

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЗИТРОМИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИСТЕМЫ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОТМЕНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА И ПОИСК ВОЗМОЖНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ МЕТОДОМ *IN SILICO*

М.И. Айрапетов^{1,2*}, С.О. Ереско¹, А.А. Шукина¹, Н.М. Матвеев¹,
М.А. Андреев¹, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, П.Д. Шабанов^{1,2}

¹Институт экспериментальной медицины,
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12; *эл. почта: interleukin1b@gmail.com

²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6Ж

Прилежащее ядро (НАс) головного мозга — ключевое звено в системе внутреннего подкрепления, которое опосредует проявление различных компонентов зависимости, в том числе от этанола. Нейровоспалительная теория развития алкоголизма предполагает, что изменения в молекулярных механизмах врожденной иммунной системы могут быть вовлечены в развитии патологии. Цель нашего исследования заключалась в изучении влияния азитромицина (АЗМ) на состояние экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в НАс головного мозга крыс при экспериментальной алкоголизации. Также в задачи исследования входил поиск методом *in silico* возможных молекулярных мишеней для АЗМ, которые могли бы быть связаны с системой toll-подобных рецепторов. АЗМ корректировал изменения, наблюдаемые в экспрессии генов системы системы toll-подобных рецепторов в условиях отмены длительной алкоголизации в НАс головного мозга. Выполненный анализ *in silico* выявил ряд белков, с которыми была обнаружена высокая вероятность взаимодействия АЗМ, что позволило сделать ряд предположений о возможных путях реализации наблюдаемого фармакологического эффекта АЗМ в эксперименте.

Ключевые слова: прилежащее ядро; этанол; нейровоспаление; toll-подобные рецепторы; азитромицин; *in silico*

DOI: 10.18097/PBMCR1523

ВВЕДЕНИЕ

Прилежащее ядро (лат. *nucleus accumbens*, НАс) рассматривается как одна из ключевых структур головного мозга, участвующая в механизмах формирования аддиктивного поведения [1–5]. Ведутся исследования с целью изучения биохимических и молекулярных изменений, которые могут быть задействованы в реализации таких механизмов [1–5]. Наибольшее число работ было сосредоточено на изучении нейробиохимических особенностей медиаторных систем в этом регионе мозга, особенно на дофаминергической нейротрансмиссии [1–5]. В одной из недавних работ сообщается, что при экспериментальном воздействии этанола были выявлены изменения в уровне дофамина: введение низких доз этанола внутрибрюшинно, внутривенно, перорально или непосредственно в НАс вызывало увеличение содержания дофамина в данной структуре мозга; хроническое введение этанола крысам вызывало незначительные изменения в содержании дофамина, а в условиях отмены хронического воздействия этанола было отмечено снижение содержания дофамина [6].

Последние несколько лет нами проводятся исследования нейровоспалительной теории алкоголизма [7, 8]. Признавая важность изучения и поиска изменений в других направлениях,

мы предполагаем, что одной из немаловажных составляющих патогенеза алкоголизма является повышение активности нейроглияльных взаимодействий в ответ на длительное поступление этанола в организм, что ведёт к развитию нейровоспаления и, как следствие, может быть причиной развития нейродегенерации — гибели ряда клеток в наиболее уязвимых структурах головного мозга [7, 8]. Данные нейровизуализации хорошо подтверждают тот факт, что патоморфологические изменения развиваются в головном мозге при хроническом поступлении этанола в организм, однако это затрагивает не все структуры мозга в равной степени [9]. Такие изменения наблюдаются в НАс [9], однако их точные патофизиологические механизмы ещё не определены. Изменения в функционировании системы toll-подобных рецепторов (англ. *Toll-like receptor*, TLR) рассматриваются как одно из возможных событий в реализации этого патологического состояния [7, 8, 10].

Цель данной работы заключалась в моделировании длительного воздействия алкоголя с последующей его отменой для изучения состояния экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, а также в оценке влияния азитромицина (АЗМ) на состояние этих генов. АЗМ зарекомендовал себя как эффективный нейропротектор в экспериментах при моделировании различных патологических состояний нервной системы, ассоциированных



с развитием нейровоспаления [11]. Точная молекулярная мишень не определена, однако механизм действия реализуется, по всей видимости, путём подавления повышенной активности микроглии, что снижает проявление нейровоспаления и замедляет процесс нейродегенерации [11]. Ранее на модели длительного воздействия этанола нейропротекторные свойства АЗМ исследованы не были.

МЕТОДИКА

Животные

В эксперименте использовали 40 взрослых самцов-крыс породы Wistar (средняя масса тела 250–300 г, возраст 3 месяца, приобретены в питомнике “Рапполово”, Россия). Перед началом эксперимента животные были разделены на группы по 8 животных в каждой группе (контрольная группа, группа длительного воздействия этанола, три группы животных с отменой длительного воздействия этанола). Животные получали свободный доступ к стандартному корму для крыс.

