

© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА СИСТЕМУ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПРИЛЕЖАЮЩЕМ ЯДРЕ МОЗГА ДЛИТЕЛЬНО АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС В ПЕРИОД ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

М.И. Айрапетов^{1,2*}, С.О. Ереско^{1,3}, Д.А. Скабелкин¹,
А.Р. Искалиева¹, А.А. Лебедев¹, Е.Р. Бычков¹, 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, ул. Литовская, 2

³Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

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

Прилежащее ядро (*nucleus accumbens*, NAc) — вентральная часть стриатума головного мозга, которая является важной частью мезолимбического пути, участвующего в системе внутреннего подкрепления, опосредующей формирование различных форм аддикции, в частности алкогольной аддикции. Данные нейровизуализации и исследования *in vitro* свидетельствуют о развитии выраженного нейродегенеративного процесса в NAc при длительном употреблении алкоголя, однако ключевые механизмы, опосредующие этот процесс, остаются неизвестными. В последние годы внимание исследователей сосредоточено на изучении системы Toll-подобных рецепторов (TLR), повышенная активность которых выявлена в коре и гиппокампе головного мозга при длительной алкоголизации, однако существует необходимость в исследовании этой системы в других структурах мозга. В данной работе показано, что длительная алкоголизация (2 месяца) умеренными ежедневными дозами этанола (2 г/кг) способствует выраженному повышению экспрессии гена *Tlr4* и его эндогенного лиганда *Hmgbl* в NAc у крыс в период отмены алкоголя. Инъекции рифампицина (Rif; 100 мг/кг) снижали повышенный уровень экспрессии *Hmgbl*, *Tlr4*, а также генов провоспалительных цитокинов (*IL1β*, *IL6*) в NAc у длительно алкоголизованных крыс в период отмены алкоголя. При этом отмечено увеличение пониженного уровня мРНК противовоспалительных цитокинов (*IL10*, *IL11*).

Ключевые слова: алкоголизация; этанол; мозг; нейровоспаление; *nucleus accumbens*; TLR4; рифампицин

DOI: 10.18097/PBMC20226804279

ВВЕДЕНИЕ

Важным событием в исследованиях последних лет стало открытие того, что нейроиммунная сигнализация в центральной нервной системе (ЦНС) оказывает влияние на сигнальные пути, связанные с системой вознаграждения или системой внутреннего подкрепления (англ. reward system) [1]. Прилежащее ядро (*nucleus accumbens*, NAc) — вентральная часть стриатума, являясь важной частью мезолимбического пути, служит ключевым звеном в системе внутреннего подкрепления [2-6]. NAc опосредует эффекты психостимулирующих средств, в частности, этанола [3-6]. Растущее число работ указывает на участие NAc в психических расстройствах, таких как, депрессия, шизофрения, нейродегенеративные расстройства (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [7-8], а данные нейровизуализации свидетельствуют о снижении объема NAc у больных с алкоголизмом [9].

Всё больше фактов указывает на то, что длительное употребление этанола способствует развитию нейровоспалительного процесса в головном мозге, что служит причиной увеличения уязвимости к развитию алкогольной аддикции, однако точные механизмы этого явления остаются

неизвестными [1, 10-14]. Немаловажную роль в этом процессе принимают Toll-подобные рецепторы (TLRs, Toll-like receptors), которые в головном мозге экспрессируются как клетками глии, так и нейронами. Выполненные за последние 20 лет исследования показали участие TLR3, TLR4 и TLR7 в патогенезе алкоголизма, однако исследования были в основном сосредоточены на изучении префронтальной коры головного мозга и гиппокампа, тогда как в других структурах мозга их роль практически не изучена [10-14]. В связи с этим представляется интересным изучить состояние экспрессии ключевых генов TLR-сигналинга на модели длительной алкоголизации в NAc головного мозга.

Следующая задача нашего эксперимента заключалась в фармакологической коррекции механизмов TLR-зависимой сигнализации в мозге длительно алкоголизованных крыс. С этой целью был использован антибиотик рифампицин (Rif), который в последнее время рассматривается как потенциальный препарат для минимизации последствий нейровоспалительного процесса. Хотя специфичная молекулярная мишень, ответственная за данный эффект, не установлена, имеются сведения о наличии у Rif противовоспалительных свойств, которые опосредуются TLR4-сигнализацией [15-17].

МЕТОДИКА

Животные

Работа выполнена на 25 крысах-самцах линии Wistar (начальный возраст 2-3 месяца, масса тела 280 ± 30 г), полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). На протяжении всего эксперимента животные имели неограниченный доступ к корму и воде.

Длительная алкоголизация

Для моделирования длительного употребления алкоголя было выполнено внутрижелудочное введение 20% раствора этанола с помощью желудочного зонда в течение 2 месяца ($n=16$, 2 г/кг этанола, ежедневно с понедельника по пятницу, всего 40 введений). Массу тела измеряли еженедельно для уточнения вводимых количеств раствора этанола. Выбранная дозировка этанола (2 г/кг) соответствует умеренным дозам употребления алкоголя [18]. Животным контрольной группы ($n=9$) с помощью желудочного зонда вводили воду.

