

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HMGB1* ИЗМЕНЯЕТСЯ В СТРИАТУМЕ И АМИГДАЛЕ МОЗГА КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И ОТМЕНЕ ЭТАНОЛА

М.И. Айрапетов^{1,2}, С.О. Ереско³, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, П.Д. Шабанов^{1,4}*

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

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, 6

Внутриклеточная сигнализация, опосредованная белком HMGB1, агонистом TLRs, рассматривается как возможная мишень для коррекции патологий нейроиммунной системы, однако уровень экспрессии гена *Hmgb1* в различных структурах мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола не был ранее изучен. Исследование показало, что длительное употребление этанола приводит к повышению уровня мРНК HMGB1 в стриатуме мозга крыс. Отмена этанола изменяет содержание мРНК HMGB1 в стриатуме и амигдале мозга крыс на 1 сутки и 14 суток. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в различных структурах головного мозга происходят разнонаправленные изменения в молекулярных механизмах нейроиммунного ответа при длительном употреблении этанола и его отмене.

Ключевые слова: мозг; алкоголизм; отмена алкоголя; Hmgb1; IL-1 β

DOI: 10.18097/PBMC20216701095

ВВЕДЕНИЕ

Длительное употребление алкоголя приводит к многочисленным патологическим изменениям, наблюдаемым в головном мозге [1-3]. Представляется интересным исследование нейроиммунных механизмов в головном мозге, возникающих при длительной алкоголизации и в условиях отмены этанола [3-8]. Внутриклеточная сигнализация, опосредованная белком HMGB1 (high mobility group box-1), рассматривается как возможная мишень для коррекции патологий нейроиммунной системы [5]. HMGB1 — ядерный негистоновый белок из группы высокомолекулярных белков, впервые идентифицированный в 1973 году [9]. В белке различают два тандемных ДНК-связывающих домена и С-концевой, содержащий 30 глутаминовых и аспарагиновых кислот; гиперацилирование по остаткам лизина способствует транслокации белка из ядра в цитоплазму, где он накапливается и упаковывается в секреторные везикулы, а затем высвобождается во внеклеточную среду [10]. После выделения во внеклеточное пространство он связывается со специфическими рецепторами, регулируя внутриклеточные каскады реакций. HMGB1 является эндогенным агонистом TLR2 (toll-like receptor 2, toll-подобный рецептор 2), TLR4, TLR5 [11-13] и, образуя комплексы с микро-РНК, может модулировать активность TLR3, TLR7, TLR9 [10, 14]. Повышение активности TLRs запускает внутриклеточные молекулярные каскады реакций, конечным результатом которых служит повышенный уровень экспрессии ряда провоспалительных генов и развитие нейровоспалительного процесса [3-4, 11]. Имеются данные, что уровень HMGB1 может служить

биомаркером при тех или иных расстройствах центральной нервной системы [10]. В условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя на разных сроках наблюдается повышенное содержание белка HMGB1 в различных структурах мозга [3], однако остаётся неясным вопрос относительно того, поступает данный белок из периферии или его экспрессия может изменяться непосредственно в структурах ЦНС при патологических условиях, вызванных, в том числе, длительным потреблением этанола или его отменой после длительной алкоголизации, что и послужило целью работы — оценить уровень экспрессии гена HMGB1 в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола в различных структурах головного мозга (стриатум, гиппокамп, амигдала) крыс, которые в первую очередь вовлечены в патогенетические механизмы развития алкоголизма.

МЕТОДИКА

В экспериментах с хронической алкоголизацией взрослых крыс-самцов (n=42) подвергали полунасилованной алкоголизации 20% раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 1 месяца при свободном доступе к брикетированному сухому корму. Контрольная группа животных (n=10) получала воду. Первую группу из 8 алкоголизованных крыс декапитировали через 1 месяц алкоголизации, остальных на 1 сутки, 7 суток и 14 суток абстиненции соответственно. Мозг выделяли на холоду. Образцы необходимых структур мозга (стриатум, амигдала, гиппокамп) замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

Выделение мРНК проводили из 20 мг пробы мозга с использованием TRIzol реагента (“Ambion”, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб ДНКазой проводили с использованием ДНКазы (“Promega”, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. После обработки ДНКазой концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P 330 (“Implen”, Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 25 мкл реакционной смеси с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (“Promega”). ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе Mx3005P (“Stratagene”, США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green Master Mix (“Евроген”, Россия), используя смесь специфических прямых и обратных праймеров (“Beagle”, Россия) (таблица). Анализ каждой пробы проводили в двух параллелях.