Моделирование длительного воздействия этанола

Длительное воздействие этанола моделировали путём внутрижелудочного введения 20% раствора этанола с помощью желудочного зонда из расчёта 4 г/кг чистого этанола с понедельника по пятницу в течение 4 недель (всего 20 введений). Контрольные животные получали эквивалентные объёмы воды по такой же схеме. При этом все животные имели свободный доступ к воде.

Инъекции фармакологических средств

По окончании длительного воздействия этанола животным три дня внутрижелудочно через зонд вводили АЗМ (40 мг/кг, 160 мг/кг; “Хеомоцин”, порошок для приготовления суспензии для приёма внутрь, “Немофарм”, Сербия). Крысам контрольной группы вводили эквивалентный объём воды.

Забор биоматериала

По окончании эксперимента крыс декапитировали в последний день длительного воздействия этанола и на 7 сутки отмены этанола и производили забор необходимых структур головного мозга. Границы NAc

были определены в соответствии с атласом мозга крысы [12]. Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C.

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК выполняли, используя реагент ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 (“Implen”, Германия), чистоту выделенного продукта оценивали по отношению A260/A280 (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. 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 (табл. 1) (“Beagle”, Россия). Относительный уровень содержания мРНК, рассчитанный методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, нормировали к уровню экспрессии гена *Gapdh*.

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 значении $p \leq 0,05$. Мы не ставили задачу в выявлении дозозависимого эффекта от действия препарата, поэтому двухфакторный дисперсионный анализ не использовали.

Анализ *in silico*

С целью поиска потенциальных молекулярных мишеней для АЗМ был выполнен анализ *in silico* с помощью программного обеспечения “Way2drug” [13]. Программное обеспечение позволило определить вероятность взаимодействия АЗМ с той или иной потенциальной молекулярной мишенью в организме.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCTTG
<i>Nfkb1</i>	ATACTGCTTTGACTCACTCC	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Irf3</i>	AATTCCTCCCTGGCTC	CATGGGATCCTGAACCTTGT
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии генов системы TLR4 при длительном воздействии этанола и его отмене

Нами был выполнен анализ экспрессии генов системы TLR4-сигнального пути, таких как *Hmgb1*, *Tlr4*, *Il1 β* , *Ccl2*, *Irf3*. Относительный уровень мРНК для всех этих генов был повышен в НАс в группе животных с длительным поступлением этанола по сравнению с группой интактных животных. Уровень мРНК HMGB1 повышен в 4,0 раза, TLR4 — в 2,2 раза, IL1 β — в 4,1 раза, CCL2 — в 3,9 раз, IRF3 — в 12,0 раз. В группе животных с отменой длительного воздействия этанола на 7 сутки относительные уровни мРНК HMGB1, TLR4 и CCL2 не были значимо изменены, а уровни мРНК IRF3 и IL1 β были повышены по отношению к контролю (в 12,2 раза и 3,2 раза соответственно). Введение АЗМ позволило скорректировать наблюдаемые нами изменения мРНК в условиях отмены этанола. Использование АЗМ вызвало снижение уровней мРНК IRF3 и IL1 β . Несмотря на то, что экспрессия генов *Hmgb1*, *Tlr4*, *Ccl2* не была изменена в период отмены этанола, введение АЗМ снижало экспрессию этих генов, снизив уровень до значений ниже, чем в группе интактных животных.

Полученные нами данные позволяют предполагать развитие элементов нейровоспаления в НАс головного мозга в результате длительного поступления этанола в организм. В группе животных с длительным воздействием этанола (см. рис. 1–2 “этанол”) мы выявили повышенную экспрессию генов ключевых провоспалительных цитокинов *Il1 β* и *Ccl2*. Одним из механизмов, который вызывает такое

