

## ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ АЗИТРОМИЦИНОМ: НОВЫЕ ДАННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ НА БУДУЩЕЕ

© 2024 М.И. Айрапетов<sup>1,2\*</sup>, С.О. Ереско<sup>1,3</sup>, С.А. Шамаева<sup>1</sup>, Е.Р. Бычков<sup>1</sup>,  
А.А. Лебедев<sup>1</sup>, П.Д. Шабанов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: interleukin1b@gmail.com

<sup>2</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, 194044 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет  
информационных технологий, механики и оптики, 197022 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2024

После доработки 07.10.2024

Принята к публикации 09.10.2024

При длительном поступлении этанола в организм развиваются нарушения в эмоциональном спектре, отмечаются проблемы с памятью. Эти симптомы могут быть опосредованы развитием нейрхимических изменений в гиппокампе головного мозга. Несмотря на наличие данных, свидетельствующих об уязвимости гиппокампа при хронической алкогольной интоксикации и развитии в этой области мозга нейровоспаления и нейродегенерации, ключевые молекулярные механизмы не определены. Цель исследования заключалась в изучении изменений со стороны иммунной системы на периферии, а также в гиппокампе головного мозга крыс при воздействии этанола и при фармакологической коррекции этих изменений азитромицином (АЗМ). Моделирование длительного воздействия этанола было выполнено путем введения крысам 20%-ного раствора этанола (4 г/кг) на протяжении 4-х недель. Был выполнен общий биохимический и клинический анализ крови у животных. В гиппокампе оценивали уровень экспрессии генов цитокинов (*Il1 $\beta$* , *Ccl2*, *Il6*, *Il11*, *Il13*, *Tnfa*, *Tgfb*) и генов системы toll-подобных рецепторов (*Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7*, *Nfkb1*, *Hmgb1*) и связанных с системой TLR молекул микроРНК (*miR-182*, *miR-155-5p*, *miR-96-5p*, *miR-let-7b*). Также оценивали в гиппокампе содержание белка IL-1 $\beta$ . Длительная алкоголизация вызвала повышение уровней мРНК и белка IL-1 $\beta$ , снижение уровня мРНК TNF $\alpha$ , IL11, TLR3 и TLR7. Содержание miR-let-7b, miR-96, miR-155 было понижено в гиппокампе при длительной алкоголизации. В условиях отмены этанола сохранялся повышенный уровень мРНК и белка IL-1 $\beta$  и уровень мРНК *Hmgb1*. Уровень мРНК *Tlr3* при отмене был снижен. Введение АЗМ позволило снизить в условиях отмены этанола уровни мРНК *Il1 $\beta$* , *Tlr3* и *Hmgb1*, а при более высоких дозировках препарата было отмечено снижение уровня белка IL-1 $\beta$  в гиппокампе мозга крыс. Таким образом, наше исследование позволило получить новые сведения о механизмах развития нейровоспаления в гиппокампе мозга при длительном воздействии этанола и при его отмене. Полученные результаты позволили наметить ряд задач для последующих исследований в этом направлении.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанол, гиппокамп, toll-подобные рецепторы, цитокины, IL-1 $\beta$ , микроРНК, азитромицин.

DOI: 10.31857/S0320972524110052 EDN: IKUDLY

### ВВЕДЕНИЕ

С некоторой периодичностью в свет выходят новые публикации, которые позволяют расши-

рить современные знания о нейровоспалительной теории алкоголизма, которая развивается уже более 20 лет, и ее суть заключается в том, что длительное поступление этанола в организм

Принятые сокращения: АЗМ – азитромицин; TLR – toll-подобные рецепторы.

\* Адресат для корреспонденции.

активирует механизмы нейровоспаления, которые ведут к развитию нейродегенерации в головном мозге и, как следствие, к нарушению согласованного исполнительного контроля над высшими психическими функциями мозга, что усугубляет течение заболевания [1–4]. То, что хроническое поступление алкоголя вызывает гибель нервных клеток, на данный момент мы можем признать установленным фактом [1–8], однако первые наблюдения в этом направлении мы встречаем еще в работах С.С. Корсакова [9]. Позже эти наблюдения были названы синдромом Корсакова (или корсаковский синдром алкогольный), который возникает вследствие хронической алкогольной интоксикации. При данном состоянии развиваются малообратимые нарушения памяти, лекарственная терапия неэффективна, и реабилитация при корсаковском синдроме направлена, прежде всего, на адаптацию больного к жизнедеятельности при ограниченных возможностях памяти [6, 8–10]. В эмоциональном плане у больных могут преобладать эйфория и благодушие или, наоборот, безразличие и вялость [11]. Такой синдром является тяжелым проявлением нейродегенерации, которая может развиваться на фоне хронического поступления этанола в организм, однако в работах последних лет имеются сведения о развитии признаков нейродегенерации при более коротких и легких формах воздействия этанола в эксперименте, т.е. значительно чаще, чем только при корсаковском синдроме алкогольном [8, 9]. Имеется предположение, что такие патогенетические процессы могут стоять на пути перехода от любителей алкоголя (пьянство) к алкоголизму в ранней его стадии, а далее, приводить к более тяжелым формам алкоголизма [8, 9]. Связано это, вероятно, с тем, что гибель клеток в различных структурах головного мозга при хроническом поступлении этанола нарушает согласованную работу головного мозга, внося изменения в психофизиологические механизмы контроля поведения организма, что формирует те симптомы, которые характерны для алкоголизма – непреодолимое желание к употреблению алкоголя, когнитивные и эмоциональные расстройства [1, 2, 12, 13].

Полученные данные при изучении посмертных образцов головного мозга у пациентов с хроническим употреблением алкоголя показали наличие нейровоспалительного процесса, который развивается в коре головного мозга [8, 9]. Такие сведения навели исследователей на предположение о том, что формирование алкогольной зависимости может быть сопряжено не только с дисфункциями в нейромедиаторных и нейропептидных системах, но также опосредовано различными факторами нейровоспаления [8–11]. Система toll-подобных рецепторов (TLR), являясь

ключевым звеном врожденного иммунитета, участвует в регуляции синтеза многих факторов воспаления [1, 2, 14, 15]. Она включает в себя эндогенные агонисты TLR (например, Hmgb1 и ряд микроРНК), TLR-рецепторы и внутриклеточные адаптерные белки (в том числе MyD88, TRIF, IRF, NF- $\kappa$ B1 и др.), которые инициируют активацию генов нейровоспаления [1, 2, 14, 15].

