

ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК MIR-9-3P И MIR-132-3P В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОРФИНА

^{1,2}Леваневская В.А., ¹Конончук В.В., ¹Сорокина Н.С., ¹Валембахов И.С.,
¹Старостина М.В.

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,
Новосибирск, e-mail: v.levanevskaya@g.nsu.ru;

²Новосибирский национальный исследовательский университет, Новосибирск

Целью работы являлось изучение экспрессии микроРНК miR-9-3p и miR-132-3p в гиппокампе мышей линии C57BL/6 в норме и при хронической зависимости от морфина. Гиппокампы животных разделяли на отделы в соответствии с асимметрией и латерализацией этой структуры – левый дорзальный и вентральный и правый дорзальный и вентральный, в каждом из которых определяли экспрессию указанных микроРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени, используя в качестве референсной малую ядрышковую РНК U68. Показано, что у контрольной группы мышей экспрессия miR-9-3p и miR-132-3p достоверно не отличается в отделах гиппокампа, то есть отсутствуют оба вида асимметрии. У животных с хронической зависимостью от морфина обнаружены статистически значимое снижение экспрессии miR-9-3p в трех отделах гиппокампа и тенденция к снижению в левом вентральном отделе. Изменения более выражены в дорзальных отделах, то есть присутствует дорзовентральная асимметрия экспрессии miR-9-3p. Высказано предположение о том, что снижение экспрессии miR-9-3p может являться одним из механизмов нарушения синаптической пластичности гиппокампа при хронической опиоидной зависимости. Изменений в экспрессии miR-132-3p выявлено не было.

Ключевые слова: морфин, гиппокамп, микроРНК, асимметрия гиппокампа.

Исследование проведено в рамках темы ФИЦ ФТМ 122032300163-9.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

EXPRESSION OF MIR-9-3P AND MIR-132-3P MICRORNAS IN THE HIPPOCAMPUS OF C57BL/6 MICE IN NORMAL CONDITIONS AND WITH CHRONIC MORPHINE ADDICTION

^{1,2} Levanevskaya V.A., ¹ Kononchuk V.V., ¹ Sorokina N.S., ¹ Valembakhov I.S.,
¹ Starostina M.V.

¹ Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk,
e-mail: v.levanevskaya@g.nsu.ru;

² Novosibirsk National Research University, Novosibirsk

The purpose of the work was to study the expression of miR-9-3p and miR-132-3p microRNAs in the hippocampus of C57BL/6 mice in normal conditions and with chronic morphine dependence. The animal hippocampi were divided into sections according to the asymmetry and lateralization of this structure – left dorsal and ventral and right dorsal and ventral. In each of them, the expression of the indicated microRNAs was determined by real-time RT-PCR, using small nucleolar RNA U68 as a reference. It was shown that in the control group of mice, the expression of miR-9-3p and miR-132-3p did not differ significantly in the hippocampal regions, i.e. both types of asymmetry were absent. In animals with chronic morphine dependence, a statistically significant decrease in miR-9-3p expression was found in three hippocampal regions and a tendency to decrease in the left ventral region. The changes were more pronounced in the dorsal regions, i.e. there was dorsoventral asymmetry of miR-9-3p expression. It was suggested that a decrease in miR-9-3p expression may be one of the mechanisms of impaired synaptic plasticity of the hippocampus in chronic opioid dependence. No changes in miR-132-3p expression were detected.

Keywords: morphine, microRNA, hippocampus, hippocampal asymmetry.

The study was conducted within the framework of the FRC FTM topic 122032300163-9.

The work was carried out using the equipment of the Proteomic Analysis Collective Use Center, supported by funding from the Ministry of Education and Science of Russia (agreement No. 075-15-2021-691).

Введение

Несмотря на многолетние исследования наркотической зависимости, многие клеточно-молекулярные механизмы ее формирования остаются неизвестными, что существенно ограничивает возможности разработки средств для лечения наркомании. В последние годы появилось большое количество работ по изучению участия в развитии зависимости эпигенетических механизмов, таких как посттрансляционные модификации гистонов, метилирование ДНК, изменения экспрессии некодирующих РНК, и на основании полученных данных были предложены новые подходы к терапии зависимости от наркотиков [1, 2]. К некодирующим РНК относятся и молекулы микроРНК, размер которых в зрелом состоянии составляет 18–22 нуклеотида и которые обладают широким спектром действия, регулируя активность генов на уровне трансляции. В развивающейся нервной системе микроРНК участвуют в пролиферации и дифференцировке клеток, в миграции нейроblastов и формировании связей, в зрелой нервной ткани – в поддержании ее нормальной функциональной активности, в частности синаптической пластичности [3]. Активно изучается роль микроРНК в обучении и формировании долговременной памяти [4].

