

©Коллектив авторов

ИНТЕРЛЕЙКИН-1 β И TNF- α ПОВЫШЕНЫ В МИНДАЛИНЕ ПРЕНАТАЛЬНО АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

В.С. Кохан^{1*}, П.К. Анохин¹, Т.В. Проскурякова¹, В.А. Шоханова¹, Р.А. Агельдинов², И.Ю. Шамакина¹

¹Национальный научный центр наркологии — филиал Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, 119002, Москва, Малый Могильцевский пер., 3; *эл. почта: viktor_kohan@hotmail.com

²Научный центр биомедицинских технологий, 143442, пос. Светлые горы, Московская область

Аффективная патология (тревога, депрессия) у взрослого потомства матерей, употреблявших алкоголь во время беременности, может быть связана с изменением баланса нейроиммунных факторов в миндалине мозга (*corpus amygdaloideum*) и, как следствие, нарушением её функций в процессинге эмоционально значимых стимулов. Целью исследования было изучение содержания цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10 и IL-17 в миндалине мозга взрослых пренатально алкоголизированных и контрольных самок крыс. Для количественной оценки содержания целевых цитокинов был использован мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ. Уровень экспрессии мРНК анализировали методом ПЦР в режиме реального времени после обратной транскрипции. Увеличение содержания провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β в миндалине взрослых пренатально алкоголизированных животных не было связано с изменением уровня экспрессии мРНК. Наши данные свидетельствуют о том, что воздействие этанола на плод во время беременности может приводить к долгосрочным изменениям содержания ключевых провоспалительных цитокинов в миндалине, которые, в свою очередь, выступают фактором риска аффективных патологий в позднем возрасте.

Ключевые слова: пренатальная алкоголизация; аффективные нарушения; миндалина; цитокины; TNF- α ; IL-1 β

DOI: 10.18097/PBMC20236905300

ВВЕДЕНИЕ

Морфологические, физиологические, аффективные, поведенческие и когнитивные нарушения у потомства вследствие употребления беременной женщиной алкоголя объединяют термином “нарушения фетального алкогольного спектра” (fetal alcohol spectrum disorder, FASD). Тяжесть этих нарушений зависит от продолжительности и частоты употребления алкоголя и особенностей материнского организма, в частности, активности метаболизирующих этанол ферментов. Фетальный алкогольный синдром (fetal alcohol syndrome, FAS) — наиболее тяжёлая форма FASD — диагностируется уже в раннем постнатальном периоде и проявляется в специфической патологии лицевого отдела, замедленном росте, дисфункции центральной и периферической нервной системы [1, 2]. Однако FAS встречается относительно редко; чаще встречаются патологические состояния, не связанные с краниоцефальной дисморфией и отставанием в росте, но проявляющиеся в формировании дезадаптивного поведения и когнитивной дисфункции на более поздних этапах постнатального развития [3]. Эти нарушения получили название “нарушение нейроразвития, связанное с пренатальным действием алкоголя” (neurodevelopmental disorder associated with prenatal alcohol exposure, ND-PAE) [4]. Обычно ND-PAE не проявляются в раннем возрасте, а симптомы могут обнаружиться лишь в процессе обучения в начальной школе, при этом, основными проблемами становятся сложности адаптации, низкая стрессоустойчивость, импульсивность,

трудности социального взаимодействия [5]. При использовании экспериментальных моделей пренатальной алкоголизации на грызунах были получены результаты, достаточно хорошо отражающие клиническую картину FASD у человека [6]. Среди выявленных изменений у животных в подростковом и взрослом возрасте наиболее часто встречаются аффективные нарушения — повышенная тревожность и депрессивно-подобное поведение [7].