Моделирование длительного воздействия этанола как *in vitro*, так и *in vivo* позволило получить сведения о том, что система toll-подобных рецепторов действительно реагирует в клетках нервной ткани на поступление этанола – отмечается рост экспрессии генов и белков TLR, их эндогенных агонистов, а также повышается уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов [1–4]. Однако, несмотря на наличие таких сведений, все еще не существует полного понимания того, как оказывает влияние длительно поступающий этанол на данную систему в разных структурах головного мозга. В первую очередь представляют интерес те структуры, которые являются элементами так называемой системы подкрепления и ассоциированы с развитием алкогольной аддикции [16–18]. Одной из таких ключевых структур является гиппокамп [16–18]. Представляется интересным оценить уровень экспрессии элементов системы TLR и связанных с ней молекул в гиппокампе при моделировании длительного воздействия этанола, а также в состоянии отмены этанола и при фармакологической коррекции с помощью азитромицина (АЗМ), который, по данным литературы, зарекомендовал себя эффективным соединением для снижения нейровоспаления [19–22], что и послужило целью нашей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В эксперименте использовали 56 взрослых самцов крыс породы Вистар (средняя масса тела – 250–300 г, возраст – 3 месяца), которые были 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, пять групп животных с отменой длительного воздействия этанола («отмена этанола, 7-е сутки»; «отмена этанола + вода»; «отмена этанола + АЗМ, 40 мг/кг»; «отмена этанола + АЗМ, 80 мг/кг»; «отмена этанола + АЗМ, 160 мг/кг»). Животные получали свободный доступ к стандартному корму для крыс.

**Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены.** Способ моделирования был нами использован на основе имеющихся

в литературе с некоторыми модификациями [23–25]. Длительное воздействие этанола выполнялось путем внутрижелудочного введения 20%-ного раствора этанола с помощью желудочного зонда из расчета 4 г/кг чистого этанола с понедельника по пятницу в течение 4-х недель (всего 20 введений). Контрольные животные получали эквивалентные объемы воды по такой же схеме. При этом все животные имели свободный доступ к воде. Декапитацию животных производили на последний день алкоголизации через 2 часа после последнего введения этанола (группа «этанол»). Для моделирования состояния отмены этанола животным прекращалось введение этанола, и на 7-е сутки отмены этанола животных выводили из эксперимента (группа «отмена этанола, 7-е сутки»).

**Инъекции фармакологических средств.** По окончании длительного воздействия этанола животным три дня внутрижелудочно через зонд вводили азитромицин (40 мг/кг, 80 мг/кг, 160 мг/кг; «Хемомицин», порошок для приготовления суспензии для приема внутрь («Nemofarm»,

Сербия)). Крысам контрольной группы вводили соответствующий объем воды (группа «отмены этанола + вода»). Декапитацию животных производили во всех группах на 7-е сутки отмены этанола.

**Забор биоматериала.** Границы необходимых структур мозга были определены в соответствии с атласом мозга крысы [26]. Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре –80 °С. Кровь извлекали в момент декапитации животных в специально подготовленные пробирки для проведения биохимического и клинического анализа крови.

**Анализ крови.** Измерение клинических показателей крови проводили в первые 2 часа после ее забора на ветеринарном гематологическом анализаторе («Mindray», Китай). Определение биохимических показателей в сыворотке крови было выполнено по стандартной методике на автоматическом биохимическом анализаторе («Erba mannheim xl-100», Германия).

**Выделение РНК из образцов мозга.** Выделение тотальной РНК выполняли, используя

Таблица 1. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'–3')	Обратный (5'–3')
<i>Tlr3</i>	AACTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTTT
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGA
<i>Nfkb1</i>	ATACTGCTTTGACTCACTCC	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Tnfa</i>	CACGTCGTAGCAAACCAC	TATGAAATGGCAAATCGGCT
<i>Il13</i>	TGTAACCAAAAGGCCTCGGA	TGGCCATAGCGGAAAAGTTG
<i>Tgfb</i>	GGACTACTACGCCAAAGAAG	GGACTACTACGCCAAAGAAG
<i>Il11</i>	GGGACATGAACGTGTTTTGT	GGTAGGTAGGGAGTCCAGAT
<i>Il6</i>	ACTTCACAAGTCGGAGGCTT	AATTGCCATTGCACAACCTTTTC
<i>miR-182</i>	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-155-5p</i>	TTAATGCTAATTGTGATAGGGGT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-96-5p</i>	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-let-7b</i>	GCGGCGGCTATACAACCTACTGC	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>U6</i>	TGCTTCGGCAGCACATATAC	AGGGGCCATGCTAATCTTCT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

реагент ExtractRNA («Евроген», Россия), в полном соответствии с инструкцией производителя. Чистоту выделения и концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 («Implen», Германия); по отношению A260/A280 (в норме  $\geq 1,8$ ) оценивали чистоту выделенного продукта.

**ОТ-ПЦР.** Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген») в полном соответствии с инструкцией производителя. Перед проведением ОТ для микроРНК было выполнено полиаденилирование микроРНК с помощью поли(А)-полимеразы *Escherichia coli* («New England Biolabs Inc.», США) по ранее описанной методике [27]. ОТ для микроРНК проводили в 10 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit и специфического PolyT-адаптера (5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTT-TTTTTTTTVN-3').

Концентрацию полученной кДНК в ходе ОТ измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330.

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 и miR рассчитывался методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , содержание мРНК нормировали к уровню экспрессии гена *Gapdh*, уровень miR нормировали к уровню экспрессии гена *U6*. Все реакции проводили в трех повторах.

**Иммуноферментный анализ.** Замороженные образцы гиппокампа мозга до проведения иммуноферментного анализа (ИФА) гомогенизировали на криомельнице («CRYOMILL», Китай); далее, полученный замороженный порошок ткани растворяли в 1 мл PBS (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g. Собираемые супернатанты аликвотировали по 100 мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения ИФА. Измерение белка IL-1 $\beta$  выполнено с помощью коммерческого набора для проведения ИФА («Cloud-Clone Corp.», США) по протоколу. По окончании реакции поглощение измеряли на планшетном фотометре Synergy 2 («Bio Tek», США). Общий белок определяли методом Бредфорда с использованием готового набора Bio-Rad Protein Assay Kit («Bio-Rad», США). Измерение проводили в трех повторах.

**Статистическая обработка.** Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v.6. Все данные были представлены как среднее  $\pm$  стандартное

отклонение. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни для малых независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при значении  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Биохимические и клинические показатели крови при длительном воздействии этанола.

Для оценки общего состояния организма животных при моделировании длительного воздействия этанола мы посчитали целесообразным оценить биохимические и клинические показатели параметров крови у животных.

Результаты анализа позволили выявить повышенные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и альбумина в сыворотке крови у экспериментальных животных (табл. 2). Повышение уровня альбумина может отражать изменения в степени дегидратации организма, что характерно для пациентов с хроническим алкоголизмом, а повышение уровня АЛТ служит признаком возможного поражения гепатоцитов у животных в эксперименте, что также характерно для состояния организма с длительной алкогольной интоксикацией [8, 28, 29].

Результаты клинического анализа крови показали снижение уровня лимфоцитов и повышение уровня моноцитов у животных с длительным потреблением этанола (табл. 3).