В представленной работе для анализа экспрессии были выбраны две микроРНК – miR-9-3p и miR-132-3p. Обе микроРНК высококонсервативны, ортологичны соответствующим микроРНК человека, обладают высоким уровнем экспрессии в нервной ткани и участвуют в регуляции синаптической пластичности [5, 6].

Для хронической зависимости у человека и животных характерно снижение когнитивных способностей с нарушением обучения и памяти, что обусловлено модификацией синаптической пластичности и реорганизацией нейронных систем в связанных с зависимостью структурах мозга [7]. Гиппокамп – структура мозга, непосредственно вовлеченная в обучение и память. Экспериментально доказано, что при опиоидной зависимости нарушается синаптическая пластичность гиппокампа [8]. Если в самых ранних исследованиях гиппокамп рассматривали как однородную структуру, то впоследствии была обнаружена асимметрия гиппокампа вдоль дорзовентральной оси, при этом дорзальный гиппокамп сильнее связан с оценкой новизны информации, пространственной и оперативной памятью, а вентральный – с эмоциональными компонентами памяти [9]. Кроме этого, появились данные о функциональных и клеточно-молекулярных различиях левого и правого гиппокампов [10]. Поэтому в данной работе анализировали изменения экспрессии микроРНК при разделении гиппокампа на отделы – правый вентральный и дорзальный (RV и RD) и левый вентральный и дорзальный (LV и LD).

Цель исследования

Изучение влияния хронического употребления морфина на уровень экспрессии микроРНК miR-9-3p и miR-132-3p в отделах гиппокампа мышей линии C57Bl/6.

Материалы и методы исследования

Работу проводили на самцах мышей инбредной линии C57Bl/6 в возрасте 1,5 месяца, весом 24–26 г, полученных из вивария НИИНМ. Животных содержали при световом режиме 12/12 ч день/ночь при температуре 21–22°C на стандартном рационе кормления со свободным доступом к воде и пище.

Все процедуры проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, протокол эксперимента был утвержден Комитетом по биомедицинской этике НИИМББ ФИЦ ФТМ.

Животных с хронической зависимостью от морфина получали в соответствии с протоколами, описанными ранее [11, 12].

Кратко:

Мышей разделяли на две группы: опытную (1) и контрольную (2), по 6 мышей в каждой. В течение 5 дней дважды в сутки (в 9.00 и в 18.00) животным группы 1 делали инъекции морфина гидрохлорида (10 мг/кг веса) (ФГУП «Московский эндокринный завод»), а мышам группы 2 вводили физиологический раствор в том же объеме. На 6-е сутки, в 9.00 мышам делали последнюю инъекцию, через 2 часа производили эвтаназию животных методом цервикальной дислокации, затем от каждого животного брали по 4 образца гиппокампа в соответствии с двумя типами асимметрии (LV, LD, RV, RD). Образцы помещали в пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70°C. Затем в образцах определяли уровень экспрессии miR-9-3p и miR-132-3p методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК производили термоиндуцированным лизисом с помощью лизирующего раствора на основе гуанидина тиоцианата (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3%-ный саркозил, 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол, 25 мМ ацетата натрия).

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием коммерческого набора RT-MuLV-RN (БиолабМикс, Россия) и «stem-loop» праймеров, которые подбирали на основе последовательности зрелых исследуемых микроРНК и референсной РНК U68. Использовали следующие последовательности праймеров:

1. U68

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCATCAGAT - 3'

2. miR-9-3p

5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTTTTCG - 3'

3. miR-132-3p

5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGACCAT - 3'

Полученную комплементарную ДНК (кДНК) использовали для определения уровней экспрессии miR-9-3p и miR-132-3p методом ПЦР в режиме реального времени с использованием реакционной смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) («БиолабМикс») на системе детекции CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, США). Малую ядрышковую РНК U68 использовали для нормализации данных. Каждую реакцию ПЦР проводили с использованием 0,3 мкл кДНК в конечном объеме 25 мкл при следующих условиях: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов: денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг при 60°C в течение 20 с, элонгация и обработка данных флуоресценции при 72°C в течение 30 с. Специфичность ПЦР контролировали кривыми плавления. Относительные уровни экспрессии микроРНК оценивали, используя значения порогового цикла (Ct) с учетом эффективности реакции (E) для исследуемого гена и гена нормировки.