состояние, может быть повышение активности TLR4-зависимого сигнального пути, отвечающего за регуляцию экспрессии генов провоспалительных цитокинов [8, 10]. Активация этих механизмов при длительном поступлении этанола в кору головного мозга хорошо показана в работах Crews и соавт. [14–16]. Однако состояние экспрессии этих генов в подкорковых структурах головного мозга было изучено недостаточно. В своей работе мы сосредоточились на одной из ключевых структур, ответственных за проявление аддиктивного поведения, и получили сведения о том, что экспрессия генов системы TLR4-сигнального пути подвержена изменениям в этой структуре мозга. Возможно, что эти изменения могут также вносить свой вклад в патогенез алкогольной зависимости. В настоящем исследовании мы оценили состояние экспрессии генов системы TLR4 в условиях отмены длительного воздействия этанола на 7 сутки. Мы не наблюдали значимых изменений в экспрессии генов *Tlr4* и *Hmgb1*, однако была отмечена повышенная экспрессия гена *Il1 β* . Заметим, что в более ранней нашей работе мы уже сообщали о состоянии экспрессии данных генов в НАс при отмене длительного воздействия этанола на 7 сутки [10], однако в том исследовании при отмене этанола повышенный уровень мРНК был выявлен для генов *Tlr4* и *Hmgb1*. Одним из объяснений этих различий может быть то, что в прошлом эксперименте нами был применён иной протокол воздействия этанола: мы вводили 20% раствор этанола крысам из расчёта 2 г/кг в течение 2 месяцев, тогда как в данной работе мы использовали те же дозировки в течение менее продолжительного времени. Анализ литературы показывает, что использование разных протоколов воздействия этанола нередко приводит

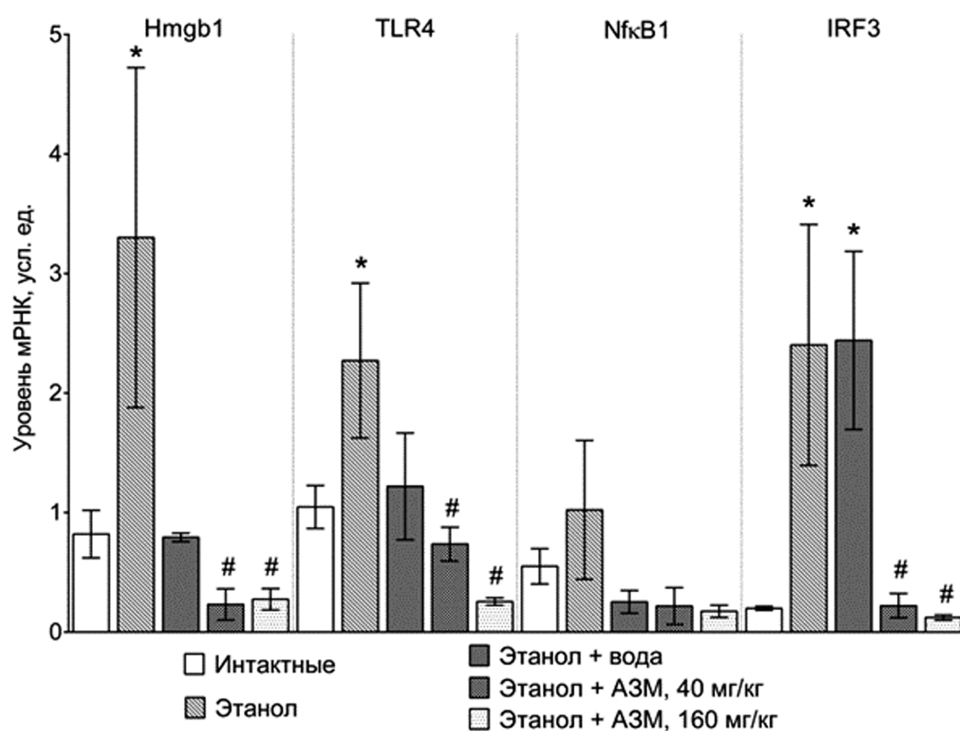


Рисунок 1. Уровень экспрессии генов системы TLR4 в НАс мозга крыс. * $p \leq 0,05$ по отношению к группе интактных животных, # $p \leq 0,05$ по отношению к группе “этанол + вода”.