Учитывая роль нейроиммунных механизмов в формировании ЦНС в критические периоды развития [8], исследователи выдвинули гипотезу об участии микроглиальных клеток и экспрессируемых ими факторов нейровоспаления в механизмах нарушений функций ЦНС, обусловленных пренатальным воздействием алкоголя [9, 10]. Влияние алкоголя на функции микроглии и развитие ЦНС в пренатальном и раннем постнатальном периоде достаточно подробно изучено [10]. Было высказано предположение, что эффекты пренатальной алкоголизации на микроглиальные клетки не являются краткосрочными и могут лежать в основе нарушений функций ЦНС во взрослом возрасте [11]. Важно отметить, что большая часть экспериментальных исследований была сфокусирована на анализе изменений функций микроглии в гиппокампе, префронтальной коре и мозжечке у крыс и мышей в различных моделях FASD [12, 13]. Вместе с тем, учитывая ключевую роль миндалины мозга в процессинге эмоционально значимых стимулов и выработке адекватной стратегии поведения [14, 15] и вовлечение факторов нейровоспаления в этой структуре мозга в формирование аффективной патологии [16, 17],

можно предположить, что влияние пренатальной алкоголизации на аффективное состояние во взрослом возрасте может быть опосредовано изменением баланса цитокинов/хемокинов в миндалине.

В настоящей работе мы оценивали содержание цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10 и IL-17 в миндалине ювенальных пренатально алкоголизованных и контрольных самок крыс. Выбор данных цитокинов был связан с их установленной физиологической ролью в механизмах синаптической передачи и нейропластичности во взрослом мозге [18–21].

МЕТОДИКА

Животные

В работе использованы аутбредные крысы Wistar, полученные из питомника лабораторных животных “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий. Животных содержали при 22±2°C, влажности 50-70% в условиях естественной освещённости. Животные всех групп имели доступ к питьевой воде и пище (гранулированный корм по ГОСТ Р 5258-92) *ad libitum*.

Модель пренатальной алкоголизации

Для получения потомства двух самок крыс возрастом 3 месяца на трое суток помещали в клетку с самцом возрастом 3 месяца (общее число используемых крыс — 5 самцов и 10 самок). Первым днём беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке самок. Самок, спаривавшихся с одним самцом, делили на две группы случайным образом. Использовали модель полупринудительной алкоголизации, описанную нами ранее [22]: самки экспериментальной группы на протяжении всей беременности пили 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости. Контрольные самки потребляли только воду. После рождения потомства на период вскармливания все самки были помещены в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. Таким образом, потомство было алкоголизировано в пренатальном периоде, аналогичном первым двум триместрам беременности женщин. На 30 день жизни крысят отсаживали от матери, разделяли по полу и помещали по 6 детёнышей в клетку, где они имели свободный доступ к воде и корму.

Для проведения эксперимента из разных выводков случайным образом было отобрано по 7 пренатально алкоголизованных (группа “ПА”) и 7 контрольных самок.

Крысы были подвергнуты эвтаназии путём декапитации в возрасте 60 дней. Этот возраст соответствует среднему возрасту первого контакта с алкоголем, при переносе на человека. Миндалину выделяли согласно атласу мозга крыс Paxinos and Watson [23]. Область диссекции соответствовала следующим координатам: *AP* -1,8÷-3,3 мм, *intraural* 7,20÷5,70 мм, *lateral*

to midline 4÷5 мм, *DV* 8÷9 мм. Полученную ткань немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до момента анализа.

Выделение белка и мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ

Пробы гомогенизировали с помощью стеклянных шариков, используя гомогенизатор MagNA Lyser 230B (“Roche”, Швейцария) и буферный раствор следующего состава: 20 mM трис-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,05% Твин-20 и 1% (по объёму) коктейль ингибиторов протеаз II (ab201116, “Abcam”, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 12000 g и температуре 3°C в течение 15 мин и отбирали супернатант для дальнейшего анализа. Содержание белка определяли методом Бредфорда с использованием коммерчески-доступного набора Quick Start Bradford Protein Assay (“Bio-Rad”, США). Для анализа, если это было необходимо, пробы разводили до целевой концентрации белка в диапазоне 200–900 мкг/мл.

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ с использованием микросфер (xMAP технология) проводили с помощью коммерчески доступных наборов для определения цитокинов в тканях мозга крысы (“Cloud-Clone Corp.”, Китай) согласно инструкции производителя. Анализ выполняли на Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader с системой промывки Bio-Plex Pro Wash Station (“Bio-Rad”). Концентрацию цитокинов в исследуемых образцах определяли автоматически с помощью стандартных калибровочных разведений, используя компьютерные программы Bio-Plex Manager Software v.6.1 (для управления оборудованием и первичной обработки результатов) и Bio-Plex Data Pro Software v.1.2 (для финальной обработки результатов) (“Bio-Rad”). Содержание целевых белков нормировали на общий белок в образце.