Введение рифампицина

После 2-месячного введения этанола была произведена его отмена. В течение 7 суток после отмены алкоголизации одной группе животных ($n=8$) вводили рифампицин (100 мг/кг, внутривенно (в/в)), а другой ($n=8$) — физраствор в эквивалентном количестве. В работе был использован коммерческий препарат рифампицина (Рифампицин, лиофилизат д/приг. концентрата д/приг. р-ра для инфузий 150 мг, “Белмедпрепараты”, Беларусь). Животные контрольной группы ($n=9$) получали в/в инъекции физраствора.

Забор биоматериала

По окончании эксперимента на 7 сутки отмены алкоголизации крыс декапитировали и производили забор НАс; границы структуры мозга были определены в соответствии с атласом мозга крысы. Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C до проведения этапа гомогенизации.

Таблица. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr3</i>	AACTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTTT
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA
<i>Myd88</i>	TCATTGAGAAAAGGTGTCGT	AGTGCAGATAGTGATGAAC
<i>Ticam (Trif)</i>	GCTCAGCTAGATGATGTGAT	TGACAGTGACAGACCTGG
<i>NfκB</i>	ATACTGCTTTGACTCACTCC	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Irf3</i>	AATTCCTCCCCTGGCTC	CATGGGATCCTGAACCTTGT
<i>Irf1</i>	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC
<i>Hmgbl</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Il10</i>	CTGCAGGACTTTAAGGGTTA	CCTTTGTCTTGGAGCTTATT
<i>Il11</i>	GGGACATGAACGTGTGTTTGT	GGTAGGTAGGGAGTCCAGAT
<i>Il6</i>	ACTTCACAAGTCGGAGGCTT	AATTGCCATTGCACAACCTTTTC
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

ПЦР в режиме реального времени

Выделение тотальной РНК выполняли реагентом ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб проводили ДНКазой (“Promega”, США). Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 (“Implen”, Германия), по отношению A260/A280 (в норме $\geq 1,8$) оценивали чистоту выделенного продукта. 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 (Mx3005P, “Stratagene”, США) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green (“Biolabmix”, Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (таблица) (“Beagle”, Россия), подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Полученные данные нормировали к уровню гена *Gapdh* и рассчитывали в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом $2^{-\Delta\Delta C_q}$.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Graph Pad Prizm v. 6. Для сравнения групп использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние генов TLR-сигнальных каскадов реакций во время отмены этанола в НАс у крыс

Воздействие этанола способствует повышению уровня мРНК и белка некоторых подтипов TLR (TLR3, TLR4, TL7) в коре и гиппокампе головного мозга с последующим повышением уровня ряда провоспалительных сигнальных молекул, а применение антагонистов TLR-сигнальных каскадов

реакций или нокаут по генам этих рецепторов приводит к снижению уровня провоспалительных факторов в мозге [12, 19-21]. Повышенный уровень мРНК TLR3 был отмечен и в посмертных образцах орбифронтальной коры головного мозга людей, страдающих алкоголизмом [20]. Алкоголизация мышей в течение 10 дней приводила к увеличению уровня мРНК TLR3 в головном мозге мышей, а также к увеличению уровня белка TLR3 в орбифронтальной и энторинальной коре [20]. В работе на культурах клеток было показано, что добавление этанола вызывает активацию TLR3 и это способствовало высвобождению $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ нейронами и астроцитами, а блокирование гена *TRAIL*, адаптерного белка к TLR3, приводило к снижению уровней $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ как в астроцитах, так и в нейронах [22]. В этой же работе совместное действие этанола и агониста TLR3 показало увеличение уровней мРНК $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$, а также увеличение уровней белков p38 и IRF3 в культурах клеток микроглии и нейронов [22]. Кроме того, есть данные, что изменения в функционировании TLR3-сигналикации оказывает влияние на уровень добровольного потребления этанола в экспериментах на грызунах [23], что наводит на предположение о взаимосвязи внутриклеточных путей от TLR3 с нейромедиаторными путями. При активации TLR3 специфическим агонистом повышается экспрессия генов глутаматергической системы: *mGluR2* (metabotropic glutamate receptor 2), *mGluR3*, *Glt1* (glutamate transporter 1). При этом увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением мРНК TLR3 [24]. Имеется лишь одно исследование, где изучалось содержание мРНК TLR3 в NAc у крыс и было отмечено небольшое повышение мРНК на 1 сутки отмены этанола, тогда как на более поздних сроках содержание мРНК не исследовалось [25]. В нашем эксперименте мы не обнаружили изменений TLR3 на уровне мРНК на 10 сутки отмены длительной алкоголизации в NAc у крыс (рис. 1). Исходя из полученных данных, можем предположить, что к 10 дню отмены уровень экспрессии данного гена нормализуется в данной структуре головного мозга и изменения его экспрессии в этой структуре носят менее длительный характер.