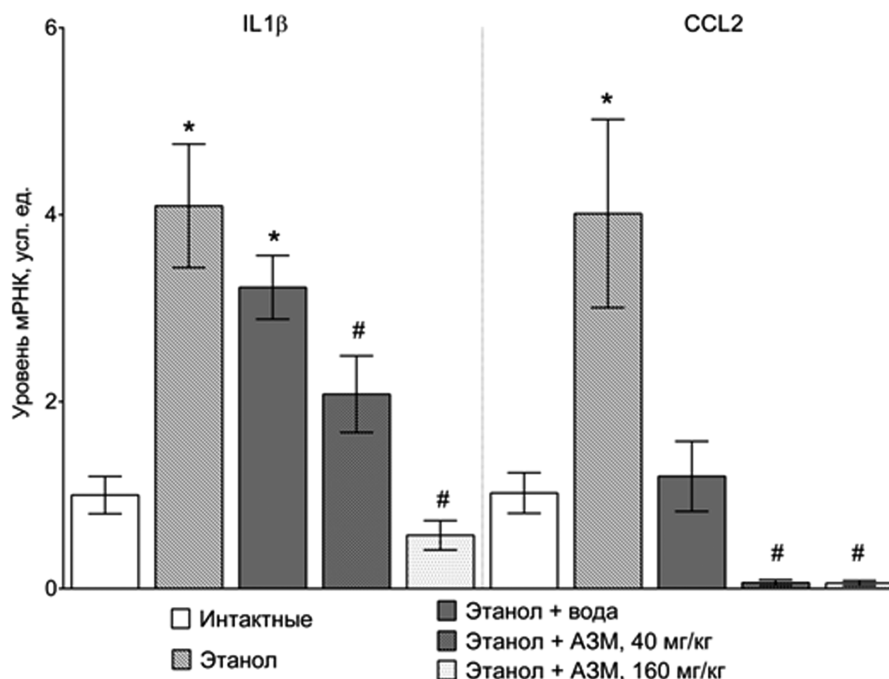


Рисунок 2. Уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов в НАс мозга крыс. * $p \leq 0,05$ по отношению к группе интактных животных, # $p \leq 0,05$ по отношению к группе “этанол + вода”.

к разнонаправленным результатам, что также накладывает ряд сложностей при сопоставлении своих результатов с данными, полученными группами исследователей с использованием разных протоколов длительного воздействия этанола.

Влияние АЗМ на экспрессию генов системы TLR4

Согласно полученным данным, АЗМ снижал уровень мРНК генов нейровоспаления в НАс мозга у крыс.

Ранее способность АЗМ снижать уровень нейровоспаления была показана в нескольких работах при различных патологических состояниях. При моделировании травмы спинного мозга у мышей в месте повреждения повышается уровень провоспалительных макрофагов (M1-макрофаги), что служит одной из причин, усугубляющих ход регенерации. Применение АЗМ (160 мг/кг, 3 дня подряд) вызывало снижение уровня M1-макрофагов и ускоряло процесс восстановления ткани [17]. В другой работе было показано снижение уровня M1-макрофагов при моделировании травмы спинного мозга и применении АЗМ в дозах 10 мг/кг, 40 мг/кг или 160 мг/кг на протяжении 7 дней; при этом самые низкие (10 мг/кг) и самые высокие (160 мг/кг) дозы увеличивали экспрессию генов маркеров противовоспалительных макрофагов (M2-макрофаги) [18]. Введение АЗМ мышам после травмы спинного мозга (через 30 мин, 3 ч и 24 ч, а затем ежедневно в течение 7 дней) показало, что препарат был эффективен через 30 мин и через 3 ч после травмы, но не через 24 ч [19]. При этом независимо от времени первоначального лечения, АЗМ не уменьшал развитие нейропатической боли и не увеличивал выживаемость нейронов [19]. Однократное внутрибрюшинное введение АЗМ

(150 мг/кг) мышам, подвергшимся транзиторной окклюзии средней мозговой артерии, вызвало снижение уровня отёка головного мозга в ишемизированном полушарии [20]. Однократное введение АЗМ (150 мг/кг) предотвращало гибель ганглиозных клеток сетчатки. Этот эффект сопровождался снижением активности кальпайна, MMP-2/-9 и уровня фосфорилирования ERK1/2 [21]. В другом исследовании введение однократной дозы АЗМ (150 мг/кг) после моделирования ишемии приводило к снижению ишемического повреждения головного мозга и увеличению фосфорилирования STAT3 в астроцитах и нейронах периишемической моторной коры и центральной области стриатума [22]. Однако молекулярные мишени нейропротекторных эффектов АЗМ остаются не установленными.

В одном из недавних исследований при добавлении липополисахарида (2 мкг/мл) к культуре клеток альвеолярных макрофагов крыс NR8383 было показано повышение экспрессии белка TLR4, однако при совместном культивировании клеток с липополисахаридом (2 мкг/мл) и АЗМ (8 мкг/мл) уровень экспрессии белка TLR4 не имел значимых отличий от группы контроля. Кроме того, АЗМ в этом исследовании ослаблял гиперэкспрессию NF-κB (P65), EZH2 и H3K27me3 и нормализовал сниженный уровень противовоспалительного цитокина IL-10. Также АЗМ ингибировал липополисахарид-индуцированную ядерную транслокацию NF-κB (P65) [23].