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR)

Выделение тотальной РНК проводили стандартным гуанидин-изотиоционатным методом с использованием фенол-хлороформной экстракции (PureZOL RNA Isolation Reagent, “Bio-Rad”). Полученную РНК обрабатывали ДНКазой (“ThermoScientific”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК осуществляли с использованием набора Mint revertase (“Евроген”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Выделенную кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в реальном времени; последовательности использованных праймеров (“ДНК-синтез”, Россия) приведены в таблице. Амплификацию осуществляли в 25 мкл смеси с использованием коммерчески доступного набора qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”) на амплификаторе CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (“Bio-Rad”). В качестве референсного использовали ген β -актина. Для валидации специфичности амплификации анализировали кривые плавления. Количественную оценку экспрессии мРНК проводили методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [24].

ПРЕНАТАЛЬНАЯ АЛКОГОЛИЗАЦИЯ И РОСТ СОДЕРЖАНИЯ IL-1 β И TNF- α

Таблица. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для RT-qPCR

Ген	Последовательность, 5'→3'	
	Прямой	Обратный
<i>TNF-α</i>	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>IL-1β</i>	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCATGGTGAAGTCAAC
β -актин	CACTGCCGATCCTCTTCT	AACCGCTCATTGCCGATAGTG

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Statistica v.12. Проверку нормальности распределения данных в выборке осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как все полученные выборки подчинялись Гауссову закону распределения ($p > 0,05$; значения не приведены), дальнейший анализ данных проводили с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок, данные представляли как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пренатальная алкоголизация привела к повышению содержания в миндалях TNF- α и IL-1 β соответственно на 119,3% ($p = 0,03$) и 125,2% ($p = 0,01$) по сравнению с контролем (рис. 1). Содержание IL-1 α , IL-10 и IL-17 в экспериментальной и контрольной группах значимо не отличалось.

Уровень экспрессии мРНК *TNF- α* и *IL-1 β* в миндалях крыс группы "ПА" и контрольных животных значимо не отличался (рис. 2).

Следует отметить, что мы исследовали уровень цитокинов в миндалях мозга крыс в отсутствие действия экспериментальных факторов с провоспалительным эффектом после рождения крыс. В этих условиях уровень провоспалительных цитокинов в мозге достаточно низок [25]. В нашем эксперименте показано, что содержание анализируемых цитокинов в миндалях варьируют в диапазоне от 1,46 пг/мг до 86 пг/мг белка; несколько большие значения содержания некоторых цитокинов могут быть связаны с более эффективной их экстракцией из тканей, так как буфер для выделения содержал поверхностно-активное вещество Твин-20. Вместе с тем, содержание TNF- α соответствует литературным данным [25].

Полагаясь на тот факт, что уровень белка может регулироваться эпигенетически, мы исследовали уровень экспрессии цитокинов, для которых было показано значимое изменение концентрации в миндалях. Ввиду отсутствия значимых отличий, мы считаем возможным несколько сценариев, которые объясняли бы полученный результат. Такое расхождение может объясняться особенностью временной точки анализа, когда уровень транскрипции нормализовался прежде, чем содержание белка. Подобные расхождения часто встречаются в исследованиях [26]. Учитывая важную роль

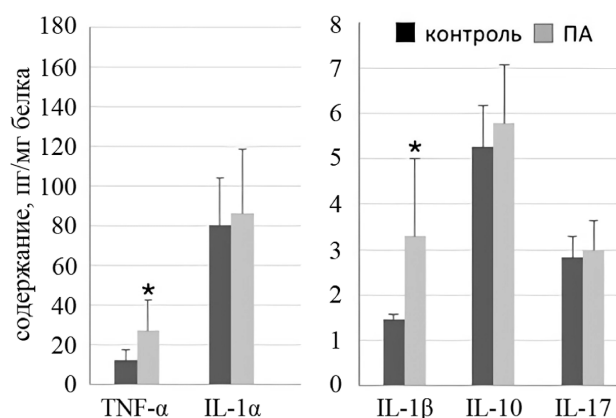


Рисунок 1. Концентрация цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10 и IL-17 в миндалях взрослых пренатально алкоголизированных (ПА, n=7) и контрольных (n=7) самок крыс. * – $p < 0,05$ (t -критерий Стьюдента для независимых выборок).