При этом результаты нашего эксперимента демонстрируют повышенное содержание мРНК TLR4 на 10 сутки отмены этанола (рис. 1). Ранее исследователи показали, что употребление этанола мышами в течение 2 недель приводило к активации TLR4-зависимых провоспалительных сигнальных каскадов в коре головного мозга, что выражалось в активации MAP-киназ и NF- κ B с последующим синтезом и секрецией COX-2 (cyclooxygenase 2), iNOS (inducible nitric oxide synthase), HMGB1 (high-mobility group protein B1) [20, 26]. При этом наблюдалось развитие нейровоспалительного процесса на фоне повышенной активности этих провоспалительных факторов, что служило причиной демиелинизации аксонов и приводило к структурным синаптическим изменениям в результате повреждения белков миелина и синаптических белков. Эти события

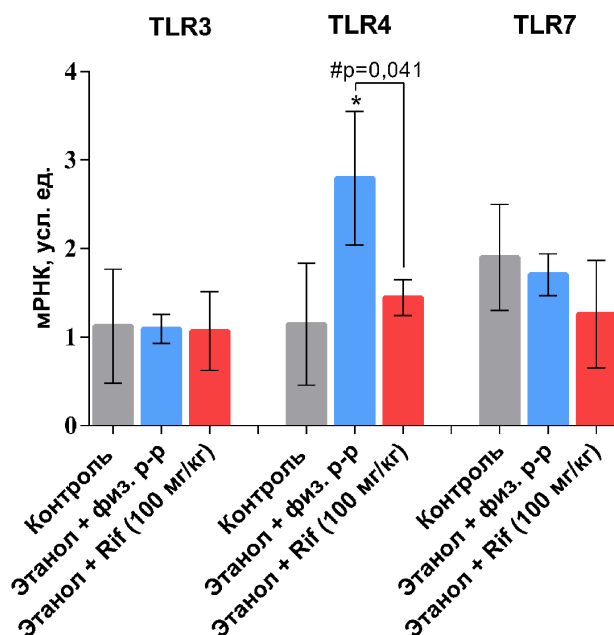


Рисунок 1. Уровень мРНК TLRs в NAc (* – $p < 0,05$ по отношению к контролю).

в последующем сказывались на ухудшении когнитивных параметров в тестах распознавания объектов, пассивного избегания и обонятельного поведения у мышей [26]. Применение генетических и фармакологических манипуляций (нокаут *Tlr4* и применение антагонистов TLR4) показало, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола [27], однако нокадаун гена *Tlr4* ингибирует продукцию провоспалительных медиаторов, блокируя активацию MAP-киназ и NF- κ B путей в астроцитах [28]. На нокаутных по гену *Tlr4* мышам, было показано, что такие мыши защищены от вызванного 5-месячным потреблением этанола повышения уровня концентрации цитокинов и хемокинов в мозге, тогда как в группе животных дикого типа (в присутствии гена *Tlr4*) употребление этанола приводило к увеличению концентрации цитокинов ($IL-1\beta$, $IL-17$, $TNF-\alpha$) и хемокинов (CCL2, MIP-1 α , CX3CL1) в крови и в стриатуме мозга животных [13, 29].

Результаты нашего эксперимента показали, что помимо повышенного уровня мРНК TLR4 отмечается также повышение уровня цитокина CCL2, а также небольшое повышение цитокина $IL1\beta$ (рис. 2). Кроме того, было обнаружено пониженное содержание мРНК противовоспалительных цитокинов $IL10$ и $IL11$ (рис. 2). Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о развитии длительного провоспалительного состояния в NAc, вызванного длительным употреблением этанола, и вполне возможно, что TLR4-зависимые сигнальные внутриклеточные пути здесь могут выполнять роль.

Кроме того, мы выявили повышение уровня мРНК *Hmgb1* в NAc (рис. 3). Установлено, что белок *Hmgb1* служит эндогенным агонистом TLR4 [19, 20]. Содержание белка повышается в головном мозге

