых продуктов.

Таким образом, вызванная ПБА повышенная активность путей нейровоспаления, вероятно, инициирует активацию генов противовоспалительных/нейропротекторных путей, обнаруженную на 8 сутки постнатального развития. Вполне вероятно, что как повышенный уровень экспрессии провоспалительных, так и повышенный уровень экспрессии генов, имеющих отношение к функционированию противовоспалительных/нейропротекторных механизмов, могут оказывать неблагоприятные воздействия на нормальный ход нейрогенеза у потомства, что в дальнейшем может послужить причиной формирования когнитивных и прочих нарушений, ассоциированных с формированием расстройств ФАЧН.

Введение Rif приводило к достоверному снижению уровня мРНК ключевых провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β . На уровень мРНК других анализируемых нами цитокинов введение Rif не оказало значимого влияния. Возможно, это связано с тем, что дозировка Rif была недостаточна для устранения всех вызванных изменений в экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Кроме того, можно предположить, что в дисрегуляцию уровня экспрессии генов цитокинов, связанную с ПБА, вносят вклад ещё и иные молекулярные внутриклеточные механизмы, которые ещё предстоит изучить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное нами исследование позволило получить новые данные о состоянии экспрессии генов системы TLR-сигнализации в коре переднего отдела мозга животных с ПБА на 8 сутки постнатального развития. Результаты исследования показали способность Rif корректировать наблюдаемые долгосрочные патологические изменения

в системе TLR. Было выявлено снижение повышенного уровня мРНК TLR3, TLR4, HMGB1, IL-1 β и TNF- α в коре переднего отдела мозга животных с ПВА.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022-2025 гг.) "Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС", шифр FGWG-2022-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Используемые в работе методы были одобрены Этическим комитетом по уходу и использованию животных Института экспериментальной медицины (протокол №21/5 от 26.02.2015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Couch A.C.M., Berger T., Hanger B., Matuleviciute R., Srivastava D.P., Thuret S., Vernon A.C. (2021) Maternal immune activation primes deficiencies in adult hippocampal neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.*, **97**, 410-422. DOI: 10.1016/j.bbi.2021.07.021
2. Nolvi S., Merz E.C., Kataja E.L., Parsons C.E. (2022) Prenatal stress and the developing brain: Postnatal environments promoting resilience. *Biol. Psychiatry*, **93**(10), 942-952. DOI: 10.1016/j.biopsych.2022.11.023
3. Woods R.M., Lorusso J.M., Potter H.G., Neill J.C., Glazier J.D., Hager R. (2021) Maternal immune activation in rodent models: A systematic review of neurodevelopmental changes in gene expression and epigenetic modulation in the offspring brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **129**, 389-421. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2021.07.015
4. Usui N., Kobayashi H., Shimada S. (2023) Neuroinflammation and oxidative stress in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(6), 5487. DOI: 10.3390/ijms24065487
5. Mattson S.N., Bernes G.A., Doyle L.R. (2019) Fetal alcohol spectrum disorders: A review of the neurobehavioral deficits associated with prenatal alcohol exposure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **43**(6), 1046-1062. DOI: 10.1111/acer.14040
6. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. (1998) Биология алкоголизма, Лань, СПб, 272 с. [Shabanov P.D., Kalishevich S.Yu. (1998) Biology of Alcoholism. Lan', 272 p.]
7. Riley E.P., Infante M.A., Warren K.R. (2011) Fetal alcohol spectrum disorders: An overview *Neuropsychol. Rev.*, **21**, 73-78.
8. Айрапетянц М.Г. (1989) Последствия алкогольной интоксикации для потомства, Наука, Москва 124 с. [Ajrapetyancz M.G. (1989) Posledstviya Alkogol'noj Intoksikaczii Dlya Potomstva, Nauka, Moskva, 124 p.]
9. Siegel A., Zalcman S.S. (2008) The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders, Springer, USA, 454 p.
10. Wang X., Grace P.M., Pham M.N., Cheng K., Strand K.A., Smith C., Li J., Watkins L.R., Yin H. (2013) Rifampin inhibits toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J.*, **27**(7), 2713-2722. DOI: 10.1096/fj.12-222992
11. Bi W., Zhu L., Jing X., Zeng Z., Liang Y., Xu A., Liu J., Xiao S., Yang L., Shi Q., Guo L., Tao E. (2014) Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Mol. Med. Rep.*, **10**(4), 1793-1799. DOI: 10.3892/mmr.2014.2480
12. Bi W., Cheng X., Zeng Z., Zhou R., Luo R., Zhang J., Zhu L. (2021) Rifampicin ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive and motor impairments via inhibition of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in mice. *Neurol. Res.*, **43**(5), 358-371. DOI: 10.1080/01616412.2020.1866353
13. Zahednasab H., Firouzi M., Kaboudanian-Ardestani S., Mojallal-Tabatabaei Z., Karampour S., Keyvani H. (2019) The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. *Cytokine*, **113**, 417-426. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.016
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, **25**(4), 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
15. Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. (2021) The role of toll-like receptors in neurobiology of alcoholism. *BioScience Trends*, **15**(2), 74-82. DOI: 10.5582/bst.2021.01041
16. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2020) Уровень экспрессии toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола. *Медицинская иммунология*, **22**(1), 77-86. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2020) The expression level of toll-like receptors changes in the emotiogenic brain structures of rats under conditions of prolonged alcoholization and ethanol withdrawal. *Medical Immunology*, **22**(1), 77-86.] DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-1836
17. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Кочкин Д.В., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2022) Гинзенозиды влияют на систему toll-подобных рецепторов в структурах головного мозга крыс в условиях отмены длительной алкоголизации. *Биомедицинская химия*, **68**(6), 459-469. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Kochkin D.V., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2022) Ginsenosides affect the system of toll-like receptors in the brain of rats under conditions of long-term alcohol withdrawal. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(6), 459-469.] DOI: 10.18097/PBMC20226806459
18. Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J. Neuroinflammation*, **14**(1), 1-15. DOI: 10.1186/s12974-017-0799-4
19. Gano A., Lebonville C.L., Becker H.C. (2022) TLR3 activation with poly I:C exacerbates escalated alcohol consumption in dependent male C57BL/6J mice. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, **12**, 1-12. DOI: 10.1080/00952990.2022.2092492
20. Lawrimore C.J., Coleman L.G., Crews F.T. (2019) Ethanol induces interferon expression in neurons via TRAIL: Role of astrocyte-to-neuron signaling. *Psychopharmacology (Berlin)*, **236**(10), 2881-2897. DOI: 10.1007/s00213-018-5153-8