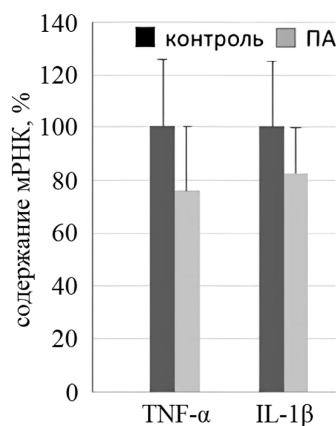


Рисунок 2. Уровень мРНК цитокинов TNF- α и IL-1 β в миндалях взрослых пренатально алкоголизированных (ПА) и контрольных самок крыс.

посттранскрипционной регуляции экспрессии цитокинов в мозге [27], другим вариантом, объясняющим расхождение, может быть регуляция на посттранскрипционном уровне. Показано, что в механизмах регуляции трансляции цитокинов важную роль играют регуляторные участки (AREs), богатые в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК аденином/урацилом [27]. AREs связываются с рядом белков, которые либо способствуют разрушению мРНК в ответ на различные внутри- и внеклеточные сигналы, либо регулируют трансляцию. Этот механизм

регуляции трансляции лучше всего изучен для TNF- α [27]. 3'-UTR мРНК TNF- α содержит консервативный ARE размером 34 нуклеотида. Показано, что белки AGO2 и FXR1 связываются с мРНК TNF- α и активируют трансляцию. В свою очередь, у человека связывание этих белков с ARE регулируется микроРНК miR369-3, что подтверждает роль микроРНК в регуляции трансляции [28]. Таким образом, можно предположить, что обнаруженный нами эффект пренатальной алкоголизации на уровень TNF- α в миндалине может быть связан с изменениями на посттранскрипционном уровне, включающим взаимодействие ARE, РНК-связывающих белков и микроРНК. Кроме того, *de novo* синтез TNF- α может быть инициирован активацией АТР ионотропного P2X7 рецептора, митоген-активируемых киназ (p38MAPK), регулируемых экстраклеточными сигналами киназ (ERK), c-Jun-N-терминальной киназы (JNK) [29]. Механизмы влияния пренатальной алкоголизации на посттранскрипционную регуляцию экспрессии цитокинов требуют дальнейших исследований.

Принято считать, что цитокины TNF- α , IL-1 α , IL-1 β и IL-17 относятся к провоспалительным, а IL-10 — к противовоспалительным; однако, как показывают результаты исследований, это деление является условным [30]. Так, при различных условиях TNF- α может быть как про-, так и противовоспалительным цитокином. TNF- α имеет трансмембранную (tmTNF) и растворимую форму (sTNF). TNF- α -превращающий фермент (TACE) расщепляет tmTNF с образованием sTNF, которая обладает провоспалительным действием. В настоящее время описаны два рецептора TNF- α : TNFR1 и TNFR2. Трансмембранная форма взаимодействует и с TNFR1, и с TNFR2, а растворимая может связываться лишь с рецептором 1-го типа. Активация TNFR1 имеет отношение к патологическим процессам и способствует гибели клеток, активация TNFR2 приводит к восстановлению тканей и выживанию клеток [31]. Таким образом, TNF- α оказывает непосредственное влияние на функционирование и выживание нейронов в мозге, регулирует выработку и секрецию нейромедиаторов, влияет на проницаемость гематоэнцефалического барьера [31, 32]. Показано, что уровень sTNF повышен в крови пациентов с тяжелой депрессией и биполярным расстройством [30]. Примечательно, что антидепрессанты, стабилизаторы настроения и антипсихотические препараты проявляют противовоспалительные свойства, в частности, литий и вальпроат уменьшают продукцию TNF- α *in vitro* [33]. В то же время, ряд исследований свидетельствует о непосредственной роли увеличения содержания TNF- α в миндалине в генезе тревожного состояния [34]. Введение в базолатеральную миндалину (BLA) TNF- α -нейтрализующих антител (infliximab) оказывало анксиолитический эффект у мышей в модели воспалительной боли. В экспериментах *in vitro* было показано, что TNF- α облегчает глутаматную AMPA-зависимую нейротрансмиссию и подавляет ГАМК_A-зависимую синаптическую передачу в BLA [34]. Другие цитокины — IL-1 (α и β) — регулируют ГАМК-эргическую передачу в миндалине [18].