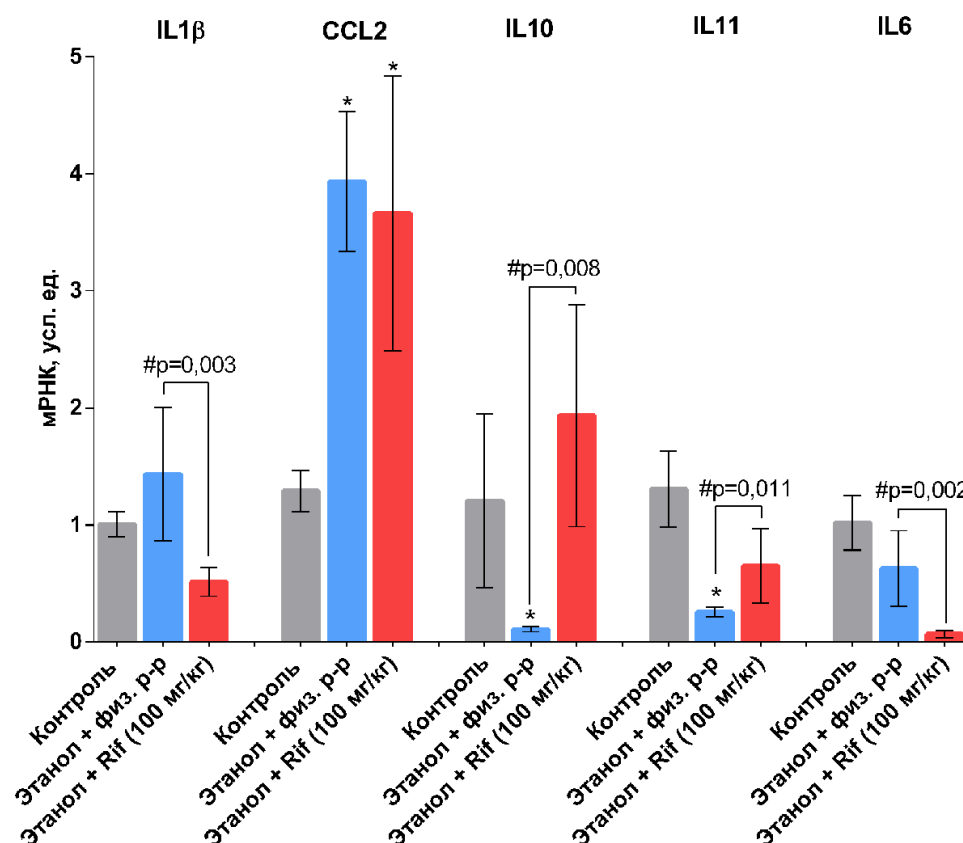


Рисунок 2. Содержание мРНК цитокинов в НАс (* – $p < 0,05$ по отношению к контролю).

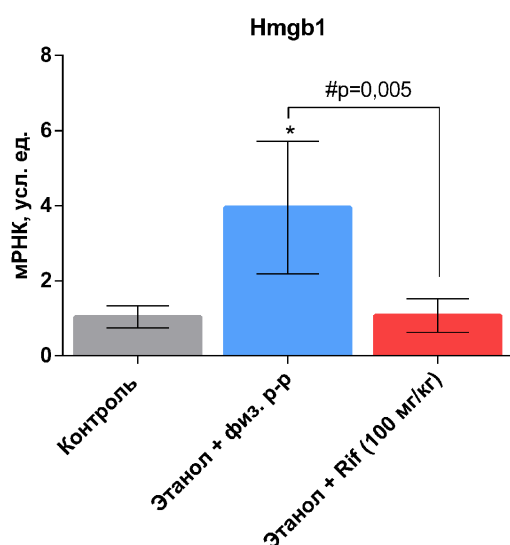


Рисунок 3. Уровень мРНК Hmgb1 в НАс (* – $p < 0,05$ по отношению к контролю).

при различных патологических состояниях, в том числе и при алкоголизме [11-12, 14, 17, 20]. Предполагается, что повышение его содержания может инициировать TLR4-зависимую сигнализацию, запуская нейровоспалительный процесс [11-12, 14, 17, 20].

Имеются наблюдения, что этанол вызывает образование комплексов Hmgb1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством

активации TLR7 [30]. В нашем эксперименте уровень мРНК TLR7 к 10 дню отмены не имел достоверных изменений относительно группы контроля (рис. 1). Исходя из этого, можно предположить, что повышенное содержание мРНК Hmgb1 в НАс опосредует длительное повышение провоспалительных TLR4-сигнальных каскадов реакций, но не оказывает существенного влияния на TLR7-сигнализацию по причине отсутствия выраженного повышения экспрессии гена *Tlr7* в период отмены алкоголя. Отметим, что содержание мРНК TLR7 в НАс при отмене длительной алкоголизации нами было оценено впервые и сравнивать полученные данные с аналогичными работами исследователей не представляется возможным.

Ранее нами было показано, что длительная алкоголизация (1 месяц) изменяет также содержание мРНК Hmgb1 в стриатуме и амигдале мозга крыс, что свидетельствует, по всей видимости, о наличии механизмов, регулирующих местную экспрессию гена *Hmgb1* в различных структурах головного мозга при длительной алкоголизации и отмене этанола [14].

Для понимания того, какой вклад вносят адаптерные белки Myd88 и Trif (он же Ticam) в проведение внутриклеточного TLR4-зависимого сигналинга, нами было оценено относительное содержание уровня их мРНК. Myd88 и Trif, как известно, передают сигнал от TLR4 на каскад внутриклеточных киназ, запуская активацию транскрипционных факторов, ответственных за регуляцию провоспалительных генов [12-13, 20-21].

Мы не обнаружили достоверных изменений в содержании мРНК Myd88 и Trif (рис. 4). Кроме того, нами не было обнаружено достоверных изменений в содержании мРНК транскрипционных факторов $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, IRF3 и IRF1 (рис. 5).

Содержание мРНК адаптерных белков изучалось ранее в НАс мозга крыс в момент длительной алкоголизации и при отмене на 1 сутки, и исследователи также не обнаружили изменений в содержаниях мРНК Myd88 и Trif [25]. Таким образом, экспрессия этих генов не изменяется в данной структуре мозга, что не исключает возможности усиления скорости передачи сигналов на провоспалительные гены посредством имеющегося конститутивного содержания белков транскрипционных факторов. Возможно, для этого достаточно лишь повышенной экспрессии TLR4,

который инициирует сигнальный каскад реакций при поступлении этанола в организм. Кроме того, существует необходимость в поиске возможных неизвестных новых путей проведения сигнала от TLR. Нельзя исключить, что TLR4 может опосредованно модулировать работу нейромедиаторных и нейропептидных систем, регулируя уровень потребления этанола, а также и другие процессы высшей нервной деятельности [31-35].

