

НЕЙРОИММУННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЖИВОТНЫХ С ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

© 2024 И.Ю. Шамакина^{1*}, П.К. Анохин^{1,2}, Р.А. Агельдинов³, В.С. Кохан¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России,
119002 Москва, Россия; электронная почта: shamakina.i@serbsky.ru

² Институт Искусственного Интеллекта (AIRI), 121170 Москва, Россия

³ Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России, 143442 пос. Светлые горы, Россия

Поступила в редакцию 28.05.2024

После доработки 22.07.2024

Принята к публикации 29.07.2024

Факторы нейровоспаления могут быть важными регуляторами функций мозга в норме и патологии, в том числе при отставленных нарушениях, связанных с пренатальным действием алкоголя – когнитивной дисфункции, аффективных расстройствах и аддиктивном поведении потомства в подростковом и взрослом возрасте. В данной работе мы использовали экспериментальную модель пренатальной алкоголизации (потребление 10%-ного раствора этанола самкой крыс Wistar на всём протяжении беременности), мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ содержания интерлейкинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9 и IL-12), фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и хемокина CCL5, а также количественную ПЦР в режиме реального времени для оценки уровня мРНК цитокинов в префронтальной коре половозрелого (PND60) потомства – самцов и самок крыс с пренатальной алкогольной интоксикацией и контрольных животных. Установлено достоверное снижение содержания TNF- α и интерлейкинов IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9 в префронтальной коре самцов, но не самок, перенесших пренатальную алкоголизацию. У пренатально алкоголизированных самцов показано снижение уровня мРНК TNF- α в префронтальной коре на 45% по сравнению с самцами контрольной группы, что может лежать в основе обнаруженного снижения его содержания. Полученные данные и, прежде всего, значимость фактора пола необходимо учитывать при проведении дальнейших трансляционных исследований механизмов нарушений фетального алкогольного спектра и разработке средств их профилактики и терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пренатальная алкогольная интоксикация, нейровоспаление, префронтальная кора, интерлейкины, фактор некроза опухоли, экспрессия мРНК.

DOI: 10.31857/S0320972524110062 EDN: IKSBEQ

ВВЕДЕНИЕ

Употребление женщиной алкоголя во время беременности приводит к развитию у потомства целого ряда физиологических, психических, поведенческих и интеллектуальных нарушений, обозначенных единым термином «нарушения фетального алкогольного спектра» (Fetal alcohol spectrum disorder, FASD) [1]. Согласно усреднённым эпидемиологическим данным последних лет, 10% женщин употребляли алкоголь во время беременности [2, 3], а частота встречаемости

FASD у детей в разных регионах мира варьирует от 3 до 31% [4–6]. Выраженность нарушений, возникающих в результате пренатального воздействия этанола (пренатальная алкоголизация, ПА), зависит от дозы, продолжительности и частоты употребления алкоголя в течение беременности, а также от особенностей материнского метаболизма [7]. Наиболее тяжёлая форма – фетальный алкогольный синдром – проявляется у детей в раннем постнатальном периоде в дефектах развития лицевого отдела, замедлении роста, нарушениях функций центральной нервной системы (ЦНС) [7].

Принятые сокращения: ПА – пренатальная алкоголизация; TNF- α – фактор некроза опухоли- α .

* Адресат для корреспонденции.

Вместе с тем наиболее многочисленная группа нарушений не связана с краниоцефальной дисморфией или отставанием в росте и развитии, а проявляется в виде поведенческих и когнитивных нарушений, а также высокого риска злоупотребления психоактивными веществами в подростковом и взрослом возрасте [8]. Манифестация симптомов этих нарушений обычно связана с началом обучения в школе, стрессом, проблемами социального взаимодействия [9].

Многочисленными исследованиями показано, что центральное место в механизмах зависимости принадлежит процессам нейроадаптации в мезокортиколимбической дофаминовой (DA) системе мозга, которая берёт начало в вентральной покрывке среднего мозга (VTA) и проецируется на лимбические структуры, включая прилежащее ядро (NAc), миндалевидное тело, гиппокамп и префронтальную кору [10]. Вместе с тем дофамин помимо нейротрансмиттерной функции обладает способностью к активации дофаминовых рецепторов, локализованных на астроцитах, микроглиальных клетках в ЦНС и клетках периферической иммунной системы [11, 12]. Показано, что дофамин модулирует уровень активности микроглиальных клеток [13–15], и, наоборот, цитокины играют важную роль в регуляции функций дофаминовой системы мозга [16]. Можно предположить, что одним из механизмов нарушений дофамин-зависимого поведения у ПА животных является изменение функционального состояния микроглиальных клеток и экспрессии факторов нейровоспаления. Целью данной работы было сравнительное изучение экспрессии факторов нейровоспаления в префронтальной коре ПА и интактных (контрольных) животных. Префронтальная кора считается одной из наиболее сложных функциональных структур мозга млекопитающих, основная роль которой состоит в интеграции и интерпретации входных данных от корковых и подкорковых структур и обеспечении целенаправленных поведенческих реакций, в том числе ориентированных как на получение вознаграждения, так и на подавление поведения риска [17]. Учитывая, что баланс про- и противовоспалительных цитокинов критически важен для обеспечения нейронных функций [18], мы предположили, что изменения в этом балансе у животных, перенесших ПА, могут быть одним из факторов нарушения поведения. Мы провели одновременное измерение содержания шести ключевых белков-цитокинов семейства интерлейкинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9 и IL-2), фактора некроза опухоли- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) и хемокина CCL5 в префронтальной коре половозрелых (PND60) самцов и самок крыс с ПА интоксикацией и контрольных животных. IL-1 пред-