Провоспалительные цитокины IL-1 α и IL-1 β связываются со своим рецептором IL-1R1, приводя к активации ряда внутриклеточных сигнальных путей (NF- κ B, JNK и p38MAPK) [35]. Исследователи показали, что нокаутные по гену белка-антагониста рецептора интерлейкина-1 (*IL1RN*) мыши отличаются низким предпочтением алкоголя [36]. Это позволяет предположить, что IL-1 играют важную роль в механизмах, опосредующих предпочтение алкоголя в условиях свободного выбора. Было установлено, что уровень IL-1 β повышен в крови больных алкоголизмом и хронически алкоголизированных животных [37–39]. Кроме того, введение IL-1 β в желудочки мозга хронически алкоголизированных крыс усиливает состояние тревоги на фоне отмены алкоголя [40]. Было показано, что IL-1 регулируют фоновый уровень активности ГАМК-нейронов в центральной миндалине и вносят значительный вклад в реализацию эффектов алкоголя в этой области мозга [41]. Таким образом, можно предположить, что увеличение уровня TNF- α и IL-1 β в миндалине мозга у пренатально алкоголизированных животных может быть одной из причин описанных в литературе нарушений аффективного состояния и предрасположенности к формированию зависимости от алкоголя.

Мы не обнаружили изменений содержания IL-10 в миндалине пренатально алкоголизированных животных. Этот цитокин считается противовоспалительным, оказывающим иммуносупрессивное действие и способствующим выживанию нейронов и глиальных клеток [42]. Также не было установлено изменения концентрации IL-17, который в настоящее время рассматривается в качестве одного из основных триггеров синаптической дисфункции и нарушения когнитивных процессов при ряде патологий ЦНС [43, 44]. При интервальной пренатальной алкоголизации крыс в мозге эмбрионов были обнаружены повышенный уровень экспрессии IL-10 и повышенное содержание IL-17; в постнатальном периоде эти изменения отсутствовали [45, 46]. Таким образом, вероятны несколько сценариев, объясняющих отсутствие значимых изменений IL-10 и IL-17. Во-первых, эмбриональные изменения могли не сохраниться в постнатальном периоде; во-вторых, модель пренатальной алкоголизации, использованная нами и предполагающая потребление алкоголя в течение всего периода беременности, по сравнению с интервальной схемой, могла иметь специфическое влияние на систему цитокинов мозга потомства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе данные позволяют предполагать, что увеличение уровня TNF- α и IL-1 β в миндалине мозга пренатально алкоголизированных самок крыс может быть одним из факторов риска возникновения аффективной патологии во взрослом возрасте. Понимание функциональной роли цитокинов в патогенезе FASD, в конечном счёте, позволит разработать терапевтические средства для лечения нейропатологий, связанных с пренатальным действием алкоголя.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с крысами были выполнены в соответствии с “Принципами надлежащей лабораторной практики” (утверждены приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н). Эксперименты с животными также соответствовали требованиям директивы 2010/63/EU от 22.09.2010 Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Экспериментальный протокол работ с животными одобрен этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского (протокол № 3 от 03.03.2022).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Voutilainen T., Rysä J., Keski-Nisula L., Kärkkäinen O. (2022) Self-reported alcohol consumption of pregnant women and their partners correlates both before and during pregnancy: A cohort study with 21,472 singleton pregnancies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**(5), 797-808. DOI: 10.1111/acer.14806
2. Popova S., Lange S., Probst C., Gmel G., Rehm J. (2017) Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.*, **5**(3), e290-e299. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30021-9
3. Sanders J.L., Netelenbos N., Dei S.O. (2020) Construct and factorial validity of neurobehavioral disorder associated with prenatal alcohol exposure (ND-PAE). *BMC Psychol.*, **8**, 53. DOI: 10.1186/s40359-020-00405-5
4. Brown J.M., Bland R., Jonsson E., Greenshaw A.J. (2019) The standardization of diagnostic criteria for fetal alcohol spectrum disorder (FASD): Implications for research, clinical practice and population health. *Can. J. Psychiatry*, **64**(3), 169-176. DOI: 10.1177/0706743718777398