Влияние рифампицина на состояние генов TLR-сигнальных каскадов реакций во время отмены этанола в НАс у крыс

Рифампицин (Rif) — антибиотик широкого спектра действия из группы ансамицинов, который используется при лечении туберкулёза, а также других инфекций: стафилококковой, менингококковой, лепры [36, 37]. Rif может находиться как в связанной форме — с белками плазмы крови, так и в несвязанной, и в этом случае облегчается его прохождение через барьеры организма, в том числе и через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [36, 37]. Способность Rif к проникновению через ГЭБ представляет интерес для его применения с целью фармакологической коррекции патологических процессов головного мозга. Эпидемиологические исследования показали, что у пациентов с лепрой, получавших Rif, была замечена более низкая заболеваемость нейродегенеративными патологиями [17]. На различных моделях нейровоспаления экспериментально показано, что Rif способен снижать уровень провоспалительных цитокинов, содержание β -амилоида в модели болезни Альцгеймера, α -синуклеина в модели болезни Паркинсона. На модели демиелинизации мозолистого тела было показано, что при введении мышам Rif (40 мг/кг) регистрируется снижение экспрессии *Vax* и повышение экспрессии *Bcl2*, а также снижение активности каспазы-3 и каспазы-12 [38], что свидетельствует о снижении апоптотической активности, а предварительное введение рифампицина (20 мг/кг) подавляло индуцированную литий-пилокарпином нейродегенерацию гиппокампа, снижая уровень цитохрома *c* в гиппокампе [39]. Есть исследования, показывающее улучшение процесса аутофагии у мышей в гиппокампе при воздействии Rif (30 мг/кг) [40]. Этих сведений достаточно, чтобы заключить, что Rif обладает нейропротекторными свойствами, однако точный механизм действия остаётся неизвестным. В одном из исследований, выполненном на культуре микроглиальных клеток, имеются сведения о конкуренции Rif и липополисахарида за связывание с белком MD2. Белок MD2 необходим для связывания лиганда TLR4 с последующим проведением сигнала. Rif, связываясь с данным белком, способствовал угнетению сигналинга LPS-CD14-MD2-TLR4-NF- κ B в эксперименте, и, как следствие, отмечалось снижение активации NF- κ B и содержания провоспалительных факторов (NO, IL-1 β , TNF- α). Таким образом, Rif, конкурентно связываясь с MD2, может блокировать TLR4-зависимую сигнализацию [15].

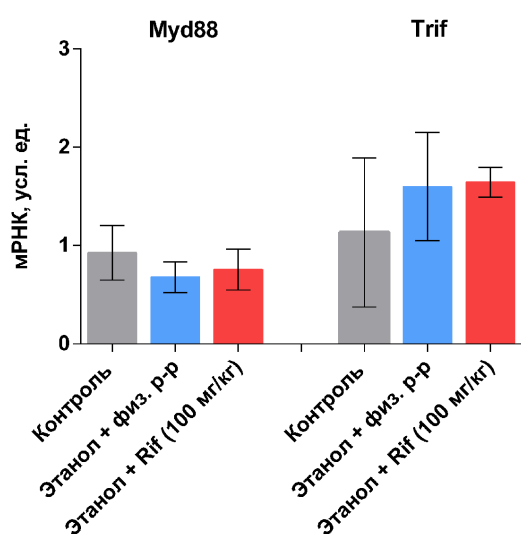


Рисунок 4. Уровень мРНК адаптерных белков в НАс.

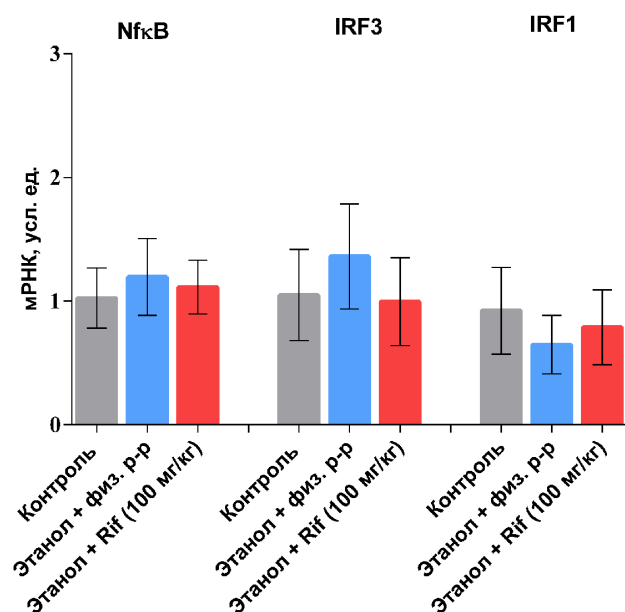


Рисунок 5. Уровень мРНК транскрипционных факторов в НАс.

