

©Коллектив авторов

ХРОНИЧЕСКАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ ИЗМЕНЯЕТ СОДЕРЖАНИЕ МИКРО-РНК В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

М.И. Айрапетов^{1,3*}, С.О. Ереско^{1,2}, С.А. Шамаева¹, Н.М. Матвеев¹, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, 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. Академика Лебедева, 6, лит. Ж

Исследуемые в работе молекулы микро-РНК (miR) участвуют в молекулярных механизмах реализации TLR4- и TLR7-сигналикации, что опосредует развитие процессов нейровоспаления и нейродегенерации. В работе представлены новые сведения относительно уровня экспрессии miR-let7b, miR-96, miR-182, miR-155 и содержания мРНК HMGB1, TLR3, TLR4 в прилежащем ядре (*nucleus accumbens*, NAc) головного мозга у длительно алкоголизованных крыс. Длительная алкоголизация вызвала снижение уровня содержания miR-let7b, miR-96, miR-182 и мРНК TLR7, привела к повышению уровня miR-155, мРНК TLR4 и Hmgb1 в NAc головного мозга крыс. TLR7 имеет функциональную связь с miR-let7b. Полученные данные об одновременном снижении miR-let7b и мРНК TLR7 представляют интерес для дальнейших исследований, они могут указывать на отсутствие функционально значимой взаимосвязи между Hmgb1 и системой miR-let7b-TLR7 в NAc. Имеющиеся сведения о наличии функциональной взаимосвязи между TLR4 с miR-155 и miR-182 и полученные нами наблюдения об изменении их экспрессии при длительной алкоголизации также кажутся нам весьма интересным наблюдением, требующим дальнейших исследований. В связи с предположением о развитии нейровоспалительного процесса в NAc при длительном воздействии алкоголя, становится актуальным исследование в NAc уровня экспрессии генов TLR, а также экспрессии молекул miR, которые могут иметь с системой TLR функциональную взаимосвязь.

Ключевые слова: *nucleus accumbens*; алкоголь; нейровоспаление; TLR; микро-РНК

DOI: 10.18097/PBMC20236904235

ВВЕДЕНИЕ

Хроническое употребление алкоголя служит причиной биохимических, функциональных и структурных изменений среди различных отделов головного мозга [1–4]. Имеются сведения о наличии таких изменений в прилежащем ядре (*nucleus accumbens*, NAc) головного мозга при длительном поступлении алкоголя в организм [5–7], однако механизмы, опосредующие эти явления, остаются недостаточно изученными. При этом хорошо известно, что NAc является важной частью мезолимбического пути и служит ключевым звеном в системе внутреннего подкрепления, опосредует эффекты психостимулирующих средств, в частности, этанола [3, 4, 8, 9].

Ряд исследователей отмечают изменения в содержании молекул микро-РНК (miR) в плазме крови и в ряде структур головного мозга при длительном воздействии алкоголя на организм [10, 11]. Микро-РНК — класс малых некодирующих РНК, которые, нацеливаясь на мРНК, могут участвовать в механизмах регуляции синтеза белка в клетке. Помимо этой общеизвестной опосредованной регуляторной роли, молекулы miR также могут выступать в качестве физиологических

специфических лигандов к toll-подобным рецепторам (TLR) и инициировать сигнальные каскады иммунного ответа [12].

Существуют данные о том, что многие молекулы miR потенциально могут контролировать ключевые механизмы, определяющие развитие нейровоспаления и нейродегенерации в результате длительного употребления алкоголя [10, 13–17]. Некоторые подтипы TLR также связаны с развитием нейровоспалительных и нейродегенеративных событий в головном мозге при длительном употреблении алкоголя [14, 15, 18]. В ряде исследований сообщается о возможной функциональной взаимосвязи между miR-let7b, miR-96, miR-182, miR-155 и TLR в ЦНС [13–17]. В связи с этим целью данной работы было сопоставление уровней этих микро-РНК и экспрессии генов TLR в NAc в условиях длительной алкоголизации у крыс.