5. Hagan J.F. Jr., Balachova T., Bertrand J., Chasnoff I., Dang E., Fernandez-Baca D., Kable J., Kosofsky B., Senturias Y.N., Singh N., Sloane M., Weitzman C., Zubler J. (2016) Neurobehavioral disorder associated with prenatal alcohol exposure. *Pediatrics*, **138**(4), e20151553. DOI: 10.1542/peds.2015-1553
6. Razumkina E., Anokhin P., Proskuryakova T.V., Shamakina I. (2019) Experimental approaches to the study of behavioral impairments associated with prenatal exposure to alcohol. *Neurosci. Behav. Physiol.*, **49**, 894-902. DOI: 10.1007/s11055-019-00816-x
7. Wang A.L., Micov V.B., Kwarteng F., Wang R., Hausknecht K.A., Oubraim S., Haj-Dahmane S., Shen R.Y. (2023) Prenatal ethanol exposure leads to persistent anxiety-like behavior during adulthood indicated by reduced horizontal and vertical exploratory behaviors. *Front. Neurosci.*, **17**, 1163575. DOI: 10.3389/fnins.2023.1163575
8. Cowan M., Petri W.A. Jr. (2018) Microglia: Immune regulators of neurodevelopment. *Front. Immunol.*, **9**, 2576. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02576
9. Wilhelm C.J., Guizzetti M. (2015) Fetal alcohol spectrum disorders: An overview from the glia perspective. *Front. Integr. Neurosci.*, **9**, 65. DOI: 10.3389/fnint.2015.00065
10. Wong E.L., Stowell R.D., Majewska A.K. (2017) What the spectrum of microglial functions can teach us about fetal alcohol spectrum disorder. *Front. Synaptic. Neurosci.*, **9**, 11. DOI: 10.3389/fnsyn.2017.00011
11. Kane C.J., Drew P.D. (2016) Inflammatory responses to alcohol in the CNS: Nuclear receptors as potential therapeutics for alcohol-induced neuropathologies. *J. Leukoc. Biol.*, **100**, 951-959. DOI: 10.1189/jlb.3mr0416-171r
12. Drew P.D., Johnson J.W., Douglas J.C., Phelan K.D., Kane C.J. (2015) Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **39**, 445-454. DOI: 10.1111/acer.12639
13. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2021) Пренатальное воздействие алкоголя изменяет TLR4-опосредованную сигнализацию в префронтальной коре головного мозга у крыс. *Биомедицинская химия*, **67**(6), 500-506. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2021) Prenatal exposure to alcohol alters TLR4 signaling in the prefrontal cortex in rats. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(6), 500-506.] DOI: 10.18097/PBMC20216706500
14. O'Neill P.K., Gore F., Salzman C.D. (2018) Basolateral amygdala circuitry in positive and negative valence. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **49**, 175-183. DOI: 10.1016/j.conb.2018.02.012
15. Sah P. (2017) Fear, anxiety, and the amygdala. *Neuron*, **96**, 1-2. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.09.013
16. Hu P., Lu Y., Pan B.X., Zhang W.H. (2022) New insights into the pivotal role of the amygdala in inflammation-related depression and anxiety disorder. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(19), 11076. DOI: 10.3390/ijms231911076
17. Zhang W.H., Zhang J.Y., Holmes A., Pan B.X. (2021) Amygdala circuit substrates for stress adaptation and adversity. *Biol. Psychiatry*, **89**, 847-856. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.12.026
18. Bajo M., Varodayan F.P., Madamba S.G., Robert A.J., Casal L.M., Oleata C.S., Siggins G.R., Roberto M. (2015) IL-1 interacts with ethanol effects on GABAergic transmission in the mouse central amygdala. *Front. Pharmacol.*, **6**, 49. DOI: 10.3389/fphar.2015.00049
19. Hiles S.A., Baker A.L., de Malmanche T., Attia J. (2012) A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: Exploring the causes of heterogeneity. *Brain Behav. Immun.*, **26**, 1180-1188. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.06.001
20. Brigas H.C., Ribeiro M., Coelho J.E., Gomes R., Gomez-Murcia V., Carvalho K., Faivre E., Costa-Pereira S., Darrigues J., de Almeida A.A., Buée L., Dunot J., Marie H., Pousinha P.A., Blum D., Silva-Santos B., Lopes L.V., Ribot J.C. (2021) IL-17 triggers the onset of cognitive and synaptic deficits in early stages of Alzheimer's disease. *Cell Rep.*, **36**(9), 109574. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109574
21. Simon D.W., Raphael I., Johnson K.M., Dixon C.E., Vagni V., Janesko-Feldman K., Kochanek P.M., Bayir H., Clark R.S.B., McGeachy M.J. (2022) Endogenous interleukin-17a contributes to normal spatial memory retention but does not affect early behavioral or neuropathological outcomes after experimental traumatic brain injury. *Neurotrauma Rep.*, **3**(1), 340-351. DOI: 10.1089/neur.2022.0017