Данные показатели отражают наличие ответной реакции со стороны иммунной системы,

**Таблица 2.** Показатели биохимического анализа сыворотки крови крыс при длительном воздействии этанола

Показатель	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
АЛТ, МЕ/литр	18,63 $\pm$ 2,91	28,14 $\pm$ 5,64*
Глюкоза, ммоль/литр	4,39 $\pm$ 0,43	4,01 $\pm$ 1,08
Креатинин, мкмоль/литр	25,43 $\pm$ 7,65	28,16 $\pm$ 3,58
Мочевина, ммоль/литр	3,48 $\pm$ 0,54	4,07 $\pm$ 0,36
Альбумин, г/литр	44,87 $\pm$ 3,99	55,43 $\pm$ 4,86*
АСТ, МЕ/литр	69,53 $\pm$ 14,67	64,44 $\pm$ 6,35
Общий белок, г/литр	59,30 $\pm$ 8,59	67,38 $\pm$ 4,48

Примечание. АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе.

**Таблица 3.** Показатели клинического анализа крови крыс при длительном воздействии этанола

Показатель	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	8,52 ± 1,82	6,12 ± 2,22
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0,61 ± 0,51	0,98 ± 0,53
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	7,37 ± 2,10	4,01 ± 1,76*
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /литр	0,5 ± 0,46	1,10 ± 0,69*
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /литр	0 ± 0,00	0 ± 0,00
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /литр	8,04 ± 0,41	7,73 ± 0,51
Гемоглобин, г/литр	141,5 ± 8,10	145,0 ± 8,74
Гематокрит, %	41,4 ± 1,84	41,9 ± 2,44
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /литр	977,33 ± 156,42	754,01 ± 265,26

Примечание. \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе.

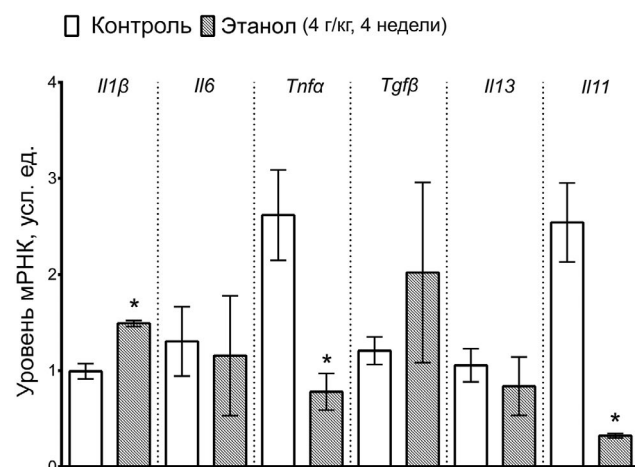
которая вызвана длительным поступлением этанола в организм животных. Повышение уровня моноцитов может отражать наличие в той или иной мере хронического периферического воспалительного ответа, а снижение уровня лимфоцитов может быть показателем общего снижения активности адаптивной иммунной системы, что нередко отмечается в условиях длительного поступления этанола в организм [29–31].

Таким образом, выполненное нами моделирование длительного воздействия этанола на организм привело к ряду изменений в параметрах крови у животных, что является признаком развития патологического состояния. Стоит отметить тот факт, что масса тела животных не имела значимых различий между экспериментальной и контрольной группами животных на протяжении всего эксперимента, а животные, которые проявляли признаки той или иной болезни (например, приобретенная травма в ходе эксперимента), были выведены из эксперимента.

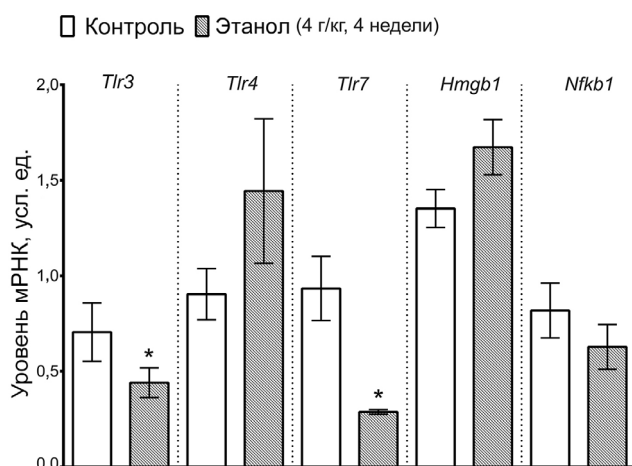
**Экспрессия генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола.** Длительное воздействие этанола вызвало повышение уровня экспрессии

гена *Il1β* и снижение уровня экспрессии генов *Tnfa* и *Il11* в гиппокампе мозга крыс (рис. 1). Нами не выявлено значимых изменений на уровне мРНК в экспрессии генов *Il6*, *Tgfb* и *Il13* (рис. 1). Продукт гена *Il1β* является ключевым провоспалительным цитокином, и его повышение часто ассоциируют с развитием нейровоспаления. Ранее исследователи указывали на повышение уровня его экспрессии в головном мозге при длительном воздействии этанола [12, 32, 33]. Полученные нами данные о повышенном уровне экспрессии этого гена в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола имеют сходный характер с имеющимися ранее результатами, которые были получены другими исследователями в структурах мозга, а также в гиппокампе, но в других условиях моделирования длительного воздействия этанола [12, 32, 33]. Уровень экспрессии гена *Il6* в нашем эксперименте не был изменен в гиппокампе, а экспрессия гена *Tnfa* снижена (рис. 1). Оба цитокина, по данным последних лет, обладают двойственными эффектами в отношении развития воспалительных событий – при одних состояниях они выступают как провоспалительные, а при других – могут проявлять противонейровоспалительные эффекты [15, 34]. Таким образом, относительно снижения уровня экспрессии гена *Tnfa* делать однозначные выводы не представляется возможным, здесь потребуются дополнительные наблюдения в будущем.

Интересным для нас наблюдением служит сниженная экспрессия гена *Il11* (рис. 1). Имеются сведения, что этот цитокин в нервной ткани проявляет противовоспалительные эффекты, что было показано в исследованиях при моделировании различных патологий [35]. Возможно, мы наблюдаем проявление сниженных механизмов сдерживания провоспалительных процессов,



**Рис. 1.** Содержание мРНК цитокинов в гиппокампе мозга у крыс с длительным потреблением этанола; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе



**Рис. 2.** Относительный уровень содержания мРНК генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс с длительным потреблением этанола; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе

которые развиваются на фоне хронического поступления этанола в организм. Сниженный уровень экспрессии гена *Il11* может являться одной из причин дисфункций в этих механизмах, и изучение этого цитокина в будущем может позволить найти новую молекулярную мишень для коррекции нейровоспаления. Эти предположения требуют дальнейших исследований.

Кроме цитокинов, мы оценивали экспрессию некоторых генов системы toll-подобных рецепторов. Нами не было выявлено значимых изменений в экспрессии генов *Tlr4*, *Hmgb1* и *Nfkb1*, однако мы выявили пониженные уровни экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr7* (рис. 2). Ранее в работах исследователей сообщалось о повышении уровня экспрессии гена *Tlr7*, и это повышение было связано с проявлениями нейродегенеративного процесса [1, 5]. Возможно, получение результата, отличающегося от ранее описанных, характеризует региональную особенность экспрессии данного гена или используемая нами модель длительного воздействия этанола умеренными дозами позволила получить иные сведения.