В нашем исследовании Rif (100 мг/кг) не оказал влияния на содержание мРНК TLR3 и TLR7, тогда как содержание TLR4 было снижено до уровня контрольных значений на 10 сутки отмены алкоголя (рис. 1). Уровень мРНК Hmgb1 под действием препарата вернулся к исходному (рис. 2). Оценив содержание мРНК провоспалительных цитокинов, мы обнаружили снижение мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 в НАс мозга крыс, при этом интересным наблюдением для нас оказалось повышение содержания мРНК противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-11 под действием инъекций Rif (100 мг/кг). Полученные нами данные свидетельствуют о возможной коррекции рифампицином нейровоспалительных состояний, однако механизм его действия, возможно, имеет более сложный характер, связанный не только с конкуренцией Rif с лигандами TLR4 за связывание с белком MD2 (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительная алкоголизация (2 месяца) умеренными дозами этанола (2 г/кг) оказывает влияние на экспрессию генов врождённого иммунитета в НАс в период отмены алкоголя. На 10 сутки отмены этанола отмечено повышенное содержание мРНК TLR4 и Hmgb1, уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6) не имел достоверных изменений, что связано, скорее всего, с нормализацией экспрессии этих генов к 10 дню отмены алкоголя. При этом на 10 сутки отмены алкоголя отмечается

пониженный уровень мРНК IL-10 и IL-11. Данные цитокины чаще всего проявляют противовоспалительные свойства в ЦНС, и полученные наблюдения на уровне мРНК могут указывать на то, что длительная алкоголизация способна вносить долгосрочные патологические изменения в систему нейропротекторных и противовоспалительных ответов. В дальнейшем было бы интересным оценить состояние этих систем по содержанию белков, а также по клеточной локализации этих белков в НАс. Инъекции Rif (100 мг/кг) снижали повышенный уровень мРНК Tlr4 и Hmgb1, а также генов провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL6) в НАс у длительно алкоголизированных крыс в период отмены алкоголя; при этом введение препарата повышало уровень мРНК IL-10 и IL-11. Полученные данные свидетельствуют о способности Rif корректировать механизмы в работе генов системы воспаления в НАс мозга крыс, вызванные длительной алкоголизацией с последующей отменой этанола.

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.