ставляют собой провоспалительные цитокины с широко распространённым влиянием на функции нервной системы в норме [19]. Цитокины семейства IL-1 состоят из двух основных родственных членов семейства (IL-1 α , IL-1 β), которые демонстрируют клеточно-специфические паттерны экспрессии и высвобождения и синтезируются как глиями, так и нейронами. Традиционно считавшиеся провоспалительными такие цитокины, как интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-2 и TNF- α , играют важную роль в развитии мозга [20]. Показано, что нарушение функций IL-6 в мозге ассоциировано с аномалией формы, длины и характера распределения дендритных отростков [21]. TNF- α является ключевым медиатором, влияющим на синаптическое ремоделирование, процессы долговременной потенциации (LTP) и долговременной депрессии (LTD) в мозге [22, 23]. Помимо того, что IL-2 является ключевым цитокином в иммунной регуляции, он может играть роль в развитии и регуляции нейронов головного мозга, участвующих в пространственном обучении и памяти. Показано, что у нокаутных по IL-2 мышей нарушено пространственное обучение, что сопровождалось уменьшением длины гиппокампальных мшистых волокон [24].

IL-3, IL-9 и CCL5, согласно данным литературы, могут обладать нейропротективным действием [25–27]. Было показано, что IL-3 широко экспрессируется в ЦНС и оказывает трофическое действие на холинергические нейроны прозрачной перегородки (Septum pellucidum) *in vitro* и *in vivo* [25], однако механизмы, лежащие в основе нейротрофического действия IL-3, до конца не выяснены. IL-9 и его рецептор также активно экспрессируются в нервных клетках и специфически контролируют программируемую клеточную гибель нейронов неокортекса новорожденных мышей [26]. Авторы предполагают, что сигнальный путь IL-9/IL-9R представляет собой эндогенный антиапоптотический механизм для корковых нейронов [26]. Хемокин CCL5 и его рецепторы выполняют в ЦНС множество функций, включая нейромодуляцию синаптической активности и защиту от нейротоксинов [27]. Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК CCL5 обнаружен в олигодендроцитах, астроцитах и микроглии коры головного мозга, хвостатого ядра/скорлупы, гиппокампа и таламуса [27]. Интересно, что в среднем мозге мРНК CCL5 обнаруживается в тирозин-гидроксилаза (TH)-положительных клетках вентральной покрывки, указывая на то, что CCL5 экспрессируется субпопуляцией дофаминергических нейронов мезолимбической системы [27]. Предполагают, что этот хемокин может участвовать в обеспечении взаимодействия нейронов и клеток глии [27].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились на аутбредных крысах Wistar обоих полов (питомник лабораторных животных «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Животных содержали в условиях естественной освещённости при температуре 22 ± 2 °C и свободном доступе к пище и воде.

Модель пренатальной алкоголизации. Для получения потомства двух половозрелых самок (PND60) крыс подсаживали к самцу на 3 суток. Общее количество самцов – 10, самок – 20. Срок беременности фиксировали, определяя наличие сперматозоидов в вагинальном мазке самки. Самки, спаривавшиеся с одним самцом, случайным образом были поделены на две группы: самки опытной группы на протяжении всей беременности (с 1-го по 21-й дни) получали 10%-ный раствор этанола в качестве единственного источника жидкости, контрольные самки во время беременности содержались в условиях водного режима. Потребление алкоголя самками измеряли ежедневно на всём протяжении беременности. В данной серии среднесуточное потребление алкоголя самками составило $13,6 \pm 2,1$ г/кг. Объём потребляемой жидкости в опытной группе – $31,0 \pm 4,2$ мл, в контрольной группе – $35,1 \pm 2,7$ мл. Достоверных различий в среднесуточных объёмах потребляемой жидкости выявлено не было. Масса самок контрольной и опытной групп достоверно не отличалась в начале ($210,0 \pm 23,8$ г и $207,0 \pm 15,7$ г соответственно) и в конце эксперимента ($325,0 \pm 28,4$ г и $331,0 \pm 32,1$ г соответственно). После рождения детёнышей на период вскармливания все самки переводились на водный режим. Таким образом, полученное потомство было алкоголизировано только в пренатальном периоде, соответствующем 1–2 триместрам беременности у человека [28]. На 30-й день жизни детёнышей отделяли от матери, разделяли по половому признаку и в дальнейшем содержали по 6 крысят в одной клетке (тип T/4B) при свободном доступе к пище и воде.

Для биохимических и молекулярно-биологических исследований случайным образом было отобрано 18 ПА крыс (группа «Алс», 9 самцов и 9 самок) и 18 контрольных (группа «К», 9 самцов и 9 самок) крыс. В возрасте 60 дней (PND60) крыс декапитировали, префронтальную кору выделили на уровне от 4,2 мм до 2,8 мм относительно Брегмы, согласно атласу мозга крыс Paxinos and Watson [29]. Выделенные образцы ткани замораживали и хранили при -70 °C.

Выделение белка для иммунофлуоресцентного анализа. Пробы гомогенизировали с исполь-

зованием стеклянных шариков на гомогенизаторе MagNA Lyser 230B («Roche», Швейцария) в буферном растворе: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,05%-ного (v/v) Tween-20 и 1%-ного (v/v) коктейля ингибиторов протеаз II (ab201116, «Abcam», США). Гомогенаты центрифугировали 15 мин при $12\,000\,g$ и 3 °C и отбирали супернатант для дальнейшего анализа. Содержание белка определяли методом Бредфорда с использованием коммерчески доступного набора Quick Start Bradford Protein Assay («Bio-Rad», США).