МЕТОДИКА

Животные

Работа выполнена на 14 крысах-самцах линии Wistar (начальный возраст 2–3 месяца, масса тела 280±30 г), полученных из питомника лабораторных животных (“Рапполово”, Россия).

Длительная алкоголизация

Длительную алкоголизацию крыс (n=7) моделировали внутрижелудочным введением 20% раствора этанола, который вводили с помощью желудочного зонда в течение 1 месяца в дозе 2 г/кг этанола ежедневно с понедельника по пятницу (всего 20 введений). Массу тела измеряли еженедельно для уточнения вводимых количеств раствора этанола. Контрольная группа крыс (n=7) получала воду в эквивалентном количестве с помощью желудочного зонда на протяжении всего эксперимента.

Забор биоматериала

По окончании эксперимента крыс декапитировали без наркоза с использованием гильотины в последний день алкоголизации и производили забор прилежащего ядра головного мозга. Границы структуры мозга были определены в соответствии с атласом мозга крысы. Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C.

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК выполняли реагентом 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 $\geq 1,8$).

ОТ-ПЦР

Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit ("Евроген") в полном соответствии с инструкцией производителя. Перед проведением ОТ для miR было выполнено полиаденилирование с помощью поли(А)-полимеразы *E. coli* ("New England Biolabs Inc.", США) по ранее описанной методике [19]. ОТ для miR проводили в 10 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit ("Евроген") и специфического PolyT-адаптера (5'-GCGAGCACAGAATTAATAC GACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTVN-3') [19].

Таблица. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGTA
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTCCCCCTTG
<i>miR-182</i>	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-155-5p</i>	TTAATGCTAATTGTGATAGGGGT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-96-5p</i>	TTTGGCACTAGCACATTTTGCT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-let-7b</i>	GCGGCGGTATACAACCTACTGC	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>U6</i>	TGCTTCGGCAGCATATAC	AGGGGCCATGCTAATCTTCT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени проводили в амплификаторе Mx3005P ("Stratagene", США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green ("Евроген") и смесь специфических прямых и обратных праймеров (таблица) ("Beagle", Россия). Относительный уровень содержания мРНК и miR рассчитывался методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, содержание мРНК нормировали к уровню экспрессии гена *Gapdh*, уровень miR нормировали к уровню экспрессии гена *U6*.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Graph Pad Prizm v.6. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что исследуемые в данной работе miR могут иметь функциональную взаимосвязь с сигнальными путями toll-подобных рецепторов (TLR7 и TLR4), которые участвуют в инициации нейровоспалительных событий, развивающихся при хронической алкоголизации [10, 13–17]. Известно, что miR-let7b является эндогенным агонистом TLR7 [13, 18]. Изменение экспрессии miR-let7b может иметь функциональную взаимосвязь с TLR7-сигнальным каскадом реакций [13, 15, 18]. Описано, что при активации TLR4 наблюдается повышение miR-155 в микроглии головного мозга мышей, тогда как у нокаутных по гену *Tlr4* (TLR4-KO) мышей этого не наблюдается [14]. У мышей TLR4-KO не изменяется содержание miR-96 коре головного мозга, тогда как длительная алкоголизация у мышей дикого типа снижала в уровень miR-96 [16, 17].

В нашем эксперименте длительная алкоголизация крыс в течение 1 месяца привела к снижению уровня miR-let7b в 1,71 раза в НАС головного мозга, уровень miR-96 снизился в 3,87 раза, уровень miR-182 снизился в 2,29 раза. Напротив, содержание miR-155 повысилось в 1,41 раза (рис. 1).

В результате длительной алкоголизации уровень мРНК TLR7, также как и miR-let7b, в NAc был понижен (рис. 2). Однонаправленные изменения (повышение содержания) обнаружены и в случае мРНК TLR4 (рис. 2) и miR-155.