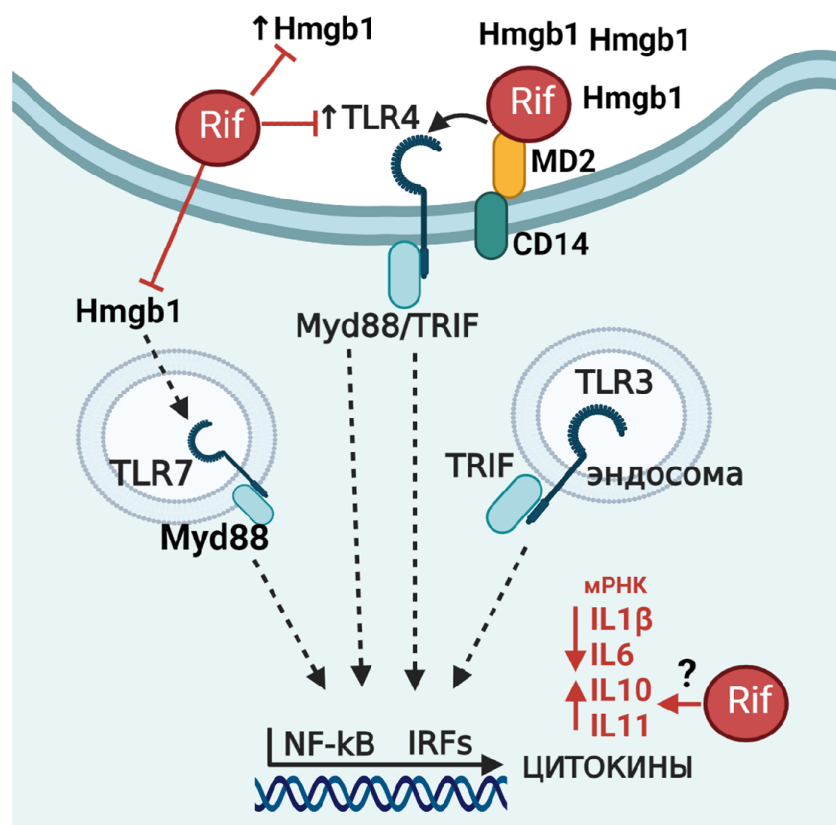


Рисунок 6. Предполагаемые пути действия Rif в эксперименте.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hutchinson M.R., Watkins L.R. (2014) Why is neuroimmunopharmacology crucial for the future of addiction research? *Neuropharmacology*, **76**(Part B), 218-227. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.039
- Nestler E.J. (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, **8**(11), 1445-1449. DOI: 10.1038/nn1578
- 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
- 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
- Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Шевелева М.В., Шумилов Е.Г., Роик Р.О. (2014) Участие прилежащего ядра в механизмах условного подкрепления у крыс. *Наркология*, **13**(7), 52-59. [Shabanov P.D., Lebedev A.A., Sheveleva M.V., Shumilov E.G., Roik R.O. (2014) Involvement of the nucleus accumbens in conditioned reinforcement mechanisms in rats. *Narcology*, **13**(7), 52-59.]
- 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.]
- Bayassi-Jakowicka M., Lietzau G., Czuba E., Patrone C., Kowianski P. (2022) More than addiction – The nucleus accumbens contribution to development of mental disorders and neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(5), 2618. DOI: 10.3390/ijms23052618.
- Francis T.C., Lobo M.K. (2017) Emerging role for nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes in depression. *Biol. Psychiatry*, **81**(8), 645-653. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.09.007
- 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
- Vetreno R.P., Crews F.T. (2014) Current hypotheses on the mechanisms of alcoholism. *Handb. Clin. Neurol.*, **125**, 477-497. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00027-6
- Balan I., Warnock K.T., Puche A., Gondre-Lewis M.C., Aurelian L. (2018) Innately activated TLR4 signal in the nucleus accumbens is sustained by CRF amplification loop and regulates impulsivity. *Brain, Behavior, Immunity*, **69**, 139-153. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.11.008
- 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
- Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2020) Уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола. *Медицинская иммунология*, **22**(1), 77-86. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2020) The expression level of Toll-like receptors changes in the emotogenic brain structures of rats under conditions of prolonged alcoholization and ethanol withdrawal. *Medical Immunology*, **22**(1), 77-86.] DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-1836
- Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2021) Экспрессия гена *Hmgb1* изменяется в стриатуме и амигдале мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола. *Биомедицинская химия*, **67**(1), 95-99. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2021) *Hmgb1* gene expression changes in the striatum and amygdala of the brain of rats during prolonged alcoholization and ethanol withdrawal. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 95-99.] DOI: 10.18097/PBMC20216701095
- Wang X., Grace P.M., Pham M.N., Cheng K., Strand K.A., Smith C., Li J., Watkins L.R., Yin H. (2013) Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J.*, **27**(7), 2713-2722. DOI: 10.1096/fj.12-222992
- Bi W., Zhu L., Jing X., Zeng Z., Liang Y., Xu A., Liu J., Xiao S., Yang L., Shi Q., Guo L., Tao E. (2014) Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Mol. Med. Rep.*, **10**(4), 1793-1799. DOI: 10.3892/mmr.2014.2480
- Bi W., Cheng X., Zeng Z., Zhou R., Luo R., Zhang J., Zhu L. (2021) Rifampicin ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive and motor impairments via inhibition of the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in mice. *Neurol. Res.*, **43**(5), 358-371. DOI: 10.1080/01616412.2020.1866353
- 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*, М., 240 p.]
- Lewohl J.M., Wang L., Miles M.F., Zhang L., Dodd P.R., Harris R.A. (2000) Gene expression in human alcoholism: Microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **24**(12), 1873-1882. PMID: 11141048
- Crews F.T., Zou J., Qin L. (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain, Behavior, Immunity*, **25**(Suppl.1), 4-12. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.003
- Coleman L.G. Jr., Zou J., Crews F.T. (2020) Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *J. Neuroinflammation*, **17**(1), 27. DOI: 10.1186/s12974-019-1678-y
- Lawrimore C.J., Coleman L.G., Crews F.T. (2019) Ethanol induces interferon expression in neurons via TRAIL: Role of astrocyte-to-neuron signaling.

- Psychopharmacology (Berlin), **236**(10), 2881-2897. DOI: 10.1007/s00213-018-5153-8.
23. Warden A.S., Azzam M., DaCosta A., Mason S., Blednov Y.A., Messing R.O., Mayfield R.D., Harris R.A. (2019) Toll-like receptor 3 dynamics in female C57BL/6J mice: Regulation of alcohol intake. *Brain, Behavior, Immunity*, **77**, 66-76. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.12.006
24. Randall P.A., Vetreño R.P., Makhijani V.H., Crews F.T., Besheer J. (2019) The Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C) induces rapid and lasting changes in gene expression related to glutamatergic function and increases ethanol self-administration in rats. *Alcoholism, Clin. Exper. Res.*, **43**(1), 48-60. DOI: 10.1111/acer.13919
25. McCarthy G.M., Warden A.S., Bridges C.R., Blednov Y.A., Harris R.A. (2017) Chronic ethanol consumption: Role of TLR3/TRIF-dependent signaling. *Addiction Biology*, **23**(3), 889-903. DOI: 10.1111/adb.12539
26. Montesinos J., Pascual M., Pla A., Maldonado C., Rodríguez-Arias M., Miñarro J., Guerri C. (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain, Behavior, Immunity*, **45**, 233-244. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.11.015
27. Harris R.A., Bajo M., Bell R.L., Blednov Y.A., Varodayan F.P., Truitt J.M., de Guglielmo G., Lasek A.W., Logrip M.L., Vendruscolo L.F., Roberts A.J., Roberts E., George O., Mayfield J., Billiar T.R., Hackam D.J., Mayfield R.D., Koob G.F., Roberto M., Homanics G.E. (2017) Genetic and pharmacologic manipulation of TLR4 has minimal impact on ethanol consumption in rodents. *J. Neurosci.*, **37**(5), 1139-1155. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2002-16.2016
28. Alfonso-Loeches S., Pascual-Lucas M., Blanco A.M., Sanchez-Vera I., Guerri C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci.*, **30**(24), 8285-8295. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010
29. Pascual M., Baliño P., Aragón C.M., Guerri C. (2015) Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: Role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*, **89**, 352-359. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.014
30. Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J. Neuroinflammation*, **14**(1), 1-15. DOI: 10.1186/s12974-017-0799-4
31. Liu J., Yang A.R., Kelly T., Puche A., Esoga C., June H.L. Jr, Elnabawi A., Merchenthaler I., Sieghart W., June H.L. Sr, Aurelian L. (2011) Binge alcohol drinking is associated with GABAA alpha2-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**(11), 4465-4470. DOI: 10.1073/pnas.1019020108
32. June H.L., Liu J., Warnock K.T., Bell K.A., Balan I., Bollino D., Puche A., Aurelian L. (2015) CRF-amplified neuronal TLR4/MCP-1 signaling regulates alcohol self-administration. *Neuropsychopharmacology*, **40**(6), 1549-1559. DOI: 10.1038/npp.2015.4
33. Garcia Bueno B., Caso J.R., Madrigal J.L., Leza J.C. (2016) Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **64**, 134-147. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.013
34. Figueroa-Hall L.K., Paulus M.P., Savitz J. (2020) Toll-like receptor signaling in depression. *Psychoneuroendocrinology*, **121**, 1-35. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2020.104843
35. Aurelian L., Balan I. (2019) GABAAR $\alpha 2$ -activated neuroimmune signal controls binge drinking and impulsivity through regulation of the CCL2/CX3CL1 balance. *Psychopharmacology (Berlin)*, **236**(10), 3023-3043. DOI: 10.1007/s00213-019-05220-4
36. Ebenezer G.J., Scollard D.M. (2021) Treatment and evaluation advances in leprosy neuropathy. *Neurotherapeutics*, **18**(4), 2337-2350. DOI: 10.1007/s13311-021-01153-z
37. Cao Y., Wang T., He K., Xue J., Wang X., Liang J. (2022) High-dose rifampicin for the treatment of tuberculous meningitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Pharm. Ther.*, **47**(4), 445-454. DOI: 10.1111/jcpt.13555
38. Zahednasab H., Firouzi M., Kaboudanian-Ardestani S., Mojallal-Tabatabaei Z., Karampour S., Keyvani H. (2019) The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. *Cytokine*, **113**, 417-426. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.016
39. Ali A.E., Mahdy H.M., Elsherbiny D.M., Azab S.S. (2018) Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machineries. *Biochem. Pharmacol.*, **156**, 431-443. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.09.004
40. Zhu L., Yuan Q., Zeng Z., Zhou R., Luo R., Zhang J., Tsang C.K., Bi W. (2021) Rifampicin suppresses amyloid- β accumulation through enhancing autophagy in the hippocampus of a lipopolysaccharide-induced mouse model of cognitive decline. *J. Alzheimers Dis.*, **79**(3), 1171-1184. DOI: 10.3233/JAD-200690.