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

Выделение тотальной РНК проводили стандартным гуанидин-изотиоционатным методом с использованием фенол-хлороформной экстракции (PureZOL RNA Isolation Reagent, «Bio-Rad»). Образцы ткани гомогенизировали в 1 мл лизирующего буфера, к гомогенату добавляли 200 мкл хлороформа («Fluka», США) и центрифугировали в течение 15 мин при 4 °C и $12\,000\,g$ (Eppendorf 5804R, «Eppendorf», Германия). К супернатанту добавляли равный объём изопропанола, инкубировали при -20 °C (2 ч), центрифугировали при $6\,000\,g$ 5 мин, осадок промывали 70%-ным EtOH, высушивали и растворяли в воде (RNAase-free). Аликвоты РНК замораживали и хранили при -70 °C. Количество выделенной тотальной РНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf BioPhotometer, «Eppendorf»). Полученную РНК обрабатывали ДНКазой («Thermo Fisher Scientific», США), в соответствии с инструкцией производителя. кДНК синтезировали с использованием набора Mint revertase («Евроген», Россия) и использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР.

ПЦР в режиме реального времени. Для подбора праймеров использовали онлайн-ресурс Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Были использованы следующие последовательности олигонуклеотидных праймеров («ДНК-синтез», Россия):

TNF- α (прямой 5'-AAATGGGCTCCTCTCATCAGGTTTC-3', обратный 5'-TCTGCTTGTTGGTTTGTACGAC-3');
IL-1 β (прямой 5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3',

Таблица 1. Содержание цитокинов в префронтальной коре пренатально алкоголизированных и контрольных животных

| Группа | Содержание цитокинов в префронтальной коре (пг/мг общего белка) среднее арифметическое \pm SD | | | | | | | |
|-----------------|--|----------------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | IL-1 α | IL-1 β | IL-2 | IL-3 | IL-6 | IL-9 | TNF- α | CCL5 |
| М_К (n = 9) | 58 \pm 21,2 | 9,1 \pm 2 | 175,1 \pm 27,5 | 3,4 \pm 1 | 3,4 \pm 1 | 3,3 \pm 1,1 | 38,5 \pm 19,9 | 58,6 \pm 23 |
| М_ПА (n = 9) | 36,5 \pm 16 | 6,4 \pm 2,7* p = 0,01 | 135 \pm 57,9 | 2,1 \pm 0,8 p = 0,009 | 1,9 \pm 1,09 p = 0,002 | 1,9 \pm 0,9 p = 0,005 | 21,4 \pm 8,7* p = 0,03 | 36 \pm 6,4 |
| F_К (n = 9) | 45,9 \pm 27,2 | 5,9 \pm 2## p = 0,005 | 138,6 \pm 64,8 | 1,8 \pm 0,4## p = 0,003 | 2 \pm 0,7## p = 0,003 | 1,7 \pm 0,4## p = 0,002 | 26,8 \pm 16,7 | 45,8 \pm 20 |
| F_ПА (n = 9) | 57,9 \pm 41,9 | 5,9 \pm 2 | 116,4 \pm 26,6 | 2,5 \pm 1,3 | 1,4 \pm 0,9 | 2,5 \pm 1,2 | 21,7 \pm 12 | 55,4 \pm 33,4 |

Примечание. М_К – самцы, контрольная группа; М_ПА – самцы, пренатальная алкоголизация; F_К – самки, контрольная группа; F_ПА – самки, пренатальная алкоголизация.

* p < 0,05 (М_ПА относительно М_К); ## p < 0,01 (F_К относительно М_К); апостериорный тест Дункана.

обратный 5'-GGGTTCATGGTGAAGTCAAC-3');
β-актин (прямой 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCT-3',
обратный 5'-AACCGCTCATGCGGATAGTG-3').

Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ и 5 мкл реакционной смеси 5X qPCRmix-HS SYBR с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген») на амплификаторе CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler («Bio-Rad») в следующем режиме: исходная денатурация матрицы – 3 мин при 95 °C; денатурация – 95 °C, 15 с; отжиг праймеров – 60 °C, 15 с; элонгация – 72 °C, 30 с. Реакцию проводили в течение 40 циклов с последующим анализом кривых плавления полученных ПЦР-продуктов. Для нормализации данных использовали β-актин в качестве референсного гена. Показатели Ct β-актина между экспериментальной и контрольной группой достоверно не различались (20,2 \pm 2,0 и 19,7 \pm 3,3 соответственно). Количественную оценку относительного уровня экспрессии мРНК проводили методом 2^{-ΔΔCt} [30].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica v.12 («StatSoft Inc.», США). Проверка нормальности распределения данных в выборке осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как все данные подчинялись Гауссову распределению, использовали параметрический метод анализа – двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), факторы: пол \times ПА. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение (SD). Post hoc обработка проводилась при наличии достоверных различий между группами. Достоверными считались различия при уровне значимости p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание цитокинов в префронтальной коре. Процессинг данных о содержании цитокинов/хемокинов, суммированных в табл. 1, показал: значимое влияние фактора ПА ($F_{1,32} = 4,9$; p = 0,03) на TNF- α , фактора пола ($F_{1,32} = 6,7$; p = 0,01) на IL-1 β , взаимодействие факторов ПА \times пол при анализе IL-3 ($F_{1,32} = 10$; p = 0,003), фактора ПА ($F_{1,32} = 12,8$; p = 0,001) и фактора пола ($F_{1,32} = 9,9$; p = 0,004) на IL-6, взаимодействие факторов ПА \times пол ($F_{1,32} = 13$; p = 0,001) при анализе IL-9 и взаимодействие факторов ПА \times пол ($F_{1,32} = 4,5$; p = 0,04) при анализе CCL5. Важно отметить, что наиболее высокие показатели концентрации в префронтальной коре отмечаются для интерлейкинов IL-2 и IL-1 α и хемокина CCL5.