В предыдущих наших работах также был замечен тот факт, что в условиях длительного воздействия этанола система TLR подвержена минимальным изменениям, однако отмена длительной алкоголизации вызывает резкий дисбаланс в их экспрессии [36–38]. Так, например, подобные результаты мы получили в прилежащем ядре головного мозга крыс в аналогичной модели длительного воздействия этанола [37]. Таким образом, представляется интересным изучение содержания мРНК и белков цитокинов и других компонентов TLR-сигнализации в гиппокампе не только в условиях длительной алкоголизации, но и при отмене.

**Таблица 4.** Относительный уровень экспрессии микроРНК в гиппокампе мозга крыс в эксперименте, усл. ед.

miR	Контроль (n = 8)	Этанол (n = 8)
miR-let-7b	0,78 ± 0,13	0,43 ± 0,19*
miR-96	1,08 ± 0,34	0,38 ± 0,15*
miR-155	0,96 ± 0,37	0,51 ± 0,25*
miR-182	1,01 ± 0,25	0,79 ± 0,17

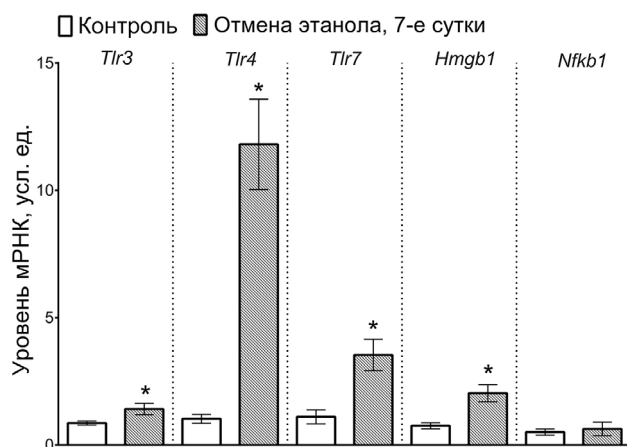
Примечание. \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе.

**Изучение содержания микроРНК в гиппокампе головного мозга крыс при длительном воздействии этанола.** Анализ относительного содержания молекул микроРНК в гиппокампе головного мозга крыс показал, что miR-let-7b, miR-96 и miR-155 были значимо изменены в группе животных с длительным воздействием этанола – уровень miR-let-7b понизился в 1,8 раза, miR-96 – понизился в 2,8 раза, miR-155 – понизился в 1,9 раза (табл. 4).

Исследуемые в работе молекулы miR были нами отобраны из тех соображений, что они имеют функциональную связь с TLR-сигнальными путями [39–43]. Известно, что miR-let-7b является эндогенным агонистом TLR7 [1, 12]. Сообщается, что изменение экспрессии miR-let-7b может иметь функциональную связь с TLR7-сигнальным каскадом реакций [5, 12].

При повышении активности TLR4-сигнализации наблюдается повышение miR-155 в клетках микроглии головного мозга мышей, тогда как у нокаутных мышей по гену *Tlr4* (TLR4-KO) этого не отмечается [41]. У мышей TLR4-KO не изменяется содержание miR-96 в коре головного мозга, тогда как длительная алкоголизация у мышей дикого типа снижала уровень miR-96 [42, 43]. Имеются данные на примере miR-182-5p, где сообщается о наличии функциональных взаимодействий кластера miR-183C (в него входят miR-96 и miR-182) с белком TLR4 [42, 43]. Стоит отметить и тот факт, что не только miR-let-7b (эндогенный агонист TLR7) был снижен в нашем эксперименте, но и уровень мРНК *Tlr7*, что вызывает интерес к дальнейшим исследованиям для установления возможной функциональной связи между наблюдаемыми изменениями.

**Экспрессия генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс в условиях отмены длительного воздействия этанола.** О состоянии исследуемой нами системы генов в условиях отмены этанола практически ничего не известно. Имеющиеся небольшие сведения в этом



**Рис. 3.** Содержание мРНК цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга у крыс при отмене этанола; \*  $p \leq 0,05$  – по отношению к контрольной группе

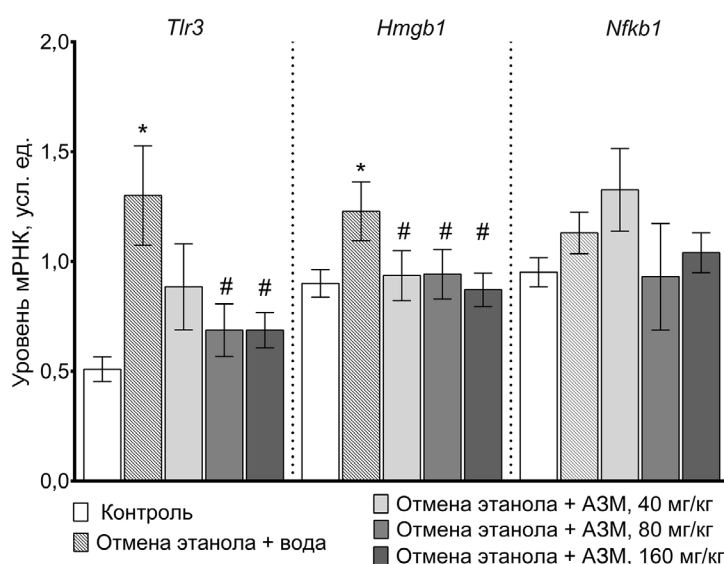
направлении в основном получены при моделировании хронических и субхронических форм воздействия этанола либо на следующий день после отмены [2, 13]. В текущем эксперименте мы выполнили анализ экспрессии исследуемых генов через 7 дней после отмены длительной алкоголизации (рис. 3).

Результаты позволили получить сведения о том, что через 7 дней после отмены уровни экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7* и *Hmgb1* были повышены, уровень экспрессии гена *Nfkb1* не был подвержен изменениям (рис. 3). Наиболее значимое повышение экспрессии было характерно для гена *Tlr4*. Полученные сведения позволяют сделать предположение о вовлеченности системы toll-подобных рецепторов в патогенетические механизмы в гиппокампе мозга, развивающиеся на фоне длительного поступления этанола в организм. Нами были получены данные, что в группе животных с длительным воздействием этанола уровни экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr7* были понижены (рис. 2), тогда как в условиях отмены этанола наблюдается повышение уровня их экспрессии (рис. 3). Полученные результаты согласуются с теми данными, что были ранее получены исследователями в других структурах головного мозга, а также на аутопсийном материале от пациентов с хронической алкогольной интоксикацией [2, 13, 24]. В серии работ, целью которых служило определение функционального значения таких изменений, были получены сведения о том, что повышение экспрессии генов *Tlr4* и *Hmgb1* приводит к активации генов провоспалительных цитокинов и, как следствие, к развитию нейровоспаления [12, 13, 24, 33, 41]. Повышение активности генов *Hmgb1* и *Tlr7* ведет к активации механизмов запрограммированной клеточной гибели в нейрональных культурах (в исследова-