22. Kokhan V.S., Chaprov K., Ninkina N.N., Anokhin P.K., Pakhlova E.P., Sarycheva N.Y., Shamakina I.Y. (2022) Sex-related differences in voluntary alcohol intake and mRNA coding for synucleins in the brain of adult rats prenatally exposed to alcohol. *Biomedicines*, **10**(9), 2163. DOI: 10.3390/biomedicines10092163
23. Paxinos G., Watson C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. New York, NY: Academic Press, 237 p.
24. Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, **3**(6), 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73
25. Zahr N.M., Luong R., Sullivan E.V., Pfefferbaum A. (2010) Measurement of serum, liver, and brain cytokine induction, thiamine levels, and hepatopathology in rats exposed to a 4-day alcohol binge protocol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **34**(11), 1858-1870. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01274.x
26. Kokhan V.S., Mariasina S., Pikalov V.A., Abaimov D.A., Somasundaram S.G., Kirkland C.E., Aliev G. (2023) Neurokinin-1 receptor antagonist reverses functional CNS alteration caused by combined γ -rays and carbon nuclei irradiation. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **21**(3), 278-289. DOI: 10.2174/1871527320666210122092330
27. Palanisamy V., Jakymiw A., van Tubergen E.A., d'Silva N.J., Kirkwood K.L. (2012) Control of cytokine mRNA expression by RNA-binding proteins and microRNAs. *J. Dent. Res.*, **91**(7), 651-658. DOI: 10.1177/0022034512437372
28. Scalavino V., Piccinno E., Valentini A.M., Mastronardi M., Armentano R., Giannelli G., Serino G. (2022) A novel mechanism of immunoproteasome regulation via miR-369-3p in intestinal inflammatory response. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(22), 13771. DOI: 10.3390/ijms232213771
29. Raffaele S., Lombardi M., Verderio C., Fumagalli M. (2020) TNF production and release from microglia via extracellular vesicles: Impact on brain functions. *Cells*, **9**(10), 2145. DOI: 10.3390/cells9102145
30. Probert L. (2015) TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, **302**, 2-22. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038
31. Uzzan S., Azab A.N. (2021) Anti-TNF- α compounds as a treatment for depression. *Molecules*, **26**(8), 2368. DOI: 10.3390/molecules26082368
32. Alvarez Cooper I., Beecher K., Chehrehasa F., Belmer A., Bartlett S.E. (2020) Tumour necrosis factor in neuroplasticity, neurogenesis and alcohol use disorder. *Brain Plasticity*, **6**(1), 47-66. DOI: 10.3233/BPL-190095
33. Leu S.J., Yang Y.Y., Liu H.C., Cheng C.Y., Wu Y.C., Huang M.C., Lee Y.L., Chen C.C., Shen W.W., Liu K.J. (2017) Valproic acid and lithium mediate anti-inflammatory effects by differentially modulating dendritic cell differentiation and function. *J. Cell. Physiol.*, **232**, 1176-1186. DOI: 10.1002/jcp.25604
34. Chen J., Song Y., Yang J., Zhang Y., Zhao P., Zhu X.J., Su H.C. (2013) The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. *Neurosci. Lett.*, **541**, 275-280. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.02.005
35. Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. (2013) The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity*, **39**(6), 1003-1018. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.010
36. 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. *Addict. Biol.*, **17**(1), 108-120. DOI: 10.1111/j.1369-1600.2010.00284.x
37. Vallés S.L., Blanco A.M., Pascual M., Guerri C. (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol.*, **14**(4), 365-371. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00079.x
38. Qin L., He J., Hanes R.N., Pluzarev O., Hong J.S., Crews F.T. (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J. Neuroinflammation*, **5**, 10. DOI: 10.1186/1742-2094-5-10
39. Lippai D., Bala S., Petrasek J., Csak T., Levin I., Kurt-Jones E.A., Szabo G. (2013) Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J. Leukoc. Biol.*, **94**(1), 171-182. DOI: 10.1189/jlb.1212659
40. Breese G.R., Knapp D.J., Overstreet D.H., Navarro M., Wills T.A., Angel R.A. (2008) Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, **33**(4), 867-876. DOI: 10.1038/sj.npp.1301468
41. Bajo M., Patel R.R., Hedges D.M., Varodayan F.P., Vlkolinsky R., Davis T.D., Burkart M.D., Blednov Y.A., Roberto M. (2019) Role of MyD88 in IL-1 β and ethanol modulation of GABAergic transmission in the central amygdala. *Brain Sci.*, **9**(12), 361. DOI: 10.3390/brainsci9120361
42. Burmeister A.R., Marriott I. (2018) The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 458. DOI: 10.3389/fncel.2018.00458
43. Chen J., Liu X., Zhong Y. (2020) Interleukin-17a: The key cytokine in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.*, **12**, 566922. DOI: 10.3389/fnagi.2020.566922
44. Frank K., Abeynaike S., Nikzad R., Patel R.R., Roberts A.J., Roberto M., Paust S. (2020) Alcohol dependence promotes systemic IFN- γ and IL-17 responses in mice. *PLoS One*, **15**(12), e0239246. DOI: 10.1371/journal.pone.0239246
45. Terasaki L.S., Schwarz J.M. (2016) Effects of moderate prenatal alcohol exposure during early gestation in rats on inflammation across the maternal-fetal-immune interface and later-life immune function in the offspring. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **11**(4), 680-692. DOI: 10.1007/s11481-016-9691-8.
46. Pascual M., Montesinos J., Montagud-Romero S., Forteza J., Rodriguez-Arias M., Minarro J., Guerri C. (2017) TLR4 response mediates ethanol-induced neurodevelopment alterations in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *J. Neuroinflammation*, **14**(1), 145. DOI: 10.1186/s12974-017-0918-2