Механизм взаимодействия кластера микро-РНК miR-183C (в него входят miR-96 и miR-182) с TLR4 не до конца изучен, однако есть работы, в которых

на примере miR-182-5p сообщается о возможном существовании таких взаимосвязей [16, 17]. В нашем эксперименте при повышенном содержании мРНК TLR4 в NAc мы наблюдали пониженный уровень экспрессии miR-96 и miR-182.

По данным [15] этанол вызывает образование комплексов HMGB1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством активации TLR7 в нейронах. Результаты нашего эксперимента выявили повышенный уровень мРНК Hmgb1 в NAc (рис. 3), тогда как miR-let7b и мРНК TLR7 были понижены. Такие данные, по всей видимости, указывают на отсутствие функционально значимой взаимосвязи между Hmgb1 и системой miR-let7b-TLR7 в NAc, так как получены разнонаправленные ответы в отношении уровня экспрессии Hmgb1 и miR-let7b в данной структуре мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительная алкоголизация изменяет уровень исследуемых нами молекул микро-РНК (miR-let7b, miR-96, miR-182, miR-155), а также уровень мРНК TLR4, TLR7 и Hmgb1 в NAc головного мозга крыс. Основываясь на литературных данных, можно предположить, что полученные изменения в содержаниях микро-РНК могут иметь функциональную взаимосвязь с системой TLR в NAc при хроническом воздействии алкоголя, однако необходимы дальнейшие исследования с целью подтверждения этих предположений. Представляется интересным в дальнейшем изучить содержание данных микро-РНК при воздействии фармакологическими агентами, оказывающими влияние на функционирование TLR-сигнальных путей, такими как, например, налоксон, рифампицин и азитромицин.

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 заседания локального Этического комитета Института экспериментальной медицины от 26.02.2015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

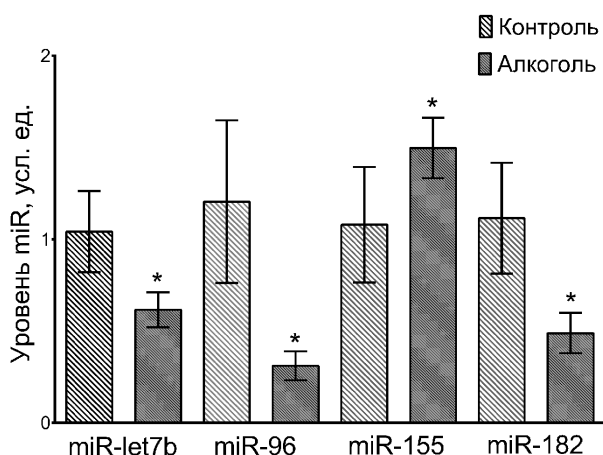


Рисунок 1. Уровень miR в NAc (* – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю).

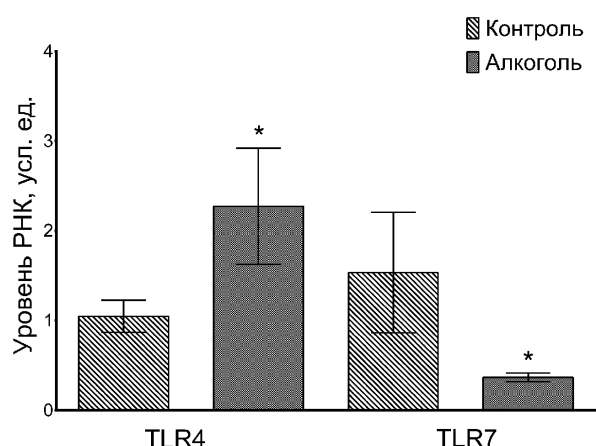


Рисунок 2. Уровень мРНК TLR в NAc (* – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю).