Результаты мультиплексного анализа показали достоверные различия содержания ряда интерлейкинов в префронтальной коре мозга между самцами и самками контрольной группы: у самок (группа F_К) было снижено содержание интерлейкинов IL-1 β (p < 0,01), IL-3 (p < 0,001), IL-6 (p < 0,01) и IL-9 (p < 0,001) по сравнению с самцами (группа М_К) (табл. 1). Примечательно, что ПА не повлияла на уровень цитокинов у самок, также не было обнаружено значимых различий между полами групп ПА животных.

В префронтальной коре ПА самцов наблюдалось значимое снижение IL-1 β – на 29%, IL-3 – на 38%, IL-6 – на 45%, IL-9 – на 42%, а также TNF- α – на 45% по сравнению с контрольной группой самцов. Следует отметить, что несмотря на обнаружение в ходе дисперсионного анализа значимого отличия между группами в отношении содержания хемокина CCL5, результаты апостериорного

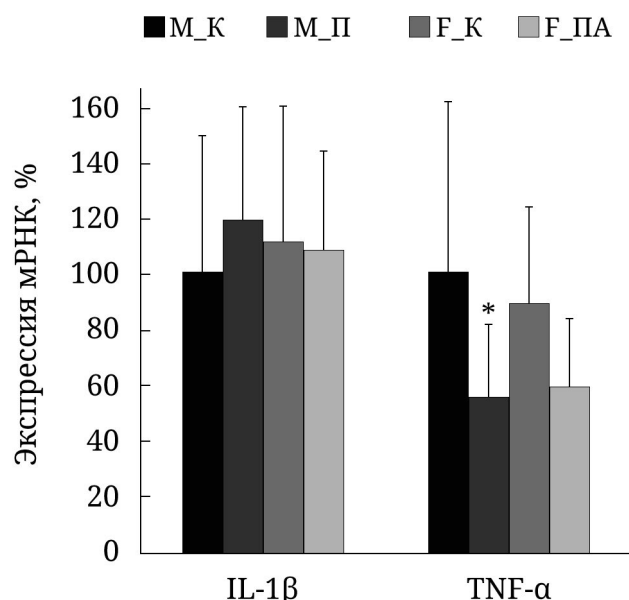


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии мРНК IL-1β и TNF-α в префронтальной коре контрольных и пренатально алкоголизированных самок и самцов крыс. M_K – самцы, контрольная группа; M_П – самцы, пренатальная алкоголизация; F_K – самки, контрольная группа; F_П – самки, пренатальная алкоголизация. * $p < 0,05$ (M_П относительно M_K, апостериорный тест Дункана)

анализа были неоднозначны: было обнаружено снижение у ПА самцов на 39% ($p = 0,06$, тест Дункана; тенденция) по сравнению с самцами контрольной группы (табл. 1).

Для выяснения возможных причин снижения содержания TNF-α и IL-1β в префронтальной коре ПА самцов было проведено параллельное изучение экспрессии мРНК TNF-α и IL-1β.

Экспрессия мРНК TNF-α и IL-1β в префронтальной коре пренатально алкоголизированных и контрольных животных. При изучении уровня мРНК TNF-α в префронтальной коре обнаружено влияние ПА-фактора ($F_{1,32} = 8,2$, $p = 0,007$). Статистически значимые различия выявлены между ПА самцами и контрольной группой самцов (рис. 1). У ПА самцов выявлено снижение уровня мРНК TNF-α в префронтальной коре на 45% ($p = 0,03$) по сравнению с самцами контрольной группы, что может лежать в основе обнаруженного нами снижения содержания самого TNF-α. Достоверных различий в экспрессии мРНК IL-1β между группами не обнаружено (рис. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что пренатальная алкогольная интоксикация является значимым фактором риска аддиктивного поведения в будущем, причём в потомстве F1 увеличение

добровольного потребления алкоголя и более высокий уровень тревожности на фоне отмены его потребления были обнаружены у самцов, но не у самок-потомков по сравнению с соответствующими контрольными группами [31].