Полученные данные нормировали к уровню мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Для статистической обработки полученных количественных данных применяли программное обеспечение Graph Pad Prizm v.6. Для сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании уровень экспрессии гена *Hmgb1* в условиях длительной алкоголизации повышен в стриатуме мозга крыс, тогда как в амигдале и гиппокампе он остаётся без изменений. Отмена этанола приводит к изменениям содержания мРНК *Hmgb1* в стриатуме и амигдале мозга крыс, тогда как в гиппокампе не наблюдается подобных изменений (рис. 1). В стриатуме отмечается повышенное содержание мРНК на 1 сутки и 14 суток отмены этанола, при этом на 7 суток значение содержания мРНК было таким же в группе контроля. В амигдале уровень мРНК был повышен на 1 сутки отмены алкоголя, на 7 суток и 14 суток показатель не отличался от уровня контрольных значений.

При этом, отсутствует какая-либо корреляция между содержанием мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β и мРНК в исследуемых нами структурах головного мозга. В группе длительной алкоголизации уровень мРНК IL-1 β повышен в стриатуме мозга крыс, тогда как в амигдале и гиппокампе этого не наблюдается (рис. 2).

На 1 сутки отмены этанола в стриатуме уровень мРНК IL-1 β повышен, а в амигдале и гиппокампе изменений не обнаружено. В амигдале отчетно повышение уровня мРНК IL-1 β лишь на 14 суток отмены. В гиппокампе нет изменений в содержании мРНК в сравнении с группой контроля в период отмены этанола на исследуемых нами сроках.

В экспериментах на модели подростковой алкоголизации (англ. adolescent binge drinking) грызунов было показано, что этанол увеличивает содержание мРНК и белка HMGB1 в коре головного мозга крыс-подростков, которая сохраняется впоследствии у взрослых крыс [12]. По мнению авторов [12] подростковая алкоголизация приводит к постоянному усилению активности врождённой иммунной системы, которая сохраняется на повышенном уровне в мозге крыс, что коррелировало в исследовании и с нейрокогнитивными дисфункциями у взрослых крыс [12]. Позже была выдвинута гипотеза, согласно которой белок HMGB1 может быть вовлечён в повышенную активацию системы врождённой иммунной системы, ввиду того, что является эндогенным агонистом многих рецепторов врождённой иммунной системы.

Используя антагонист к белку HMGB1, Whitman. и соавт. [13] подтвердили гипотезу о том, что повышение количества белка HMGB1 приводит к повышению уровня мРНК провоспалительных цитокинов в префронтальной коре мозга у длительно алкоголизированных мышей, что не исключает иных результатов, которые могут быть получены в других структурах головного мозга.

В мозжечке длительно алкоголизированных мышей отмечено небольшое повышение содержания мРНК HMGB1 по отношению к группе контроля. Кроме того, в мозжечке наблюдался повышенный уровень мРНК рецепторов к HMGB1 (TLR2, TLR4, TLR9 и RAGE) и уровень мРНК провоспалительных цитокинов (про-IL-1 β , TNF- α , MCP-1) [8]. Воздействие этанола в подростковом возрасте крыс увеличивает экспрессию рецепторов TLR4 и белка HMGB1 в префронтальной коре мозга, которая сохраняется на повышенном уровне в мозге взрослых крыс [12]. В другой работе с длительной алкоголизацией крыс было показано, что уровень белка HMGB1 в лобной коре мозга крыс не изменился в группах длительной алкоголизации и 1-го дня отмены алкоголя, однако понизился в группе 28-го дня отмены этанола; кроме того, содержание ни одного из исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов не было изменено на 28 суток отмены алкоголя в лобной коре мозга крыс [15].