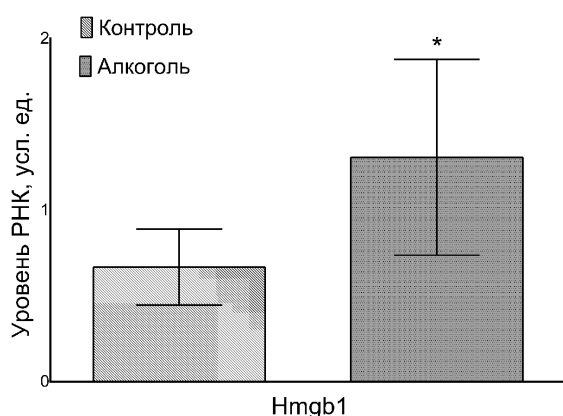


Рисунок 3. Уровень мРНК Hmgb1 в NAc (* – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю).

ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. (1985) Нейрохимия и фармакология алкоголизма, Медицина, М. 240 с. [Burov Y.V., Vedernikova N.N. (1985) Neurochemistry and Pharmacology of Alcoholism, Medicine, M. 240 p.]
2. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. (1998) Биология алкоголизма, Лань, СПб, 272 с. [Shabanov P.D., Kalishevich S.Yu. (1998) Biology of Alcoholism, Lan', St. Petersburg, 272 p.]
3. Nestler E.J. (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? Nat. Neurosci., **8**(11), 1445-1449. DOI: 10.1038/nn1578
4. Koob G.F. (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: Synthesis from animal models. Handb. Clin. Neurol., **125**, 33-54. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00003-3
5. Edith V.S., Anjali D., Eve R., Margaret J.R., Adolf P. (2005) Striatal and forebrain nuclei volumes: Contribution to motor function and working memory deficits in alcoholism. Biol Psychiatry, **57**(7), 768-776. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.12.012
6. Dahchour A., Ward R.J. (2022) Changes in brain dopamine extracellular concentration after ethanol administration; rat microdialysis studies. Alcohol Alcohol., **57**(2), 165-175. DOI: 10.1093/alcalc/agab072
7. Oord E.J.C.G., Xie L.Y., Zhao M., Aberg K.A., Clark S.L. (2023) A single-nucleus transcriptomics study of alcohol use disorder in the nucleus accumbens. Addict. Biol., **28**(1), e13250. DOI: 10.1111/adb.13250
8. Sobstyl M., Kupryjaniuk A., Mierzejewski P. (2021) Nucleus accumbens as a stereotactic target for the treatment of addictions in humans: A literature review. Neurol. Neurochir. Pol., **55**(5), 440-449. DOI: 10.5603/PJNNS.a2021.0065
9. Шевелева М.В., Лебедев А.А., Роик Р.О., Шабанов П.Д. (2013) Нейробиологические механизмы систем награды и наказания в головном мозге при активации прилежащего ядра. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, **11**(3), 3-19. [Sheveleva M.V., Lebedev A.A., Roik R.O., Shabanov P.D. (2013) Neurobiological mechanisms of reward and punishment systems in the brain upon activation of the nucleus accumbens. Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy, **11**(3), 3-19.]
10. Lim Y., Beane-Ebel J.E., Tanaka Y., Ning B., Husted C.R., Henderson D.C., Xiang Y., Park I.-H., Farrer L.A., Zhang H. (2021) Exploration of alcohol use disorder-associated brain miRNA-mRNA regulatory networks. Transl. Psychiatry, **11**(1), 504. DOI: 10.1038/s41398-021-01635-w
11. Перегуд Д.И., Корольков А.И., Баронец В.Ю., Лобачева А.С., Аркус М.Л., Игумнов С.А., Пирожков С.В., Теребилина Н.Н. (2022) Уровень BDNF, miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя. Биомедицинская химия, **68**(3), 218-227. [Peregud D.I., Korolkov A.I., Baronets V.Yu., Lobacheva A.S., Arkus M.L., Igumnov S.A., Pirozhkov S.V., Terebilina N.N. (2022) Serum levels of BDNF, miR-30a-5p and miR-122 in the dynamics of alcohol withdrawal syndrome. Biomeditsinskaya Khimiya, **68**(3), 218-227.] DOI: 10.18097/PBMC20226803218
12. Bayraktar R., Bertilaccio M.T.S., Calin G.A. (2019) The interaction between two worlds: microRNAs and toll-like receptors. Front. Immunol., **10**, 1053. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01053
13. Lehmann S.M., Krüger C., Park B., Derkow K., Rosenberger K., Baumgart J., Trimbuch T., Eom G., Hinz M., Kaul D., Habbel P., Kalin R., Franzoni E., Rybak A., Nguyen D., Veh R., Ninnemann O., Peters O., Nitsch R., Heppner F.L., Golenbock D., Schott E., Ploegh H.L., Wulczyn F.G., Lehnardt S. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. Nat. Neurosci., **15**(6), 827-835. DOI: 10.1038/nn.3113
14. Lippai D., Bala S., Csak T., Kurt-Jones E.A., Szabo G. (2013) Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. PLoS One, **8**(8), e70945. DOI: 10.1371/journal.pone.0070945
15. 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), 22. DOI: 10.1186/s12974-017-0799-4
16. Ureña-Peralta J.R., Alfonso-Loeches S., Cuesta-Diaz C.M., García-García F., Guerri C. (2018) Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. Sci. Rep., **8**(1), 15913. DOI: 10.1038/s41598-018-34277-y
17. Ureña-Peralta J.R., Pérez-Moraga R., García-García F., Guerri C. (2020) Lack of TLR4 modifies the miRNAs profile and attenuates inflammatory signaling pathways. PLoS One, **15**(8), e0237066. DOI: 10.1371/journal.pone.0237066
18. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. (2020) Роль toll-подобных рецепторов в нейроиммунологии алкоголизма. Биомедицинская химия, **66**(3), 208-215. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. (2020) The role of toll-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism. Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(3), 208-215.] DOI: 10.18097/PBMC20206603208
19. Shi R., Sun Y.H., Zhang X.H., Chiang V.L. (2012) Poly(T) adaptor RT-PCR. Methods Mol. Biol., **822**, 53-66. DOI: 10.1007/978-1-61779-427-8_4