Учитывая имеющиеся сведения о вкладе повышенной экспрессии TLR4 и об активации микроглии в провоспалительном направлении в тканях головного мозга при длительном поступлении этанола [8, 10], мы предположили, что использование АЗМ сможет внести изменения в эти механизмы. Полученные нами результаты

подтвердили это предположение. Положительный эффект от использования АЗМ был получен нами в отношении экспрессии генов ключевых провоспалительных цитокинов *Il1β* и *Ccl2*, экспрессия которых повышается в активированной микроглии. Кроме того, нами получены данные о снижении экспрессии гена *Tlr4* после применения АЗМ, а также гена *Hmgb1*, продуктом экспрессии которого является белок — эндогенный агонист TLR4. Повышение содержания мРНК и белка TLR4 рассматривается как один из возможных прогностических маркеров развития нейровоспаления в нервной ткани после длительного поступления этанола [7, 8]. АЗМ не оказывал влияние на экспрессию гена *Nfκb1* (P50), но снижал экспрессию гена транскрипционного фактора интерферонов 3 (*Irf3*). При этом есть данные, что микроглия с гиперэкспрессией IRF3 повышает регуляцию ключевых противовоспалительных цитокинов (антагонист рецепторов IL-1, IL-10 и IFNβ) и подавляет провоспалительные цитокины (IL-1α, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-8 и CXCL1) [24]. Так, по всей видимости, вслед за активацией генов нейровоспаления запускается путь, направленный на механизмы сдерживания избыточной экспрессии провоспалительных цитокинов. Возможно, наблюдаемый нами в эксперименте повышенный уровень экспрессии гена *Irf3* в группе животных с длительным воздействием алкоголя и при отмене алкоголя на 7 сутки может служить признаком сдерживания высокой экспрессии провоспалительных цитокинов. Это требует дополнительных исследований.

Анализ *in silico*

По результатам выполненного анализа *in silico* из всех найденных потенциальных биомолекул, с которыми АЗМ имеет высокую вероятность взаимодействия (>0,8), нами были отобраны молекулярные мишени, которые имеют отношение к тем генам, которые мы исследовали в нашем эксперименте (табл. 2). Выполненный анализ *in silico* отчасти объясняет наблюдаемые нами фармакологические эффекты использованного препарата.

Дополнительно нами был осуществлён анализ литературы с имеющимися экспериментальными данными относительно выявленных методом *in silico* молекулярных мишеней с целью объяснения полученных эффектов от АЗМ в отношении исследованных генов. Из представленных потенциальных молекулярных мишеней наблюдаемые нами эффекты в эксперименте могут быть объяснены влиянием АЗМ, в первую очередь на NTF3 (нейротрофиновый рецептор 3 или TrkC, англ. NT-3 growth factor receptor), IRAK3 (англ. Interleukin-1 receptor-associated kinase 3) и PAK2 (серин-треониновая киназа PAK2, англ. Serine/threonine-protein kinase PAK2).

Повышение содержания MCP-1 (CCL2) и фракталина объясняется активацией рецептора TrkC нейротрофическим фактором PDNF [25]. Внутривенное введение PDNF повышает содержание

MCP-1 и фракталина в сыворотке крови у мышей с нокаутом *Myd88*, т.е. с дефицитом передачи сигналов от TLR, что подчёркивает независимое от *Myd88* действие PDNF [25].

Существуют доказательства, что IRAK3-опосредованный путь подавляет провоспалительную передачу сигналов. В недавнем исследовании сообщается, что IRAK3 экспрессируется в макрофагах, а также в ацинарных клетках поджелудочной железы, где он сдерживает активацию NF-κB [26]. Делеция гена *Irak3* в эксперименте усиливала миграцию моноцитов в поджелудочную железу мышей и вызывала провоспалительный иммунный ответ 1 типа, характеризующийся значительным повышением сывороточных уровней TNFα, IL-6 и IL-12p70 [26].

Относительно киназы PAK2 имеются данные, что использование мышей с кардиоспецифичной делецией PAK2 (*Pak2^{cko}*) при моделировании высококалорийной диеты в миокарде были выявлены повышенные уровни мРНК провоспалительных цитокинов *Il1β*, *Crp*, *Mcp1*, *Ccl24* и *Hmgb1*, при этом уровни мРНК противовоспалительных цитокинов *Il10*, *Mmp9* и *Gdf15* были снижены [27]. В другом исследовании снижение PAK2 было связано с окислительным стрессом и активацией апоптоза в клетках нейробластомы N2a при гипоксии [28]. Учитывая полученные нами данные *in silico* относительно способности АЗМ связываться с PAK2, эта киназа может быть одной из мишеней, через которую АЗМ проявляет свой эффект.

Поскольку экспрессия белка TNK1 показана преимущественно в нейронах, это затрудняет предположение о возможном влиянии АЗМ через белок TNK1 на пути нейровоспаления. То же самое стоит отметить и про белок SAMK2A, который также в головном мозге экспрессируется преимущественно нейронами.