В настоящем исследовании было также выявлено зависимое от пола отставленное действие ПА на содержание цитокинов в префронтальной коре взрослых животных. Мы получили достаточно неожиданные результаты – снижение содержания TNF-α в префронтальной коре взрослых ПА самцов крыс. Эти данные согласуются с представлениями некоторых авторов [32] о подавлении, а не об активации алкоголем экспрессии TNF-α в мозге. Традиционно TNF-α считают провоспалительным цитокином, однако несмотря на многочисленные сообщения о роли TNF-α как патогенетического фактора целого ряда заболеваний мозга, появляется всё больше данных о его нейропротекторных функциях, направленных на уменьшение продукции оксида азота и свободных радикалов, изменение нейротрансмиссии возбуждающих аминокислот, поддержание нейронального гомеостаза кальция и индукцию синтеза нейротрофических факторов [33]. Передача сигнала в клетках, на которые действует TNF-α, происходит после его связывания с двумя рецепторами: TNFR1 и TNFR2 [34], активации факторов транскрипции NF-κB и AP-1, которые опосредуют выживаемость и пролиферацию клеток [34]. NF-κB является фактором транскрипции для большого числа генов, кодирующих провоспалительные цитокины, хемокины и их рецепторы. При этом TNFR1, в отличие от TNFR2, содержит так называемый «домен смерти» («death domain») в своей цитоплазматической части, поэтому его связывание с TNF-α может приводить к индукции клеточной гибели [34]. TNFR1 представлен почти на всех типах клеток, тогда как экспрессия TNFR2 характерна для нейронов и олигодендроцитов [34]. Долгое время считалось, что TNFR2 выполняет второстепенную роль в гомеостазе, однако недавно было показано, что регуляторные эффекты TNF-α связаны с передачей сигнала именно через TNFR2 [35].

Поскольку обнаруженный нами эффект ПА является отставленным во времени, в его основе могут лежать долговременные эпигенетические модификации, что косвенно подтверждается снижением экспрессии мРНК TNF-α. Линии мышей с нокаутом гена *Tnf* (C57BL/6-TNF^{-/-} и C57BL/6-TNF^{+/-}) представляются перспективной моделью для изучения влияния дефицита TNF на поведение и функции ЦНС в норме и патологии. Результаты, полученные в настоящее время при изучении мышей с нокаутом гена *Tnf*, свидетельствуют об участии TNF в регуляции тревожного поведения

и функциональной активности дофаминовой системы мозга [36].

Согласно данным литературы цитокин IL-1 β экспрессируется в мозге как микроглиальными клетками, так и нейронами и участвует в механизмах поддержания целостности и функционирования гематоэнцефалического барьера [37]. Показано, что IL-1 β может регулировать функции ГАМК-ергических синапсов префронтальной коры посредством двух различных путей: противовоспалительного (механизм «выживания» PI3K/Akt) или провоспалительного (MyD88/p38 MAPK), причём в отсутствии алкоголя наблюдается смещение в сторону сигнального пути PI3K/Akt, способствующего выживанию [38]. Кроме того, исследования на грызунах с нокаутом гена IL-1 β выявили целый ряд нарушений поведения и аффективного состояния у этих животных [39, 40].

Снижение содержания IL-3, IL-6 и IL-9 в префронтальной коре самцов с ПА может быть связано с ослаблением нейропротекторных свойств микроглии. В исследовании на людях и мышах было показано, что уровень экспрессии IL-3 играет ключевую роль в размножении и поддержании пула прогениторных нейрональных клеток и количества выживших нейронов [41]. Было показано, что IL-3 играет защитную роль против A β -индуцированной гибели клеток, и что эта защита реализуется посредством активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/протеинкиназы B (Akt) и Янус-киназы 2 (Jak2) [42]. Исследования клеток *in vitro* показали, что IL-9 индуцирует активацию транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT1, STAT3 и STAT5 и снижает экспрессию маркеров активации макрофагов, таких как CD45, CD14, CD68 и CD11b, стимулированных липополисахаридом и гамма-интерфероном [43]. Таким образом, IL-9 может управлять экспрессией других цитокинов и хемокинов, а сам в ряде случаев проявлять противовоспалительные и антиапоптотические свойства [44, 45].

Показано, что IL-6 участвует в нейрогенезе (влияя как на нейроны, так и на глиальные клетки), а также в регуляции активности зрелых нейронов и глиальных клеток в норме и патологии [46]. Во многих отношениях IL-6 ведёт себя подобно нейротрофину, что, по-видимому, объясняет, почему семейство цитокинов, к которому он принадлежит, известно как нейропоэтины. В опытах на культуре нейронов было показано, что IL-6 способствует выживанию холинергических нейронов переднего мозга и перегородки, а также мезэнцефалических катехоламинергических нейронов, ганглиозных клеток сетчатки, симпатических нейронов и ганглиев дорсальных корешков [47, 48]. Изучение нокаутных мышей

IL-6 КО показывает вовлечённость IL-6 в регуляцию ноцицепции, терморегуляции, эмоциональной реактивности, обучения и памяти [49, 50].

Таким образом, в работе показано, что в префронтальной коре ПА животных снижено содержание как провоспалительных цитокинов, так и цитокинов, обладающих нейропротекторным действием, причём этот эффект зависит от пола и обнаруживается только у половозрелых самцов. Вместе с тем важно учитывать, что нейровоспаление представляет собой сложный динамический процесс, характеризующийся изменением числа астроцитов и клеток микроглии, активацией про- и противовоспалительных цитокинов, морфологическими изменениями клеток, точечной миграцией, изменением уровня экспрессии целого ряда генов [51]. Поэтому для изучения динамики изменений экспрессии цитокинов на уровне мРНК и белка, их роли в общей картине нарушений, связанных с пренатальным эффектом алкоголя, а также биологических основ влияния фактора пола на эффекты ПА требуются дальнейшие исследования.

Ограничения исследования. Используемая модель «полупринудительной» алкоголизации самок во время беременности имеет свои ограничения в качестве трансляционной модели при интерпретации данных. В частности, при использовании модели необходимо тщательно контролировать объём потребляемой жидкости в опытной и контрольной группах животных. Кроме того, в данном исследовании не проводилась оценка калорийности рациона у пьющих алкоголь и контрольных самок. Ограничением также является возраст потомства. Возможно, установленные биохимические изменения характерны для позднего подросткового и взрослого, но не для препубертатного периода, исследованного в работах других авторов [52].