Таблица. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'→3')	Обратный (5'→3')
<i>Gapdh</i>	CGGAGACGAATGGAAATTAG	AAATCCGTTTCACACCGAC
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>IL-1β</i>	TGATGTTCCCATTAGACAGC	GAGAATACCACTTGTTGGCT

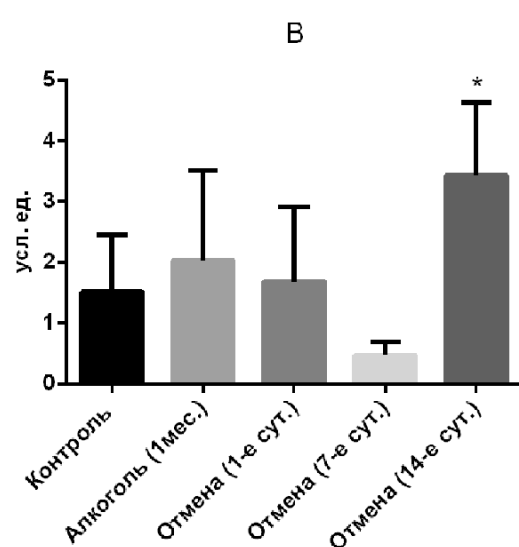
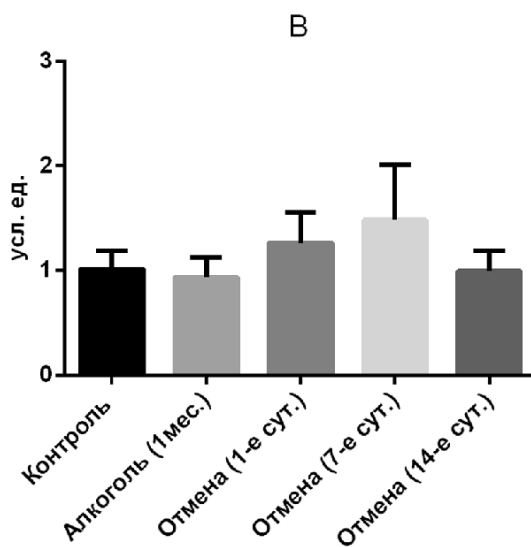
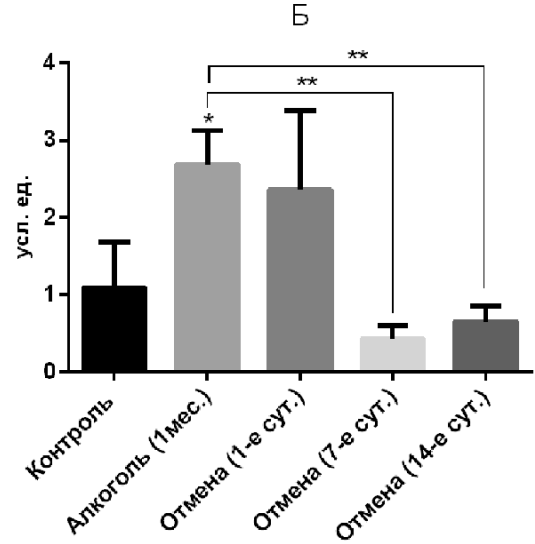
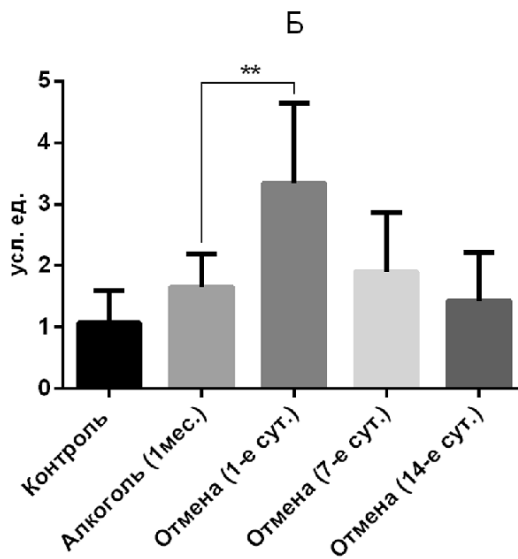
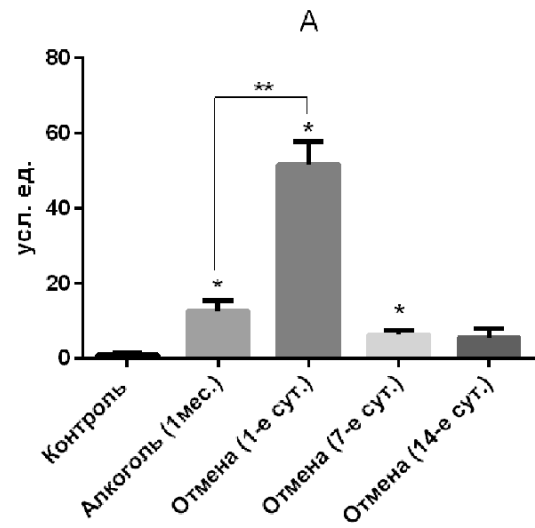
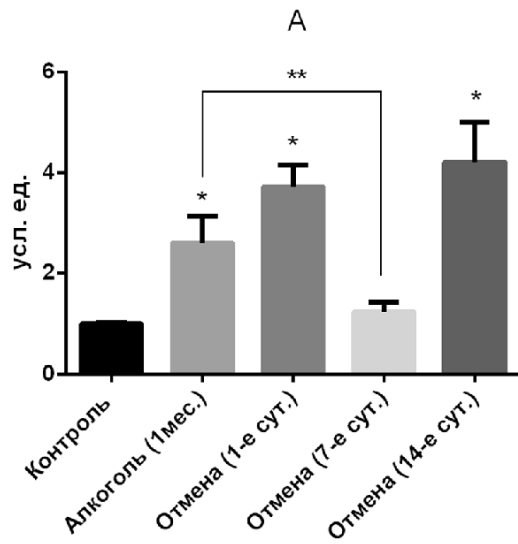