Относительно других мишеней на данный момент в литературе недостаточно сведений об их функциональном взаимодействии с теми генами, в отношении которых в нашей работе была проведена оценка эффекта от применения АЗМ. Можем только предполагать, зная, что MAP-киназные каскады реакций также задействованы в передаче сигналов от рецепторов врождённого иммунитета к генам врождённого иммунитета [29], в частности, к про- и противовоспалительным цитокинам и, что АЗМ, нацеливаясь на одну из таких своих возможных мишеней среди MAP-киназ (MAP3K1, MAP3K3, MAP2K4, MAP3K5), может также вносить изменения в эти механизмы регуляции.

Стоит отметить тот факт, что выполненное нами моделирование *in silico* не выявило возможной связи АЗМ с субъединицами комплекса Nf-κB, которое обсуждается в литературе [30–32]. Это может быть связано с тем, что используемое нами программное обеспечение имеет какие-то ограничения и не способно выявить большее число возможных молекулярных мишеней, либо сама гипотеза противовоспалительного эффекта у АЗМ через Nf-κB нуждается в более обстоятельной экспериментальной проверке.

ВЛИЯНИЕ АЗМ НА СИСТЕМУ TLR В НАС МОЗГА ПРИ ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА

Таблица 2. Результаты выполненного анализа *in silico* по взаимодействию АЗМ с молекулярными мишенями в организме и их локализация

Мишень взаимодействия ^а	Вероятность взаимодействия (p) ^а	Локализация мишени в прилежащем ядре головного мозга ^б
NUAK2, NUAK family SNF1-like kinase 2	0,87	Экспрессируется преимущественно в клетках микроглии
NTF3, NT-3 growth factor receptor (TrkC)	0,86	Высоко экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
MAP3K1, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	0,84	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
MAP3K3, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	0,84	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
TNK1, Non-receptor tyrosine-protein kinase TNK1	0,84	Экспрессируется в нейронах
PHKG1, Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1	0,83	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
CILK1, Serine/threonine-protein kinase ICK	0,83	Высоко экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
LATS2, Serine/threonine-protein kinase LATS2	0,82	Экспрессируется преимущественно в клетках глии
IRAK3, Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	0,81	Экспрессируется преимущественно в клетках микроглии
CAMK2A, CaM-kinase alpha	0,81	Экспрессируется преимущественно нейронами
RIOK1, Serine/threonine-protein kinase RIO1	0,81	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
MAP2K4, Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	0,81	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
SIK2, Serine/threonine-protein kinase SIK2	0,81	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
RIOK3, Serine/threonine-protein kinase RIO3	0,80	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
PRKAA1, AMP-activated protein kinase alpha-1 subunit	0,80	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
PAK2, Serine/threonine-protein kinase PAK2	0,80	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии
MAP3K5, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	0,80	Экспрессируется как нейронами, так и клетками глии