Вклад авторов. Шамакина И.Ю. – концепция, руководство работой, написание текста; Кохан В.С. – проведение экспериментов, статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи; Анохин П.К. – проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, статистическая обработка; Агельдинов Р.А. – проведение экспериментов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы государственного задания «Изучение патогенетических механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ с использованием генетических, биохимических, иммунологических, нейрофизиологических и нейрокогнитивных подходов» (рег. № НИОКТР АААА-А18-118032390130-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Исследования проводились с соблюдением международных рекомендаций для медико-биологических исследований с использованием животных, требований Европейской конвенции о защите животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г. с приложением от 15.06.2006), правил Совета Европейского сообщества (Директива 86/609/ЕЕС от 14.11.2005 г. и Директива 2010/63/EU от 22.09.2010 г.), а также

Принципов надлежащей лабораторной практики (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ Р 53434-2009). Соблюдены все положения, в том числе использование минимального количества животных, которое требуется для получения научно достоверных результатов. Протокол эксперимента соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных и одобрен этическими комитетами ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Министерства здравоохранения РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dejong, K., Olyaei, A., and Lo, J. O. (2019) Alcohol use in pregnancy, *Clin. Obstet. Gynecol.*, **62**, 142-155, <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000414>.
2. Jacobson, S. W., Hoyme, H. E., Carter, R. C., Dodge, N. C., Molteno, C. D., Meintjes, E. M., and Jacobson, J. L. (2021) Evolution of the physical phenotype of fetal alcohol spectrum disorders from childhood through adolescence, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **45**, 395-408, <https://doi.org/10.1111/acer.14534>.
3. Voutilainen, T., Rysä, J., Keski-Nisula, L., and Kärkkäinen, O. (2022) Self-reported alcohol consumption of pregnant women and their partners correlates both before and during pregnancy: A cohort study with 21,472 singleton pregnancies, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**, 797-808, <https://doi.org/10.1111/acer.14806>.
4. Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., and Rehm, J. (2017) Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob. Health*, **5**, e290-e299, [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9).
5. McQuire, C., Mukherjee, R., Hurt, L., Higgins, A., Greene, G., Farewell, D., Kemp, A., and Paranjothy, S. (2019) Screening prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in a region of the United Kingdom: A population-based birth-cohort study, *Prev. Med.*, **118**, 344-351, <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2018.10.013>.
6. May, P. A., de Vries, M. M., Marais, A. S., Kalberg, W. O., Buckley, D., Hasken, J. M., Abdul-Rahman, O., Robinson, L. K., Manning, M. A., Seedat, S., Parry, C. D. H., and Hoyme, H. E. (2022) The prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in rural communities in South Africa: A third regional sample of child characteristics and maternal risk factors, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **46**, 1819-1836, <https://doi.org/10.1111/acer.14922>.
7. Astley, S. J., Bailey, D., Talbot, C., and Clarren, S. K. (2000) Fetal alcohol syndrome (FAS) primary prevention through fas diagnosis: II. A comprehensive profile of 80 birth mothers of children with FAS, *Alcohol Alcohol.*, **35**, 509-519, <https://doi.org/10.1093/alcac/35.5.509>.
8. Popova, S., Charness, M. E., Burd, L., Crawford, A., Hoyme, H. E., Mukherjee, R. A. S., Riley, E. P., and Elliott, E. J. (2023) Fetal alcohol spectrum disorders, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **9**, 11, <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00420-x>.
9. Kautz-Turnbull, C., Rockhold, M., Handley, E. D., Olson, H. C., and Petrenko, C. (2023) Adverse childhood experiences in children with fetal alcohol spectrum disorders and their effects on behavior, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **47**, 577-588, <https://doi.org/10.1111/acer.15010>.
10. Nutt, D. J., Lingford-Hughes, A., Erritzoe, D., and Stokes, P. R. (2015) The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows, *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 305-312, <https://doi.org/10.1038/nrn3939>.
11. Arreola, R., Alvarez-Herrera, S., Pérez-Sánchez, G., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Flores-Gutierrez, E. O., Garcés-Alvarez, M. E., de la Cruz-Aguilera, D. L., Medina-Rivero, E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabián, S., and Pavón, L. (2016) Immunomodulatory effects mediated by dopamine, *J. Immunol. Res.*, **2016**, 3160486, <https://doi.org/10.1155/2016/3160486>.
12. Mladinov, M., Mayer, D., Brčić, L., Wolstencroft, E., Man, N., Holt, I., Hof, P. R., Morris, G. E., and Šimic, G. (2010) Astrocyte expression of D2-like dopamine receptors in the prefrontal cortex, *Transl. Neurosci.*, **1**, 238-243, <https://doi.org/10.2478/v10134-010-0035-6>.
13. Albertini, G., Etienne, F., and Roumier, A. (2020) Regulation of microglia by neuromodulators: modulations in major and minor modes, *Neurosci. Lett.*, **733**, 135000, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135000>.
14. Feng, Y., and Lu, Y. (2021) Immunomodulatory effects of dopamine in inflammatory diseases, *Front. Immunol.*, **12**, 663102, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663102>.