Рисунок 1. Уровень мРНК Hmgbl в стриатуме (А), амигдале (Б) и гиппокампе (В) мозга крыс (* — $p < 0,05$ по отношению к группе контроля, ** — $p < 0,05$ по отношению к группе длительной алкоголизации).

Рисунок 2. Уровень мРНК IL-1β в стриатуме (А), амигдале (Б) и гиппокампе (В) мозга крыс (* — $p < 0,05$ по отношению к группе контроля, ** — $p < 0,05$ по отношению к группе длительной алкоголизации).

Результаты нашего исследования также продемонстрировали, что в исследуемых нами структурах головного мозга происходят разнонаправленные изменения в экспрессии генов *Hmgb1* и *Il-1 β* в условиях длительной алкоголизации и в период отмены этанола на разных сроках. Отсутствие корреляции между экспрессией генов *Hmgb1* и *Il-1 β* может свидетельствовать о том, что увеличение экспрессии *Hmgb1* не запускает внутриклеточные механизмы, приводящие к повышению экспрессии гена *Il-1 β* в исследуемых структурах мозга. Это может быть связано с выбранной методикой алкоголизации либо выбранные для исследования точки не позволяют зарегистрировать такую корреляцию, которая прослеживается авторами других исследований в иных структурах мозга.

Повышенное содержание уровня мРНК *Hmgb1* в 2,5 раза в стриатуме длительно алкоголизированных крыс и при этом повышенное содержание мРНК *Il-1 β* более чем в 10 раз в этой же группе крыс может объясняться тем, что данная структура мозга является наиболее чувствительной к повышенному содержанию этанола или его метаболитов в организме, который был подвержен потреблению 20% раствора этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 1 месяца, однако конкретные причины выявленных изменений ещё предстоит исследовать.