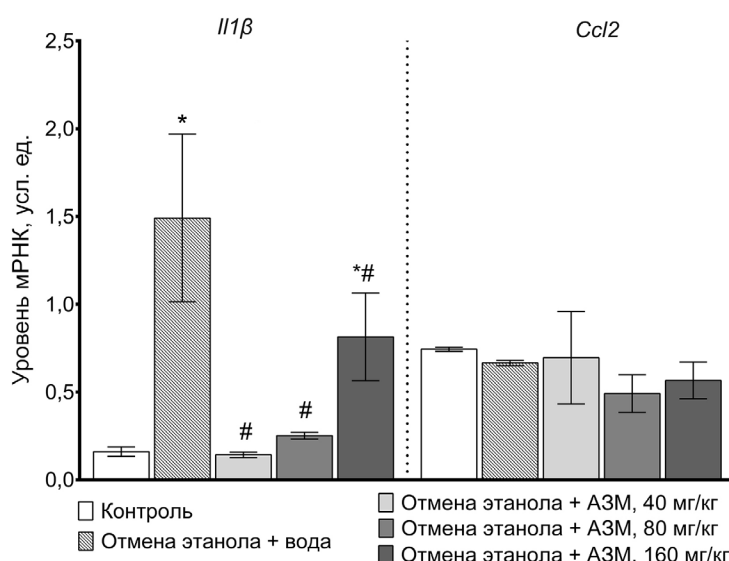
ниях *in vitro*), т.е. к проявлению признаков нейродегенерации [5]. Что касается гена *Tlr3*, то имеются сведения о том, что активация продукта экспрессии данного гена, эндосомального белка-рецептора TLR3, специфическими агонистами ведет к повышению уровня добровольного потребления этанола у животных [2]. Таким образом, отмеченное нами изменение в экспрессии данных генов свидетельствует о наличии стойких патологических процессов в гиппокампе мозга крыс через 7 дней после отмены этанола, и система исследуемых нами генов участвует в их реализации. Полученные данные еще раз указывают на значимость проведения исследований в этом направлении.

**Применение азитромицина для коррекции экспрессии генов цитокинов и генов системы toll-подобных рецепторов в условиях отмены длительного воздействия этанола.** Мы представляем результаты своих первых наблюдений, в задачи которых входила оценка экспрессии генов цитокинов и генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс в условиях отмены длительного воздействия этанола и при фармакологической коррекции азитромицином. На различных моделях патологических состояний нервной системы АЗМ зарекомендовал себя как эффективный нейротектор, который снижает уровень факторов воспаления и замедляет процесс гибели нервных клеток [19–22]. Точный механизм остается не известным. Так, например, существуют предположения, что эффект может реализовываться через белковый комплекс NF- $\kappa$ B [19–22], который является ключевым на пути передачи внеклеточных сигнальных путей от TLR [14, 15]. Мы поставили задачу оценить возможное нейротекторное влияние АЗМ на исследуемую нами систему генов TLR в гиппокампе мозга в условиях отмены длительного воздействия этанола.

В данном исследовании нами также были получены данные по экспрессии генов *Tlr3*, *Hmgb1* и *Nfkb1* на 7-е сутки отмены длительного воздействия этанола – экспрессия генов *Tlr3* и *Hmgb1* повышена, а уровень экспрессии гена *Nfkb1* не изменен (рис. 4). Выполненное введение АЗМ позволило скорректировать уровень экспрессии генов *Tlr3* и *Hmgb1* (рис. 4). По отношению к гену *Hmgb1* положительным эффектом обладали все три используемые дозировки препарата, однако по отношению к гену *Tlr3* АЗМ в самой низкой дозировке (40 мг/кг) не оказал эффекта (рис. 4). На уровень экспрессии гена *Nfkb1* препарат не оказал влияния (рис. 4). Кроме того, мы оценили влияние АЗМ на уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов *Il1 $\beta$*  и *Ccl2* в условиях отмены этанола (рис. 5). Ранее эффект АЗМ исследовали по отношению к этим цитокинам



**Рис. 4.** Содержание мРНК генов системы TLR в гиппокампе мозга крыс при фармакологической коррекции азитромицином в условиях отмены этанола; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»



**Рис. 5.** Содержание мРНК цитокинов в гиппокампе мозга крыс при фармакологической коррекции азитромицином в условиях отмены этанола; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»

при других патологических состояниях, были получены сведения о способности АЗМ корректировать уровень содержания этих цитокинов [19–22]. В более ранней нашей работе мы также представили результаты наблюдений за экспрессией генов этих цитокинов на 7-е сутки отмены этанола, однако там были получены иные сведения о состоянии их экспрессии – было выявлено повышение уровня экспрессии гена *Ccl2*, а экспрессия гена *Il1β* была без значимых изменений [36]. Можно предполагать, что такие расхождения могут быть вызваны разными способами моделирования длительного воздействия этанола. Результаты

анализа данного эксперимента показали повышение уровня экспрессии гена *Il1β* и отсутствие значимых изменений в экспрессии гена *Ccl2* (рис. 5). Выполненное введение АЗМ позволило снизить повышенный уровень экспрессии гена *Il1β* при всех используемых нами дозировках (рис. 5).

**Уровень белка IL-1β при длительном воздействии этанола, отмене этанола и фармакологической коррекции азитромицином в гиппокампе мозга крыс.** Мы сосредоточили свое внимание на измерении уровня белка IL-1β в гиппокампе мозга крыс. Данный белок является ключевым провоспалительным цитокином – при развитии

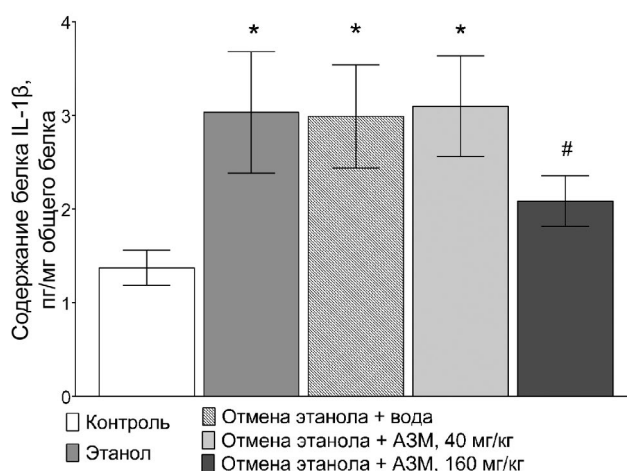


нейровоспаления уровень белка повышается в тканях мозга [1, 2, 13].