Поступила в редакцию: 24. 04. 2022.
После доработки: 17. 06. 2022.
Принята к печати: 27. 06. 2022.

**THE EFFECT OF RIFAMPICIN ON THE SYSTEM OF TOLL-LIKE RECEPTORS
IN THE NUCLEUS ACCUMBENS OF THE BRAIN OF LONG-TERM ALCOHOLIZED RATS
DURING ALCOHOL WITHDRAWAL**

M.I. Airapetov^{1,2}, S.O. Eresko^{1,3}, D.A. Skabelkin¹, A.R. Iskalieva¹, A.A. Lebedev¹, E.R. Bychkov¹, P.D. Shabanov^{1,4}*

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

²Department of Pharmacology, St. Petersburg State Pediatric Medical University,
2 Litovskaya str., St. Petersburg, 194100 Russia

³Research and Training Center of Molecular and Cellular Technologies,
St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 14 Prof. Popova str., St. Petersburg, Russia

⁴Department of Pharmacology, Kirov Military Medical Academy,
6 Acad. Lebedeva str., St. Petersburg, 194044 Russia

Nucleus accumbens (NAc) is the ventral part of the striatum of the brain; it is an important part of the mesolimbic pathway involved in the reward system that mediates the formation of various forms of addiction, in particular alcohol addiction. Neuroimaging data and *in vitro* studies indicate the development of a pronounced neurodegenerative process in the NAc, with long-term alcohol use, but the key mechanisms mediating this process remain unknown. In recent years, the attention of researchers has been focused on studying the system of Toll-like receptors (TLRs), the increased activity of which is clearly shown in the cerebral cortex and hippocampus during prolonged alcohol exposure, but there is a need to study the role of this system in other brain structures. In this study, we have shown that prolonged alcohol exposure (2 months) with moderate doses of ethanol (2 g/kg) promotes a pronounced increase in the expression of the *Tlr4* gene and its endogenous ligand *Hmgbl* in NAc during the period of alcohol withdrawal in rats. Injections of rifampicin (100 mg/kg) reduced the elevated expression level of *Hmgbl*, *Tlr4*, as well as pro-inflammatory cytokine genes (*IL1β*, *IL6*), while the administration of the drug increased the reduced level of mRNA of anti-inflammatory cytokines (*IL10*, *IL11*).

Key words: alcohol exposure; ethanol; brain; neuroinflammation; nucleus accumbens; TLR4; rifampicin

Funding. The study was funded from the budget of the Institute of Experimental Medicine (State Assignment “Pharmacological analysis of the action of neurotropic agents, study of intracellular targets and creation of targeted delivery systems”, no. 0557-2019-0004), as well as at the expense of funding from the St. Petersburg State Pediatric Medical University.

Received: 24.04.2022; revised: 17.06.2022; accepted: 27.06.2022.