Поступила в редакцию: 03. 05. 2023.
После доработки: 04. 07. 2023.
Принята к печати: 24. 07. 2023.

**PROLONGED ALCOHOL CONSUMPTION INFLUENCES microRNA EXPRESSION
IN THE NUCLEUS ACCUMBENS OF THE RAT BRAIN**

M.I. Airapetov^{1,2,*}, S.O. Eresko^{1,2}, S.A. Shamaeva¹, N.M. Matveev¹, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, 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

The microRNA (miR) species analyzed in this study are involved in molecular mechanisms of TLR4 and TLR7 signaling, mediating the development of neuroinflammation and neurodegeneration. We have investigated the expression levels of miR-let7b, miR-96, miR-182, miR-155, and the mRNA content of HMGB1, TLR3, TLR4 in the *nucleus accumbens* (NAc) of the brain of rats exposed to long-term alcoholization. The long-term alcoholization caused a decrease in miR-let7b, miR-96, miR-182, and TLR7 mRNA levels; this was accompanied by an increase in miR-155, TLR4, and Hmgb1 mRNA levels in the NAc of rat brain. TLR7 is functionally linked to miR-let7b. The data of a simultaneous decrease in miR-let7b and TLR7 mRNA are of interest for further studies; they may indicate on the lack of functionally significant links between Hmgb1 and the miR-let7b-TLR7 system in NAc. The existing evidence of a functional relationship between TLR4 with miR-155 and miR-182 and our observations on their expression changes during chronic alcoholization are very interesting and require further investigation. The suggestion about the development of neuroinflammatory process in NAc under prolonged alcohol exposure are relevant for studying the level of TLR gene expression in NAc, as well as the expression of miR species, which may have a functional relationship with the TLR system.

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

Key words: *nucleus accumbens*; alcohol; neuroinflammation; TLR; miR

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: 03.05.2023; revised: 04.07.2023; accepted: 24.07.2023.