21. Qin L., Zou J., Barnett A., Vetreño R.P., Crews F.T., Coleman L.G. Jr. (2021) TRAIL mediates neuronal death in AUD: A link between neuroinflammation and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(5), 2547. DOI: 10.3390/ijms22052547
22. Rizzo M.D., Crawford R.B., Bach A., Sermet S., Amalfitano A., Kaminski N.E. (2019) Imiquimod and interferon-alpha augment monocyte-mediated astrocyte secretion of MCP-1, IL-6, and IP-10 in a human co-culture system. *J. Neuroimmunol.*, **333**, 576969. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.576969
23. Chen T., Chen C., Zhang Z., Zou Y., Peng M., Wang Y. (2016) Toll-like receptor 4 knockout ameliorates neuroinflammation due to lung-brain interaction in mechanically ventilated mice. *Brain Behav. Immun.*, **56**, 42-55. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.04.004
24. Alfonso-Loeches S., Pascual-Lucas M., Blanco A.M., Sanchez-Vera I., Guerri C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci.*, **30**(24), 8285-8295. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010
25. Ferguson C., McKay M., Harris R.A., Homanics G.E. (2013) Toll-like receptor 4 (TLR4) knockout rats produced by transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene inactivation. *Alcohol*, **47**(8), 595-599. DOI: 10.1016/j.alcohol.2013.09.043
26. Shukla P.K., Meena A.S., Rao R., Rao R. (2018) Deletion of TLR-4 attenuates fetal alcohol exposure-induced gene expression and social interaction deficits. *Alcohol*, **73**, 73-78. DOI: 10.1016/j.alcohol.2018.04.004
27. Wang P., Liu B.-Y., Wu M.-M., Wei X.-Y., Sheng S., You S.-W., Shang L.-X., Kuang F. (2019) Moderate prenatal alcohol exposure suppresses the TLR4-mediated innate immune response in the hippocampus of young rats. *Neurosci. Lett.*, **699**, 77-83. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.01.049
28. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Скабелкин Д.А., Исканиева А.Р., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. (2022) Влияние рифампицина на систему toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре мозга длительно алкоголизированных крыс в период отмены алкоголя. *Биомедицинская химия*, **68**(4), 279-287. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Skabelkin D.A., Iskanieva A.R., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. (2022) The effect of rifampicin on the system of toll-like receptors in the nucleus accumbens of the brain of long-term alcoholized rats during alcohol withdrawal. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(4), 279-287.] DOI: 10.18097/PBMC20226804279
29. Kaul D., Habbal P., Derkow K., Krüger C., Franzoni E., Wulczyn F.G., Bereswill S., Nitsch R., Schott E., Veh R., Naumann T., Lehnardt S. (2012) Expression of toll-like receptors in the developing brain. *PLoS One.*, **7**(5), e37767. DOI: 10.1371/journal.pone.0037767
30. MacDowell K.S., Munarriz-Cuevas E., Caso J.R., Madrigal J.L.M., Zabala A., Meana J.J., García-Bueno B., Leza J.C. (2017) Paliperidone reverts toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, **116**, 196-207. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.12.025
31. Chin P.Y., Dorian C., Sharkey D.J., Hutchinson M.R., Rice K.C., Moldenhauer L.M., Robertson S.A. (2019) Toll-like receptor-4 antagonist (+)-naloxone confers sexually dimorphic protection from inflammation-induced fetal programming in mice. *Endocrinology*, **160**(11), 2646-2662. DOI: 10.1210/en.2019-00493
32. O'Loughlin E., Pakan J.M.P., Yilmazer-Hanke D., McDermott K.W. (2017) Acute *in utero* exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J. Neuroinflammation*, **14**(1), 212. DOI: 10.1186/s12974-017-0981-8
33. Ali A.E., Mahdy H.M., Elsherbiny D.M., Azab S.S. (2018) Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machineries. *Biochem. Pharmacol.*, **156**, 431-443. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.09.004
34. Qosa H., Abuznait A.H., Hill R.A., Kaddoumi A. (2012) Enhanced brain amyloid- β clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, **31**(1), 151-165. DOI: 10.3233/JAD-2012-120319
35. Acuña L., Hamadat S., Corbalán N.S. (2019) Rifampicin and its derivative rifampicin quinone reduce microglial inflammatory responses and neurodegeneration induced *in vitro* by α -synuclein fibrillary aggregates. *Cells*, **8**(8), 776. DOI: 10.3390/cells8080776
36. Acuña L., Corbalán N.S., Raisman-Vozari R. (2020) Rifampicin quinone pretreatment improves neuronal survival by modulating microglia inflammation induced by α -synuclein. *Neural. Regen. Res.*, **15**(8), 1473-1474. DOI: 10.4103/1673-5374.274336
37. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2021) Экспрессия гена *Hmgb1* изменяется в стриатуме и амигдале мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола. *Биомедицинская химия*, **67**(1), 95-99. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2021) *Hmgb1* gene expression changes in the striatum and amigdal of the rat's brain under alcoholization and ethanol withdrawal. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 95-99.] DOI: 10.18097/PBMC20216701095
38. Blednov Y.A., Ponomarev I., Geil C., Bergeson S., Koob G.F., Harris R.A. (2012) Neuroimmune regulation of alcohol consumption: Behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addiction Biology*, **17**(1), 108-120. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x