Роль белка IL-1 $\beta$ , опосредующего развитие дисфункций со стороны когнитивных и эмоциональных проявлений, исследуется при различных патологиях. Так, в эксперименте у мышей, подвергнутых психосоциальному стрессу, наблюдалось снижение социального взаимодействия и нарушение рабочей памяти, но эти изменения были предотвращены нокаутом *Il1r1* (ген белка-рецептора к IL-1), а вирусно-опосредованная селективная делеция *Il1r1* в нейронах гиппокампа также показала, что этот рецептор в гиппокампе имеет решающее значение для стресс-индуцированных поведенческих дисфункций. Кроме того, показано даже то, что вызванный стрессом транспорт моноцитов в мозг блокируется нокаутом *Il1r1* [44]. В другом исследовании использовали лентивирусную конструкцию для индуцирования гиперэкспрессии IL-1 $\beta$  в дорсальном гиппокампе крыс. Наблюдалось снижение нейрогенеза в гиппокампе наряду со снижением уровня ветвления нейритов на нейронах [45]. Имеются сведения, что провоспалительные цитокины подавляют долговременную потенцию в гиппокампе, тем самым внося изменения в ключевые механизмы формирования памяти. Используя синапсомы и культуры нейронов, исследователи выявили, что IL-1 $\beta$  напрямую подавляет пластичность гиппокампа через нейрон-специфические механизмы. В исследовании также сообщается, что IL-1 $\beta$  может подавлять долговременную потенцию непосредственно в синапсах у мышей [46]. Кроме того, известно, что нейроны гиппокампа экспрессируют высокие уровни IL-1R1 [46]. Эти данные указывают на вовлеченность цитокина в нарушение механизмов функционирования памяти. Имеется еще целый ряд исследований в подтверждение этих предположений, полученных на различных моделях в экспериментах на животных [46].

Результаты нашего исследования показали, что как в группе длительного воздействия этанола, так и в группе отмены этанола на 7-е сутки отмечаются повышенные уровни белка IL-1 $\beta$  (рис. 6). Таким образом, исходя из имеющихся сведений об IL-1 $\beta$ , можем делать выводы, что наблюдаемое нами повышение данного белка в гиппокампе (более чем в 2 раза) при длительном поступлении этанола в организм может быть причиной развития эмоциональных и когнитивных расстройств, а также проблем со стороны функционирования механизмов памяти.

Кроме того, в эксперименте нами были применены две дозировки азитромицина для проверки его эффективности в отношении коррекции содержания белка IL-1 $\beta$ . Использование азитро-



**Рис. 6.** Содержание белка IL-1 $\beta$  в гиппокампе мозга крыс; \*  $p < 0,05$  – по отношению к контрольной группе; #  $p < 0,05$  – по отношению к группе «отмена этанола + вода»

мицина в дозировке 40 мг/кг не оказало значимого эффекта, но в дозировке 160 мг/кг снизился уровень белка (почти до уровня контрольных значений), как по отношению к группе отмены этанола, так и по отношению к группе длительно алкоголизированных животных (рис. 6). При этом выполненный нами анализ на уровне мРНК показал эффективность при обеих использованных дозировках (40 мг/кг и 160 мг/кг) препарата (рис. 5). Таким образом, дозировка 40 мг/кг, которая достаточна для снижения уровня экспрессии гена *Il1 $\beta$* , является недостаточной для снижения уровня белкового продукта. Наблюдаемый эффект может быть опосредован влиянием азитромицина на механизмы созревания или деградации белка IL-1 $\beta$ . Белок IL-1 $\beta$  образуется в ходе протеолиза из своего предшественника про-IL-1 $\beta$ , и, несмотря на наблюдаемое нами снижение уровня продуктов транскрипции его гена в конкретный момент времени, повышенный уровень белка IL-1 $\beta$  может поддерживаться за счет его образования из молекул про-IL-1 $\beta$  в ходе посттрансляционных механизмов. Кроме того, известно, что механизмы деградации белка IL-1 $\beta$  также имеют сложный путь регуляции, которая опосредуется, в частности, белками матриксными металло-протеиназами [47, 48]. В будущем представляется интересным исследовать возможный вклад азитромицина в регуляцию путей, направленных на скорость деградации белка IL-1 $\beta$ . Можем предположить, что наблюдаемое сохранение повышенных уровней белка IL-1 $\beta$  при снижении уровня экспрессии его гена может быть объяснено активацией путей, ведущих к снижению скорости деградации белка. Имеются корреляционные данные в динамике, которые также свидетельствуют о наличии в расхождении со временем в уровнях

мРНК и белка IL-1 $\beta$  – при снижении уровня мРНК наблюдается тенденция к повышению уровня его белка [49].

Резюмируя полученные результаты по содержанию белка ключевого провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , мы наблюдаем наличие элементов нейровоспаления в гиппокампе мозга крыс при длительном воздействии этанола и при его отмене. Используемое нами соединение азитромицин, как и в работах других исследователей, при определенных дозировках обладает положительным эффектом в отношении снижения уровня нейровоспалительного медиатора IL-1 $\beta$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное нами моделирование длительного воздействия этанола умеренными дозами вызвало ряд изменений как в биохимических (повышение уровня АЛТ и альбуминов), клинических (повышение уровня моноцитов и снижение уровня лимфоцитов) параметрах крови, так и в системе нейровоспаления в гиппокампе мозга крыс. Мы анализировали уровень активности генов системы toll-подобных рецепторов, а также функционально связанные с этой системой молекулы микроРНК (miR-let-7b, miR-96, miR-155, miR-182) и цитокины. Длительная алкоголизация послужила причиной повышенных уровней мРНК и белка цитокина IL-1 $\beta$ , пониженных уровней мРНК *Tnfa*, *Il11*, *Tlr3* и *Tlr7*. На 7-е сутки отмены этанола сохраняется повышенный уровень мРНК и белка цитокина IL-1 $\beta$ , а также уровень мРНК *Hmgb1*. Уровень мРНК *Tlr3* при отмене этанола, напротив, был повышен. Выполненное пероральное введение азитромицина позволило скорректировать некоторые биохимические изменения, развивающиеся при отмене этанола – были снижены повышенные уровни мРНК *Il1 $\beta$* , *Tlr3* и *Hmgb1*, а при более высоких дозировках было достигнуто снижение повышенного уровня белка IL-1 $\beta$  в гиппокампе мозга крыс. Содержание miR-let-7b, miR-96, miR-155 было понижено в гиппокампе в результате длительной алкоголизации. Данные молекулы функционально связаны с TLR, и изменения в их

содержании могут отражать или опосредовать (что первично, на данный момент не установлено) дисфункции в молекулярных механизмах функционирования toll-подобных рецепторов.

Изучение биохимических изменений в гиппокампе головного мозга крыс при моделировании длительного воздействия этанола и состояния отмены представляет большой интерес по причине наличия у пациентов с алкогольной аддикцией нарушений в механизмах запоминания и в эмоциональном спектре. Гиппокамп в этих процессах играет, несомненно, значимую роль, а оценка биохимических изменений может позволить получить новые сведения, которые пополнят понимание патофизиологических механизмов, развивающихся в этой структуре мозга при длительном поступлении этанола в организм.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, С.А. Шамаева, Е.Р. Бычков – получение и анализ данных, подготовка и написание статьи; А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов – разработка общей концепции исследования, подготовка финальной версии статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» FGWG-2024-0015: «Нейробиологические механизмы патогенеза социально-значимых заболеваний и посттравматических расстройств. Новые подходы к моделированию патологических процессов и коррекции нарушений».