Для ПЦР использовали специфические олигонуклеотиды со следующими последовательностями праймеров:

1. U68

- прямой праймер 5'- GGGCTGTA CTGACTTGATGAAAG - 3'
- обратный праймер 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'

2. miR-9-3p

- прямой праймер 5'- TGCCAGATAAAGCTAGATAAC - 3'
- обратный праймер 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'

3. miR-132-3p

- прямой праймер 5'- GCCGTAACAGTCTACAGCC - 3'
- обратный праймер 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'

Для статистической обработки результатов и их графической интерпретации использовали программу OriginPro 9.

Оценку достоверности различий средних значений параметров проводили с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия между группами считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде арифметического среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). При нормировке результатов за единицу принимали образцы контрольной группы для каждого из отделов гиппокампа.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате поставленного эксперимента от мышей двух групп, в каждой из которой было по 6 животных, было получено 12 образцов гиппокампа. При извлечении гиппокамп подразделяли на 4 части в соответствии с двумя типами асимметрии: LD – левый дорзальный,

LV – левый вентральный, RD – правый дорзальный, RV – правый вентральный. Таким образом, общее число образцов гиппокампа для последующего молекулярного анализа составило 24 образца.

У мышей группы 1, которым вводили физиологический раствор, не обнаружено различий в уровнях экспрессии как miR-9-3p, так и miR-132-3p между отделами гиппокампа, то есть отсутствовала асимметрия. Полученные данные представлены на рисунке 1.

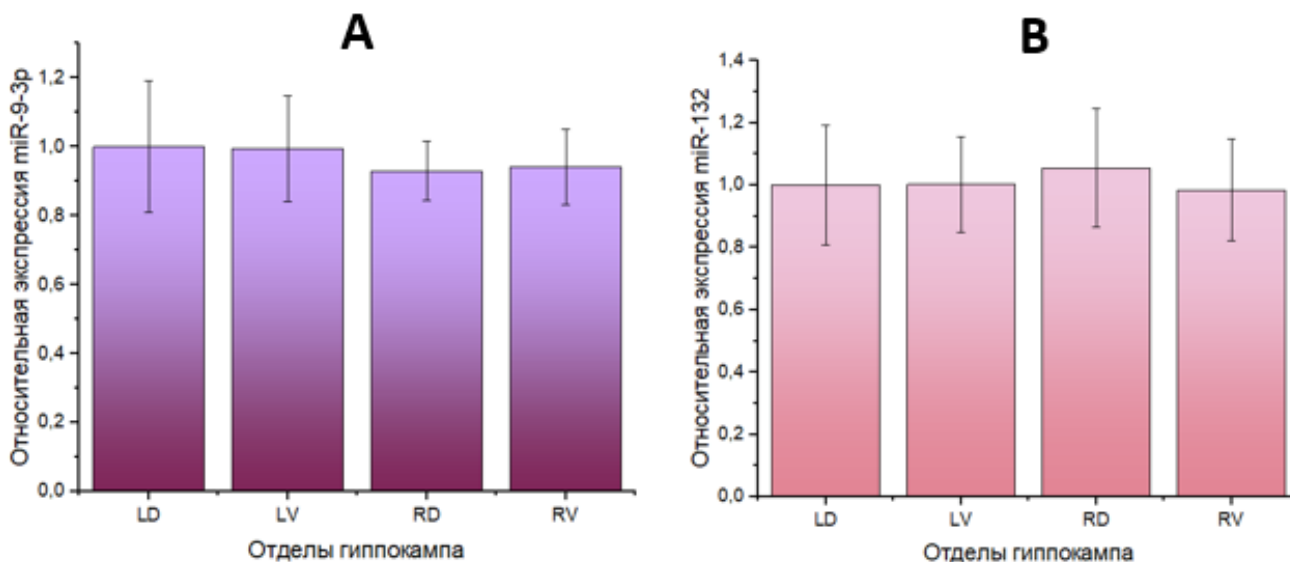


Рис. 1. Уровень экспрессии микроРНК в гиппокампе контрольных мышей: А – miR-9-3p, В – miR-132-3p. Отделы гиппокампа: LD – левый дорзальный, LV – левый вентральный, RD – правый дорзальный, RV – правый вентральный. За единицу по оси ординат приняты значения образцов LD

У мышей группы 2 со сформированной хронической зависимостью от морфина показано статистически значимое снижение экспрессии miR-9-3p во всех отделах гиппокампа, за исключением левого вентрального, однако нужно отметить, что в этом отделе тоже присутствует тенденция к снижению экспрессии (рис. 2А).