Поступила в редакцию: 10. 04. 2023.
После доработки: 20. 05. 2023.
Принята к печати: 08. 06. 2023.

THE EFFECT OF RIFAMPICIN ON EXPRESSION OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR SYSTEM GENES
IN THE FOREBRAIN CORTEX OF RATS PRENATALLY EXPOSED TO ALCOHOL

M.I. Airapetov^{1,3}, S.O. Eresko^{1,2}, P.D. Ignatova¹, D.A. Skabelkin¹, A.A. Mikhailova¹,
D.A. Ganshina¹, A.A. Lebedev¹, E.R. Bychkov¹, P.D. Shabanov¹*

¹Institute of Experimental Medicine,
12 Akad. Pavlova str., St. Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: interleukin1b@gmail.com

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
41 Kirochnaya str., St. Petersburg, 195067 Russia

³Military Medical Academy of S.M. Kirov,
6G Akad. Lebedeva str., St. Petersburg, 194044 Russia

Ethanol causes long-term changes in the toll-like receptor (TLR) system, promoting activation of neuroinflammation pathways. Alcohol use during pregnancy causes neuroinflammatory processes in the fetus; this can lead to the development of symptoms of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). Our study has shown that prenatal alcohol exposure (PAE) induced long-term changes in the TLR system genes (*Tlr3*, *Tlr4*, *Ticam*, *Hmgb1*, cytokine genes) in the forebrain cortex of rat pups. Administration of rifampicin (Rif), which can reduce the level of pro-inflammatory mediators in various pathological conditions of the nervous system, normalized the altered expression level of the studied TLR system genes. This suggests that Rif can prevent the development of persistent neuroinflammatory events in the forebrain cortex of rat pups caused by dysregulation in the TLR system.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: brain; PAE; alcohol; toll-like receptors; neuroinflammation; rifampicin

Funding. The work was carried out within the framework of the State Task of the Ministry of Education and Science of Russia (2022-2025) “Search for molecular targets for pharmacological effects in addictive and neuroendocrine disorders and the creation of new pharmacologically active substances acting on CNS receptors”, code FGWG-2022-0004.

Received: 10.04.2023; revised: 20.05.2023; accepted: 08.06.2023.