ВЫВОДЫ

Длительное употребление этанола (1 месяц) приводит к повышению уровня мРНК *Hmgb1* в стриатуме мозга крыс. Отмена алкоголя изменяет содержание мРНК *Hmgb1* в стриатуме и амигдале мозга крыс на 1 сутки и 14 суток отмены алкоголя. Результаты нашего эксперимента не показали взаимосвязи между содержанием мРНК *Hmgb1* и содержанием мРНК провоспалительного цитокина *Il-1 β* , что делает наиболее актуальной проблему изучения нейроиммунных взаимодействий в головном мозге при длительной алкоголизации и отмене алкоголя в различных структурах головного мозга на разных сроках отмены. Исследование механизмов нейроиммунной сигнализации может открыть новые возможности для фармакотерапии алкоголизма.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт средств Института экспериментальной медицины (ИЭМ) в рамках государственного задания по теме “Фармакологический анализ действия нейротропных средств, изучение внутриклеточных мишеней и создание систем направленной доставки”, шифр 0557-2019-0004, а также за счёт средств Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Используемые методы в работе были одобрены Этическим комитетом по уходу и использованию животных ИЭМ — протокол №21/5 заседания локального этического комитета при ИЭМ от 26.02.2015.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. (1998) Биология алкоголизма, Лань, СПб. [Shabanov P.D., Kalishevich S.Yu. (1998) Biology of Alcoholism, Lan', SPb.]
2. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. (2008) Гормональные механизмы подкрепления, Элби-СПб, СПб. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Streltsov V.F. (2008) Hormonal mechanisms of reinforcement, Elby-SPb, SPb.]
3. Crews F.T., Walter T.J., Coleman L.G., Vetreno R.P. (2017) Psychopharmacology, **234**(9-10), 1483-1498.
4. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Лебедев М.И., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. (2020) Биомедицинская химия, **66**(3), 208-215. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Lebedev M.I., Bychkov E.R., Shabanov P.D. (2020) Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(3), 208-215.]
5. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Сексте Э.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. (2019) Наркология, **18**(3), 96-102. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Sekste E.A., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. (2019) Narcology, **18**(3), 96-102.]
6. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2020) Медицинская иммунология, **22**(1), 77-86. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2020) Medical Immunology, **22**(1), 77-86.]
7. Coleman L.G., Zou J., Qin L., Crews F.T. (2018) Brain, Behavior Immunity, **72**, 61-77.
8. Lippai D., Bala S., Petrusek J., Csak T., Levin I., Kurt-Jones E., Szabo G. (2013) J. Leukoc. Biol., **94**(1), 171-182.
9. Goodwin G.H., Sanders C., Johns E.W. (1973) Eur. J. Biochem., **38**(1), 14-19.
10. Ranzato E., Martinotti S., Patrone M. (2015) ImmunoTargets Therapy, **4**, 101-109.
11. Pascual M., Baliño P., Aragón C.M.G., Guerri C. (2015) Neuropharmacology, **89**, 352-359.
12. Vetreno R.P., Crews F.T. (2012) Neuroscience, **226**, 475-488.
13. Whitman B.A., Knapp D.J., Werner D.F., Crews F.T., Breese G.R. (2013) Alcoholism: Clin. Exper. Res., **37**(12), 2086-2097.
14. Yanai H., Ban T., Wang Z. et al. (2009) Nature, **462**(7269), 99-103.
15. Sanchez-Alavez M., Nguyen W., Mori S., Wills D.N., Otero D., Ehlers C.L., Conti B. (2019) Alcohol, **76**, 37-45.

Поступила в редакцию: 15. 06. 2020.
После доработки: 13. 12. 2020.
Принята к печати: 14. 12. 2020.

**HMGB1 GENE EXPRESSION CHANGES IN THE STRIATUM AND AMIGDAL
OF THE RAT'S BRAIN UNDER ALCOHOLIZATION AND ETHANOL WITHDRAWAL**

M.I. Airapetov^{1,2*}, S.O. Eresko³, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, P.D. Shabanov^{1,4}

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

²St. Petersburg State Medical Pediatric University, St. Petersburg, 199034 Russia

³St. Petersburg State University, St. Petersburg, 194044 Russia

⁴Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194100 Russia

Intracellular signaling mediated by the HMGB1 protein, an agonist of TLRs, is considered as a possible target for the correction of pathologies of the neuroimmune system, however, the expression level of the *Hmgb1* gene has not been previously studied in various brain structures of rats exposed to prolonged alcoholization followed by ethanol withdrawal. The study showed that long-term use of ethanol caused to an increase in the level of *Hmgb1* mRNA in the striatum of rat brain. Alcohol withdrawal changed the level of *Hmgb1* mRNA in the striatum and amygdala on the 1st and 14th day. The data obtained may indicate that in different structures of the brain there are multidirectional changes in the molecular mechanisms of the neuroimmune response with prolonged use of ethanol and its withdrawal.

Key words: brain; alcoholism; alcohol withdrawal; *Hmgb1*; IL-1 β

Funding. The study was financed from the budget of Institute of Experimental Medicine and Saint-Petersburg State Pediatric Medical University.

Received: 15.06.2020, revised: 13.12.2020, accepted: 14.12.2020.