Выявлена асимметрия по дорзовентральной оси, поскольку снижение экспрессии miR-9-3p более выражено в дорзальных отделах гиппокампа.

Не обнаружено статистически достоверных различий в изменении экспрессии miR-9-3p между правым и левым гиппокампами.

Для miR-132-3p в тех же условиях не было установлено каких-либо статистически значимых изменений в уровне экспрессии (рис. 2В).

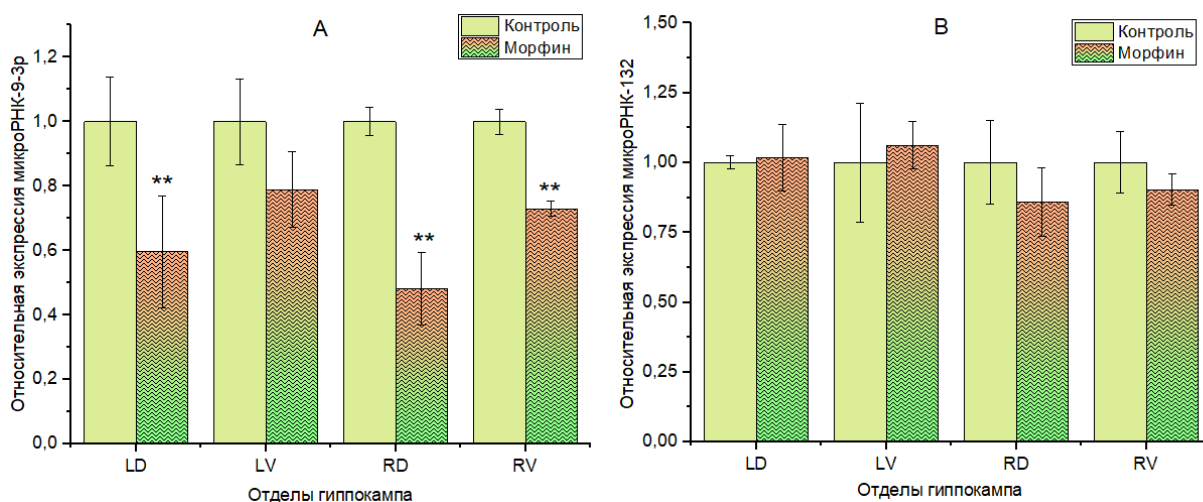


Рис. 2. Относительная экспрессия *miR-9-3p* (A) и *miR-132-3p* (B) в гиппокампе мышей линии C57Bl/6 при хронической зависимости от морфина.

** $p < 0,01$. Отделы гиппокампа: LD – левый дорзальный, LV – левый вентральный, RD – правый дорзальный, RV – правый вентральный. В каждом из отделов гиппокампа за единицу приняты образцы контрольной группы

Выбор микроРНК *miR-9-3p* и *miR-132-3p* для анализа их экспрессии в гиппокампе был обусловлен тем, что обе они вовлечены в ряд важных процессов на уровне нервной системы. Так, *miR-9-3p* в гиппокампе контролирует направление роста дендритов, участвует в ветвлении аксонов при формировании нейронных сетей [5] и принимает участие в регуляции синаптической пластичности [13]. Показана роль *miR-132-3p* в процессах дифференцировки и миграции нейробластов, в регуляции созревания дендритов и аксонов [14]; так же как и *miR-9-3p*, *miR-132-3p* участвует в регуляции синаптической пластичности [6]. Развитие хронической зависимости от морфина приводит к достоверному снижению экспрессии *miR-9-3p* в дорзальных отделах левого и правого гиппокампа, а также в правом вентральном отделе, при этом в левом вентральном отделе имеется выраженная тенденция к снижению экспрессии. В исследовании S.E. Sim и соавторов в 2016 г. [13] было показано, что ингибирование экспрессии *miR-9-3p* приводило к нарушению формирования долговременной потенции в области CA1 дорзального гиппокампа без влияния на базовые параметры синаптической передачи, при этом повышалась активность генов *Dmd* и *SAP97*, отрицательно коррелирующих с возможностью развития долговременной потенции: у мышей со сниженной экспрессией *Dmd* наблюдалась фасилитация долговременной потенции, в то время как при гиперэкспрессии гена *SAP97* развитие долговременной потенции нарушалось. При этом было отмечено, что подавление экспрессии *miR-9-3p* у животных приводило к ухудшению памяти и способности к обучению. Это позволяет предположить, что