Примечание: а – источник: “Way2drug” [13]; б – источник: “The Human Protein Atlas” [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты позволили получить сведения о влиянии АЗМ (40 мг/кг, 160 мг/кг) на экспрессию генов системы TLR4-сигналикации (*Hmgbl*, *Tlr4*, *Irf3*, *Il1β*, *Ccl2*) в условиях отмены длительной алкоголизации на 7 сутки в НАс головного мозга у крыс. При этом эффективны были обе используемые нами дозировки препарата при интрагастральном введении животным на протяжении первых трёх дней отмены этанола. Выполненный нами анализ *in silico* позволил выявить ряд белков с высокой вероятностью взаимодействия с АЗМ. Учитывая, что некоторые из этих белков экспрессируются клетками нервной ткани на высоком уровне и имеют взаимосвязь с механизмами, регулирующими сигнальные каскады нейровоспаления, мы предполагаем, что данные молекулярные мишени связаны с наблюдаемыми эффектами от АЗМ в нашем эксперименте.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России “Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях с целью создания новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС” (FGWG-2025-0020).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа рассмотрена и одобрена Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ, заключение № 131-03-1 от 10 января 2025 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мецеров Ш.К. (2002) Дофамин и подкрепляющие системы мозга, Лань, СПб, 208 с. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Meshcherov Sh.K. (2002) In: Dopamine and Reinforcing Systems of the Brain. Lan', S-Pb, 208 p.]
2. Becker H.C., Mulholland P.J. (2014) Neurochemical mechanisms of alcohol withdrawal. *Handb. Clin. Neurol.*, **125**, 133–156. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00009-4
3. Xu Y., Lin Y., Yu M., Zhou K. (2024) The nucleus accumbens in reward and aversion processing: insights and implications. *Front. Behav. Neurosci.*, **18**, 1420028. DOI: 10.3389/fnbeh.2024.1420028
4. Yan H., Shlobin N.A., Jung Y., Zhang K.K., Warsi N., Kulkarni A.V., Ibrahim G.M. (2022) Nucleus accumbens: a systematic review of neural circuitry and clinical studies in healthy and pathological states. *J. Neurosurg.*, **138**(2), 337–346. DOI: 10.3171/2022.5.JNS212548
5. López-Gamero A.J., Rodríguez de Fonseca F., Suárez J. (2021) Energy sensors in drug addiction: a potential therapeutic target. *Addict. Biol.*, **26**(2), e12936. DOI: 10.1111/adb.12936
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/alcal/agab072
7. Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. (2021) The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism. *Biosci. Trends*, **15**(2), 74–82. DOI: 10.5582/bst.2021.01041
8. Crews F.T., Coleman L.G. Jr., Macht V.A., Vetreno R.P. (2024) Alcohol, HMGB1, and innate immune signaling in the brain. *Alcohol Res.*, **44**(1), 4. DOI: 10.35946/arc.v44.1.04
9. Sullivan E.V., Deshmukh A., de Rosa E., Rosenbloom M.J., Pfefferbaum A. (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
10. Airapetov M., Eresko S., Ignatova P., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. (2024) Effect of rifampicin on TLR4-signaling pathways in the nucleus accumbens of the rat brain during abstinence of long-term alcohol treatment. *Alcohol Alcohol.*, **59**(3), agae016. DOI: 10.1093/alcal/agae016
11. Kopper T.J., Gensel J.C. (2021) Continued development of azithromycin as a neuroprotective therapeutic for the treatment of spinal cord injury and other neurological conditions. *Neural. Regen. Res.*, **16**(3), 508–509. DOI: 10.4103/1673-5374.293146
12. Paxinos G., Watson C. (2017) In: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 160 p.
13. Way2Drug. Understanding Chemical-Biological Interactions. Predictive services. Retrieved October 14, 2024, from: <https://www.way2drug.com/dr/>
14. Crews F.T., Zou J., Qin L. (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav. Immun.*, **25**(1), 4–12. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.003
15. Crews F.T., Vetreno R.P. (2016) Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology*, **233**(9), 1543–1557. DOI: 10.1007/s00213-015-3906-1
16. Coleman L.G. Jr., Zou J., Qin L., Crews F.T. (2018) HMGB1/IL-1 β complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism. *Brain Behav. Immun.*, **72**, 61–77. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.10.027
17. Zhang B., Bailey W.M., Kopper T.J., Orr M.B., Feola D.J., Gensel J.C. (2015) Azithromycin drives alternative macrophage activation and improves recovery and tissue sparing in contusion spinal cord injury. *J. Neuroinflammation*, **12**, 218. DOI: 10.1186/s12974-015-0440-3
18. Gensel J.C., Kopper T.J., Zhang B., Orr M.B., Bailey W.M. (2017) Predictive screening of M1 and M2 macrophages reveals the immunomodulatory effectiveness of post spinal cord injury azithromycin treatment. *Sci. Rep.*, **7**, 40144. DOI: 10.1038/srep40144
19. Kopper T.J., McFarlane K.E., Bailey W.M., Orr M.B., Zhang B., Gensel J.C. (2019) Delayed azithromycin treatment improves recovery after mouse spinal cord injury. *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 490. DOI: 10.3389/fncel.2019.00490
20. Amantea D., Certo M., Petrelli F., Bagetta G. (2016) Neuroprotective properties of a macrolide antibiotic in a mouse model of middle cerebral artery occlusion: characterization of the immunomodulatory effects and validation of the efficacy of intravenous administration. *Assay Drug Dev. Technol.*, **14**(5), 298–307. DOI: 10.1089/adt.2016.728
21. Varano G.P., Parisi V., Adornetto A., Cavaliere F., Amantea D., Nucci C., Corasaniti M.T., Morrone L.A., Bagetta G., Russo R. (2017) Post-ischemic treatment with azithromycin protects ganglion cells against retinal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Molecular Vision*, **23**, 911–921.
22. Amantea D., Petrelli F., Greco R., Tassorelli C., Corasaniti M.T., Tonin P., Bagetta G. (2019) Azithromycin affords neuroprotection in rat undergone transient focal cerebral ischemia. *Front. Neurosci.*, **13**, 1256. DOI: 10.3389/fnins.2019.01256
23. Wu S., Tian X., Mao Q., Peng C. (2023) Azithromycin attenuates wheezing after pulmonary inflammation through inhibiting histone H3K27me3 hypermethylation mediated by EZH2. *Clin. Epigenetics*, **15**, 12. DOI: 10.1186/s13148-023-01430-y
24. Tarassishin L., Suh H.-S., Lee S.C. (2011) Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J. Neuroinflammation*, **8**, 187. DOI: 10.1186/1742-2094-8-187
25. Salvador R., Aridgides D., PereiraPerrin M. (2014) Parasite-derived neurotrophic factor/trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* links neurotrophic signaling to cardiac innate immune response. *Infect. Immun.*, **82**(9), 3687–3696. DOI: 10.1128/IAI.02098-14
26. Thiel F.G., Asgarbeik S., Glaubitz J. (2023) IRAK3-mediated suppression of pro-inflammatory MyD88/IRAK signaling affects disease severity in acute pancreatitis. *Sci. Rep.*, **13**, 10833. DOI: 10.1038/s41598-023-37930-3
27. Kaur N., Ruiz-Velasco A., Raja R., Howell G., Miller J.M., Abouleisa R.R.E., Ou Q., Mace K., Hille S.S., Frey N., Binder P., Smith C.P., Fachim H., Soran H., Swanton E., Mohamed T.M.A., Müller O.J., Wang X., Chernoff J., Cartwright E.J., Liu W. (2022) Paracrine signal emanating from stressed cardiomyocytes aggravates inflammatory microenvironment in diabetic cardiomyopathy. *iScience*, **25**(3), 103973. DOI: 10.1016/j.isci.2022.103973
28. Xing J., Xu H., Liu C., Wei Z., Wang Z., Zhao L., Ren L. (2019) Melatonin ameliorates endoplasmic reticulum stress in N2a neuroblastoma cell hypoxia-reoxygenation injury by activating the AMPK-Pak2 pathway. *Cell Stress Chaperones*, **24**(3), 621–633. DOI: 10.1007/s12192-019-00994-0