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций. Работа рассмотрена и одобрена Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ (заключение № 131-03-8 от 29.04.2024 г.).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crews, F. T., Lawrimore, C. J., Walter, T. J., and Coleman, L. G. Jr. (2017) The role of neuroimmune signaling in alcoholism, *Neuropharmacology*, **122**, 56-73, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.031>.
2. Airapetov, M., Eresko, S., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2021) The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism, *Biosci. Trends*, **15**, 74-82, <https://doi.org/10.5582/bst.2021.01041>.
3. Guerri, C., and Pascual, M. (2019) Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **77**, 89-98, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.006>.

4. Anand, S. K., Ahmad, M. H., Sahu, M. R., Subba, R., and Mondal, A. C. (2023) Detrimental effects of alcohol-induced inflammation on brain health: from neurogenesis to neurodegeneration, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **43**, 1885-1904, <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01308-2>.
5. Coleman, L. G., Zou, J., and Crews, F. T. (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 1-15, <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0799-4>.
6. Arts, N. J., Walvoort, S. J., and Kessels, R. P. (2017) Korsakoff's syndrome: a critical review, *Neuropsychi. Dis. Treat.*, **13**, 2875-2890, <https://doi.org/10.2147/NDT.S130078>.
7. Шабанов, П. Д. (1985) Экспериментальные нарушения памяти и их фармакологическая коррекция, *Вестн. АМН СССР*, **9**, 31-38.
8. Григоренко А. Я., Афанасьев В. В., Бабаханян Р. В. (2007) *Хроническая алкогольная интоксикация*, Издательство Р. Асланова «Юридический центр Пресс», СПб.
9. Корсаков С. С. (1887) *Об алкогольном параличе*, Диссертация, Москва.
10. Шабанов П. Д., Бородкин Ю. С. (1989) *Нарушения памяти и их коррекция*, Наука, Ленинград.
11. Цыганков Б. Д., Овсянников С. А. (2011) *Психиатрия*, ГЭОТАР-Медиа, Москва.
12. Crews, F. T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R. P., and Zou, J. (2013) HMGB1/TLR receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence, *Biol. Psychiatry*, **73**, 602-612, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.030>.
13. Crews, F. T., Walter, T. J., Coleman, L. G., and Vetreno, R. P. (2017) Toll-like receptor signaling and stages of addiction, *Psychopharmacology (Berl)*, **234**, 1483-1498, <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4560-6>.
14. Кокряков В. Н. (2006) *Очерки о врожденном иммунитете*, Наука, СПб.
15. Лебедев К. А., Понякина И. Д. (2017) *Иммунология образраспознающих рецепторов*, Ленанд, Москва.
16. Ноздрачев А. Д., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2000) Организация подкрепляющих систем мозга, *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*, **4**, 62-76.
17. Шабанов П. Д., Лебедев А. А. (2001) Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрхимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов, *Психофармакология и биологическая наркология*, **1**, 13-26.
18. Becker H. C. (2014) *Alcohol and the Nervous System*, Handbook of Clinical Neurology, Elsevier, Amsterdam.
19. Ramarao, S., Pang, Y., Carter, K., and Bhatt, A. (2022) Azithromycin protects oligodendrocyte progenitor cells against lipopolysaccharide-activated microglia-induced damage, *Dev. Neurosci.*, **44**, 1-12, <https://doi.org/10.1159/000519874>.
20. Lin, S. J., Kuo, M. L., Hsiao, H. S., and Lee, P. T. (2016) Azithromycin modulates immune response of human monocyte-derived dendritic cells and CD4<sup>+</sup> T cells, *Int. Immunopharmacol.*, **40**, 318-326, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.012>.
21. Barks, J. D. E., Liu, Y., Wang, L., Pai, M. P., and Silverstein, F. S. (2019) Repurposing azithromycin for neonatal neuroprotection, *Pediatr. Res.*, **86**, 444-451, <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0408-6>.
22. Kopper, T. J., and 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**, 508-509, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293146>.
23. McMahan, R. H., Najarro, K. M., Mullen, J. E., Paul, M. T., Orlicky, D. J., Hulsebus, H. J., and Kovacs, E. J. (2021) A novel murine model of multi-day moderate ethanol exposure reveals increased intestinal dysfunction and liver inflammation with age, *Immun. Ageing*, **18**, 37, <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00247-8>.
24. Coleman, L. G. Jr., Zou, J., Qin, L., and Crews, F. T. (2018) HMGB1/IL-1b complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism, *Brain Behav. Immun.*, **72**, 61-77, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.027>.
25. Tucker, A. E., Alicea Pauneto, C. D. M., Barnett, A. M., and Coleman, L. G. Jr. (2022) Chronic ethanol causes persistent increases in Alzheimer's tau pathology in female 3xTg-AD mice: a potential role for lysosomal impairment, *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 886634, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.886634>.
26. Paxinos G., and Watson C. (2017) *The Rat brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney.
27. Shi, R., Sun, Y. H., Zhang, X. H., Chiang, V. L. (2012) Poly(T) adaptor RT-PCR, *Methods Mol. Biol.*, **822**, 53-66, [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-427-8_4).
28. Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н. (1985) *Нейрхимия и фармакология алкоголизма*, Медицина, Москва.
29. Ветлугина Т. П., Прокопьева В. Д., Бохан Н. А. (2023) *Биологические основы адъювантной терапии алкоголизма*, Издательство Томского государственного университета, Томск.
30. Газатова Н. Д., Юрова К. А., Гаврилов Д. В., Литвинова Л. С. (2018) Алкоголь и иммунитет, *Гены Клетки*, **13**, 47-55.
31. Цыган В. Н., Акперов Э. К., Востриков В. В., Шабанов П. Д. (2007) Иммунные дисфункции у наркозависимых и способы их коррекции, *Обзоры Клин. Фармакол. Лек. Тер.*, **5**, 2-81.