15. Iliopoulou, S. M., Tsartsalis, S., Kaiser, S., Millet, P., and Tournier, B. B. (2021) Dopamine and neuroinflammation in schizophrenia – interpreting the findings from translocator protein (18 kDa) PET imaging, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **17**, 3345-3357, <https://doi.org/10.2147/NDT.S334027>.
16. Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., and Felger, J. C. (2013) Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits, *Depress. Anxiety*, **30**, 297-306, <https://doi.org/10.1002/da.22084>.
17. Abernathy, K., Chandler, L. J., and Woodward, J. J. (2010) Alcohol and the prefrontal cortex, *Int. Rev. Neurobiol.*, **91**, 289-320, [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)91009-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(10)91009-X).
18. Yamato, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Kume, S., Miyashige, Y., Nakano, M., Watanabe, Y., and Kataoka, Y. (2014) Brain interleukin-1 β and the intrinsic receptor antagonist control peripheral Toll-like receptor 3-mediated suppression of spontaneous activity in rats, *PLoS One*, **9**, e90950, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090950>.
19. Lynch, M. A. (2002) Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions, *Vitam. Horm.*, **64**, 185-219, [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(02\)64006-3](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(02)64006-3).
20. Deverman, B. E., and Patterson, P. H. (2009) Cytokines and CNS development, *Neuron*, **64**, 61-78, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>.
21. Wei, H., Chadman, K. K., McCloskey, D. P., Sheikh, A. M., Malik, M., Brown, W. T., and Li, X. (2012) Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 831-842, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.01.011>.
22. Kondo, S., Kohsaka, S., and Okabe, S. (2011) Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo, *Mol. Brain*, **4**, 27, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-27>.
23. Joseph, A. T., Bhardwaj, S. K., and Srivastava, L. K. (2018) Role of prefrontal cortex anti- and pro-inflammatory cytokines in the development of abnormal behaviors induced by disconnection of the ventral hippocampus in neonate rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **12**, 244, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00244>.
24. Petitto, J. M., Meola, D., and Huang, Z. (2012) Interleukin-2 and the brain: dissecting central versus peripheral contributions using unique mouse models, *Methods Mol. Biol.*, **934**, 301-311, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-071-7_15.
25. Kamegai, M., Nijima, K., Kunishita, T., Nishizawa, M., Ogawa, M., Araki, M., Ueki, A., Konishi, Y., and Tabira, T. (1990) Interleukin-3 as a trophic factor for central cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*, *Neuron*, **2**, 429-436.
26. Fontaine, R. H., Cases, O., Lelièvre, V., Mesplès, B., Renaud, J. C., Loron, G., Degos, V., Dournaud, P., Baud, O., Gressens, P. (2008) IL-9/IL-9 receptor signaling selectively protects cortical neurons against developmental apoptosis, *Cell Death Differ.*, **15**, 1542-1552, <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.79>.
27. Lanfranco, M. F., Mocchetti, I., Burns, M. P., and Villapol, S. (2018) Glial- and neuronal-specific expression of CCL5 mRNA in the rat brain, *Front. Neuroanat.*, **11**, 137, <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00137>.
28. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., and Noble-Haeusslein, L. J. (2013) Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, *Prog. Neurobiol.*, **106-107**, 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
29. Paxinos, G., and Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn., New York, NY, Academic Press.
30. Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
31. Анохин П. К., Проскурякова Т. В., Шоханова В. А., Кохан В. С., Тарабарко И. Е., Шамакина И. Ю. (2023) Половые различия в аддиктивном поведении взрослых крыс: эффекты пренатальной алкоголизации, *Биомедицина*, **19**, 27-36, <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-2-27-36>.
32. Doremus-Fitzwater, T. L., Youngentob, S. L., Youngentob, L., Gano, A., Vore, A. S., and Deak, T. (2020) Lingering effects of prenatal alcohol exposure on basal and ethanol-evoked expression of inflammatory-related genes in the CNS of adolescent and adult rats, *Front. Behav. Neurosci.*, **14**, 82, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00082>.
33. Figiel, I. (2008) Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, **68**, 526-534, <https://doi.org/10.55782/ane-2008-1720>.
34. Gough, P., and Myles, I. A. (2020) Tumor necrosis factor receptors: pleiotropic signaling complexes and their differential effects, *Front. Immunol.*, **11**, 585880, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585880>.
35. Papazian, I., Tsoukal, A. E., Boutou, A., Karamita, M., Kambas, K., Iliopoulou, L., Fischer, R., Kontermann, R. E., Denis, M. C., Kollias, G., Lassmann, H., and Probert, L. (2021) Fundamentally different roles of neuronal TNF receptors in CNS pathology: TNFR1 and IKK β promote microglial responses and tissue injury in demyelination while TNFR2 protects against excitotoxicity in mice, *J. Neuroinflammation*, **18**, 222, <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02200-4>.
36. Базовкина Д. В., Фурсенко Д. В., Першина А. В., Хоцкин Н. В., Баженова Е. Ю., Куликов А. В. (2018) Влияние нокаута гена фактора некроза опухоли на поведение и дофаминовую систему мозга у мышей, *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, **7**, 745-756.