29. Лебедев К.А., Понякина И.Д. (2017) Иммунология образраспознающих рецепторов, Ленанд, Москва, 256 с. [Lebedev K.A., Ponyakina I.D. (2017) In: Immunology of Image-Recognizing Receptors. Lenand, Moscow, 256 p.]
30. Lin S.J., Kuo M.L., Hsiao H.S., Lee P.T. (2016) Azithromycin modulates immune response of human monocyte-derived dendritic cells and CD4⁺ T cells. *Int. Immunopharmacol.*, **40**, 318–326. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.09.012
31. Stellari F.F., Sala A., Donofrio G. (2014) Azithromycin inhibits nuclear factor- κ B activation during lung inflammation: an *in vivo* imaging study. *Pharmacol. Res. Perspect.*, **2**(5), e00058. DOI: 10.1002/prp2.58
32. Cigana C., Assael B.M., Melotti P. (2007) Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**(3), 975–981. DOI: 10.1128/AAC.01142-06
33. The Human Protein Atlas. Predictive services. Retrieved October 14, 2024, from: <https://www.proteinatlas.org/>

Поступила в редакцию: 09. 10. 2024.
После доработки: 23. 01. 2025.
Принята к печати: 05. 02. 2025.

THE STUDY OF THE AZITHROMYCIN EFFECT ON GENE EXPRESSION OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR SYSTEM IN THE BRAIN NUCLEUS ACCUMBENS OF RATS DURING ETHANOL WITHDRAWAL AND SEARCH FOR POSSIBLE MOLECULAR TARGETS BY AN *IN SILICO* METHOD

M.I. Airapetov^{1,2*}, S.O. Eresko¹, A.A. Shchukina¹, N.M. Matveev¹,
M.A. Andreev¹, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, P.D. Shabanov¹

¹Institute of Experimental Medicine,
12 Akademika Pavlova str., St. Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: interleukin1b@gmail.com
²S.M. Kirov Military Medical Academy, 6G Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russia

The brain's nucleus accumbens (NAc) is a key link in the internal reinforcement system, which mediates manifestations of various components of addiction, including ethanol. The neuroinflammatory theory of alcoholism development suggests that changes in the molecular mechanisms of the innate immune system may be involved in the development of this pathology. The aim of our study was to investigate the effect of azithromycin (AZM) on expression of toll-like receptor system genes in the NAc during experimental alcoholization of rats. The objectives of the study also included an *in silico* search for possible molecular targets for AZM that could be associated with the toll-like receptor system. AZM corrected the changes observed in the expression of toll-like receptor system genes under conditions of alcohol withdrawal after long-term ethanol exposure in the NAc of the brain. The *in silico* analysis revealed the most probable proteins which could be involved in the interaction with AZM. Based on results of these predictions a number of assumptions about possible ways of implementing the observed pharmacological effect of AZM in the experiment have been made.

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

Keywords: nucleus accumbens; ethanol; neuroinflammation; toll-like receptors; azithromycin; *in silico*

Funding. This work was carried out within the framework of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation “Search for Molecular Targets for Pharmacological Action in Addictive and Neuroendocrine Disorders in Order to Create New Pharmacologically Active Substances Acting on CNS Receptors” (FGWG-2025-0020).

Received: 09.10.2024; revised: 23.01.2025; accepted: 05.02.2025.