Поступила в редакцию: 24. 07. 2023.
После доработки: 08. 08. 2023.
Принята к печати: 28. 08. 2023.

INTERLEUKIN-1 β AND TNF- α ARE ELEVATED IN THE AMYGDALA
OF ADULT RATS PRENATALLY EXPOSED TO ETHANOL

V.S. Kokhan^{1*}, P.K. Anokhin¹, T.V. Proskuryakova¹, V.A. Shokhonova¹, R.A. Ageldinov², I.Yu. Shamakina¹

¹National Scientific Center for Narcology —

Branch of the V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology,
3 Malyj Mogil'cevskij lane, Moscow, 119002 Russia; *e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

²Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia,
settl. Svetlye gory, Moscow Region, 143442 Russia

Affective disorders, including anxiety and depression, developed in adult offspring of the mothers who consumed alcohol during pregnancy could be associated with an imbalance in neuroimmune factors in the amygdala (*corpus amygdaloideum*) resulted in impaired emotional stimulus processing. The aim of this study was to compare the content of cytokines TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-10, and IL-17 in the amygdala of adult female rats exposed to alcohol *in utero* and control rats. Cytokine levels were evaluated using a multiplex immunoassay system; mRNA expression was investigated using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay. Prenatal alcohol exposure led to the increase in the content of TNF- α and IL-1 β without significant changes in the mRNA expression level. Our data suggest that ethanol exposure to the fetus during pregnancy can result in long-term alterations in the content of the key neuroinflammatory factors in the amygdala, which in turn can be a risk factor for affective disorders in the adulthood.

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

Key words: prenatal alcohol exposure; affective disorders; amygdala; cytokines; TNF- α ; IL-1 β

Funding. The work was carried out within the framework of the State Assignment.

Received: 24.07.2023; revised: 08.08.2023; accepted: 28.08.2023.