37. Versele, R., Sevin, E., Gosselet, F., Fenart, L., and Candela, P. (2022) TNF- α and IL-1 β modulate blood-brain barrier permeability and decrease amyloid- β peptide efflux in a human blood-brain barrier model, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10235, <https://doi.org/10.3390/ijms231810235>.
38. Varodayan, F. P., Pahng, A. R., Davis, T. D., Gandhi, P., Bajo, M., Steinman, M. Q., Kiosses, W. B., Blednov, Y. A., Burkart, M. D., Edwards, S., Roberts, A. J., and Roberto, M. (2023) Chronic ethanol induces a pro-inflammatory switch in interleukin-1 β regulation of GABAergic signaling in the medial prefrontal cortex of male mice, *Brain Behav. Immun.*, **110**, 125-139, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.02.020>.
39. Koo, J. W., and Duman, R. S. (2009) Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory, *Neurosci. Lett.*, **456**, 39-43, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.068>.
40. Jones, M., Lebonville, C., Barrus, D., and Lysle, D. T. (2015) The role of brain interleukin-1 in stress-enhanced fear learning, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1289-1296, <https://doi.org/10.1038/npp.2014.317>.
41. Gan, L., and Su, B. (2012) The interleukin 3 gene (IL3) contributes to human brain volume variation by regulating proliferation and survival of neural progenitors, *PLoS One*, **7**, e50375, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050375>.
42. Zambrano, A., Otth, C., Mujica, L., Concha, I. I., and Maccioni, R. B. (2007) Interleukin-3 prevents neuronal death induced by amyloid peptide, *BMC Neurosci.*, **8**, 82, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-82>.
43. Donninelli, G., Saraf-Sinik, I., Mazzotti, V., Capone, A., Grasso, M. G., Battistini, L., Reynolds, R., Magliozzi, R., and Volpe, E. (2020) Interleukin-9 regulates macrophage activation in the progressive multiple sclerosis brain, *J. Neuroinflammation*, **17**, 149, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01770-z>.
44. Meng, H., Niu, R., You, H., Wang, L., Feng, R., Huang, C., and Li, J. (2022) Interleukin-9 attenuates inflammatory response and hepatocyte apoptosis in alcoholic liver injury, *Life Sci.*, **288**, 120180, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120180>.
45. Singhera, G. K., MacRedmond, R., and Dorscheid, D. R. (2008) Interleukin-9 and -13 inhibit spontaneous and corticosteroid induced apoptosis of normal airway epithelial cells, *Exp. Lung Res.*, **34**, 579-598.
46. Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 1254-1266, <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
47. Hama, T., Kushima, Y., Miyamoto, M., Kubota, M., Takei, N., and Hatanaka, H. (1991) Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures, *Neuroscience*, **40**, 445-452, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90132-8).
48. Mendonça Torres, P. M., and de Araujo, E. G. (2001) Interleukin-6 increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*, *J. Neuroimmunol.*, **117**, 43-50, [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00303-4).
49. Butterweck, V., Prinz, S., and Schwaninger, M. (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice, *Behav. Brain Res.*, **144**, 49-56, [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00059-7](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00059-7).
50. Balschun, D., Wetzell, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., and Besedovsky, H. O. (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget, *FASEB J.*, **18**, 1788-1790, <https://doi.org/10.1096/fj.04-1625fje>.
51. Mukherjee, S., Tarale, P., Sarkar, D. K. (2023) Neuroimmune interactions in fetal alcohol spectrum disorders: potential therapeutic targets and intervention strategies, *Cells*, **21**, 2323, <https://doi.org/10.3390/cells12182323>.
52. Айрапетов М. И., Ереско С. О., Бычков Е. Р., Лебедев А. А., Шабанов П. Д. (2021) Пренатальное воздействие алкоголя изменяет TLR4-опосредованную сигнализацию в префронтальной коре головного мозга у крыс, *Биомедицинская химия*, **67**, 500-506, <https://doi.org/10.18097/PBMC20216706500>.

NEUROIMMUNE CHARACTERISTICS OF ANIMALS WITH PRENATAL ALCOHOL INTOXICATION

I. Yu. Shamakina^{1*}, P. K. Anokhin^{1,2}, R. A. Ageldinov³, and V. S. Kokhan¹

¹ Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology,
Russian Ministry of Health of the Russian Federation,
119002 Moscow, Russia; e-mail: shamakina.i@serbsky.ru

² Artificial Intelligence Research Institute, 121170 Moscow, Russia

³ Scientific Center for Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia,
143442 Svetlye Gory, Russia

Neuroinflammation can be an important factor of many central nervous system (CNS) deficits including cognitive dysfunction, affective disorders and addictive behavior associated with prenatal alcohol

exposure and presented in early adulthood. In this study we used an experimental rodent model of prenatal alcohol (PA) exposure (consumption of a 10% ethanol solution by female Wistar rats throughout pregnancy), multiplex immunofluorescence analysis of interleukins (IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9 and IL-12), tumor necrosis factor (TNF- α) and chemokine CCL5, as well as quantitative real-time PCR to assess the level of cytokine mRNA in the prefrontal cortex of sexually mature (PND60) offspring – male and female rats with prenatal alcohol intoxication and control animals. A significant decrease in the content of TNF- α and interleukins IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-9 was established in the prefrontal cortex of male, but not female PA offspring. Importantly, PA males also showed a decrease in the level of TNF- α mRNA in the prefrontal cortex by 45% compared to the control males, which may underlie a detected decrease in its content. Taken together, our study demonstrates that a number of neuro-immune factors are regulated in a sex-specific manner in the prefrontal cortex and are differentially affected in males and females by prenatal exposure to alcohol. Sex factor must be taken into account when conducting further translational fetal alcohol spectrum disorders and developing new methods for prevention and therapy.

Keywords: prenatal alcohol intoxication, neuroinflammation, prefrontal cortex, interleukins, tumor necrosis factor, mRNA expression