32. Priyanka, S. H., Thushara, A. J., Rauf, A. A., and Indira, M. (2019) Alcohol induced NLRP3 inflammasome activation in the brain of rats is attenuated by ATRA supplementation, *Brain Behav. Immun. Health*, **2**, 100024, <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2019.100024>.
33. Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I., and Guerri, C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage, *J. Neurosci.*, **30**, 8285-8295, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>.
34. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. (2008) *Цитокины*, Фолиант, СПб.
35. Airapetov, M., Eresko, S., Ignatova, P., Lebedev, A., Bychkov, E., and Shabanov, P. (2022) A brief summary regarding the roles of interleukin-11 in neurological diseases, *Biosci. Trends*, **16**, 367-370, <https://doi.org/10.5582/bst.2022.01331>.
36. Airapetov, M. I., Eresko, S. O., Kochkin, D. V., Bychkov, E. R., Lebedev, A. A., and Shabanov, P. D. (2022) Ginsenosides affect the system of Toll-like receptors in the brain of rats under conditions of long-term alcohol withdrawal, *Biomed. Khim.*, **68**, 459-469, <https://doi.org/10.18097/PBMC20226806459>.
37. Airapetov, M., Eresko, S., Ignatova, P., Lebedev, A., Bychkov, E., and 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**, agae016, <https://doi.org/10.1093/alcac/aga016>.
38. 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, *Мед. Иммунол.*, **22**, 77-86, <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOT-1836>.
39. Lim, Y., Beane-Ebel, J. E., and Tanaka, Y. (2021) Exploration of alcohol use disorder-associated brain miRNA-mRNA regulatory networks, *Transl. Psychiatry*, **11**, 504, <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01635-w>.
40. Lehmann, S. M., Krüger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habbel, P., Kälin, R., Franzoni, E., Rybak, A., Nguyen, D., Veh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., Heppner, F. L., Golenbock, D., Schott, E., Ploegh, H. L., Wulczyn, F. G., and Lehnardt, S. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration, *Nat. Neurosci.*, **15**, 827-835, <https://doi.org/10.1038/nn.3113>.
41. Lippai, D., Bala, S., Csak, T., Kurt-Jones, E. A., and Szabo, G. (2013) Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice, *PLoS One*, **8**, e70945, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070945>.
42. Ureña-Peralta, J. R., Alfonso-Loeches, S., Cuesta-Díaz, C. M., García-García, F., and Guerri, C. (2018) Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex, *Sci. Rep.*, **8**, 15913, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34277-y>.
43. Ureña-Peralta, J. R., Pérez-Moraga, R., García-García, F., and Guerri, C. (2020) Lack of TLR4 modifies the miRNAs profile and attenuates inflammatory signaling pathways, *PLoS One*, **15**, 0237066, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237066>.
44. DiSabato, D. J., Nemeth, D. P., Liu, X., Witcher, K. G., O'Neil, S. M., Oliver, B., Bray, C. E., Sheridan, J. F., Godbout, J. P., and Quan, N. (2021) Interleukin-1 receptor on hippocampal neurons drives social withdrawal and cognitive deficits after chronic social stress, *Mol. Psychiatry*, **26**, 4770-4782, <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0788-3>.
45. Pawley, L. C., Hueston, C. M., O'Leary, J. D., Kozareva, D. A., Cryan, J. F., O'Leary, O. F., and Nolan, Y. M. (2020) Chronic intrahippocampal interleukin-1b overexpression in adolescence impairs hippocampal neurogenesis but not neurogenesis-associated cognition, *Brain Behav. Immun.*, **83**, 172-179, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.007>.
46. Prieto, G. A., Tong, L., Smith, E. D., and Cotman, C. W. (2019) TNF $\alpha$  and IL-1b but not IL-18 suppresses hippocampal long-term potentiation directly at the synapse, *Neurochem. Res.*, **44**, 49-60, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2517-8>.
47. Vijayaraj, S. L., Feltham, R., Rashidi, M., Frank, D., Liu, Z., Simpson, D. S., Ebert, G., Vince, A., Herold, M. J., Kueh, A., Pearson, J. S., Dagley, L. F., Murphy, J. M., Webb, A. I., Lawlor, K. E., and Vince, J. E. (2021) The ubiquitylation of IL-1b limits its cleavage by caspase-1 and targets it for proteasomal degradation, *Nat. Commun.*, **12**, 2713, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22979-3>.
48. Tong, Z., Yang, X., and Li, J. (2022) Research progress on the mechanism of interleukin-1b on epiphyseal plate chondrocytes, *Eur. J. Med. Res.*, **27**, 313, <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00893-8>.
49. Kalb, D. M., Adikari, S. H., Hong-Geller, E., and Werner, J. H. (2019) Single-cell correlations of mRNA and protein content in a human monocytic cell line after LPS stimulation, *PLoS One*, **14**, e0215602, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215602>.

## STUDY OF NEUROINFLAMMATION IN THE RAT HIPPOCAMPUS DURING ETHANOL EXPOSURE AND PHARMACOLOGIC CORRECTION WITH AZITHROMYCIN: NEW DATA AND FUTURE PERSPECTIVES

M. I. Airapetov<sup>1,2\*</sup>, S. O. Eresko<sup>1,3</sup>, S. A. Shamaeva<sup>1</sup>, E. R. Bychkov<sup>1</sup>,  
A. A. Lebedev<sup>1</sup>, and P. D. Shabanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine,  
197376 St. Petersburg, Russia; e-mail: interleukin1b@gmail.com

<sup>2</sup> Military medical academy of S.M. Kirov, 194044 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Saint-Petersburg National Research University  
of Information Technologies, Mechanics and Optics, 197022 St. Petersburg, Russia

With prolonged ethanol ingestion, disturbances in the emotional spectrum develop, and memory problems are noted. These symptoms may be mediated by the development of neurochemical changes in the hippocampus of the brain. Although there is evidence that the hippocampus is vulnerable to chronic alcohol intoxication and the development of neuroinflammation and neurodegeneration in this brain region, the key molecular mechanisms have not been identified. The aim of the study was to investigate changes in the immune system in the periphery as well as in the hippocampus of the rat brain during ethanol exposure and during pharmacological correction with azithromycin (AZM). Long-term ethanol exposure was modeled by injecting rats with a 20% ethanol solution (4 g/kg) for 4 weeks. General biochemical and clinical blood analysis was performed in animals. The expression levels of cytokine genes (*Il1β*, *Ccl2*, *Il6*, *Il11*, *Il13*, *Tnfa*, *Tgfβ*) and toll-like receptor system genes (*Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7*, *Nfkb1*, *Hmgb1*) and TLR system-related microRNA molecules (miR-182, miR-155-5p, miR-96-5p, miR-let-7b) were evaluated in the hippocampus. IL-1β protein content was also assessed in the hippocampus. Prolonged alcoholization caused an increase in mRNA and protein levels of IL-1β, and a decrease in mRNA levels of *Tnfa*, *Il11*, *Tlr3*, and *Tlr7*. The contents of miR-let-7b, miR-96, and miR-155 were downregulated in the hippocampus during long-term alcoholization. Elevated *Il1β* mRNA and protein levels and *Hmgb1* mRNA levels were maintained under conditions of ethanol withdrawal. *Tlr3* mRNA levels were decreased under withdrawal. Administration of AZM reduced IL-1β, TLR3 and HMGB1 mRNA levels under conditions of ethanol withdrawal, and at higher doses of the drug, a decrease in IL-1β protein levels in the hippocampus of rat brain was observed. Thus, the study provided new insights into the mechanisms of neuroinflammation in the brain hippocampus during prolonged exposure to ethanol and upon withdrawal. The results obtained allowed us to outline a number of tasks for further studies in this direction.

**Keywords:** ethanol, hippocampus, toll-like receptors, cytokines, IL-1β, microRNAs, azithromycin