обнаруженное снижение экспрессии микроРНК-9-3p при длительном воздействии морфина является одним из механизмов нарушения синаптической пластичности гиппокампа и снижения когнитивных способностей и памяти при формировании хронической опиоидной зависимости.

Если у мышей группы 1 не выявлено асимметрии в экспрессии miR-9-3p, то у животных с хронической зависимостью от морфина обнаружена дорзовентральная асимметрия, что может свидетельствовать о более глубоких нарушениях пластичности в дорзальном гиппокампе, связанном с рабочей и оперативной памятью. В то же время отсутствуют достоверные различия в уровнях экспрессии miR-9-3p между отделами правого и левого гиппокампа. Это может объясняться тем, что miR-9-3p не участвует в регуляции генов, активность которых связана с латерализацией функций этой структуры мозга. В качестве примера можно привести ген, кодирующий N2B-субъединицу (ϵ -субъединицу) рецептора глутамата NMDA-типа (рецептор, агонистом которого является N-метил-D-аспартат), экспрессия которого начинается еще в раннем эмбриогенезе и с неравномерным распределением которых связывают этот вариант асимметрии в гиппокампе мышей [15]. В этой же работе было показано, что подавление экспрессии miR-9-3p не влияет на функционирование NMDA-рецепторов.

В представленной работе не было выявлено статистически значимых изменений в уровне экспрессии miR-132-3p у мышей с хронической зависимостью от морфина (рис. 2B), хотя в экспериментах М. Jia и соавторов, проведенных в 2022 г., было обнаружено увеличение экспрессии miR-132-3p в зубчатой фасции у крыс с хронической зависимостью от морфина, за счет чего изменялись показатели структурной нейропластичности [16]. Возможно, что отличия в результатах объясняются разными протоколами получения животных с хронической зависимостью, разным временем забора материала для анализа и, наконец, тем, что экспрессию микроРНК в исследовании [16] изучали только в образцах дорзальной зубчатой фасции, а не в целом дорзальном отделе гиппокампа.

В работах, посвященных изучению участия miR-132-3p в синаптической пластичности, указывается на то, что изменения экспрессии этой микроРНК являются транзиторными и быстро возвращаются к исходному состоянию, а полученные различными методами длительная гиперэкспрессия или, наоборот, подавление экспрессии miR-132-3p приводят к нарушению синаптической пластичности [6, 14]. Поэтому для выяснения вовлеченности miR-132-3p в развитие хронической опиоидной зависимости и вызванное опиоидами нарушение синаптической пластичности необходимы дальнейшие исследования.

Заключение

Таким образом, показано, что у контрольной группы мышей C57BL/6 уровень экспрессии miR-9-3p и miR-132-3p статистически значимо не отличается между отделами гиппокампа, то есть отсутствует дорзовентральная и межполушарная асимметрия. У животных с хронической зависимостью от морфина обнаружено достоверное снижение экспрессии miR-9-3p в трех отделах гиппокампа, за исключением левого вентрального, где все же имеется тенденция к снижению экспрессии. Выявлена дорзовентральная асимметрия экспрессии miR-9-3p в гиппокампе хронически от морфина зависимых мышей. Поскольку miR-9-3p участвует в регуляции синаптической пластичности, высказано предположение о том, что снижение экспрессии этой микроРНК при длительном воздействии морфина может являться одним из механизмов нарушения синаптической пластичности при хронической опиоидной зависимости. Изменений экспрессии miR-132-3p в отделах гиппокампа мышей с хронической зависимостью от морфина не было выявлено, вопрос об участии этой микроРНК в механизмах развития зависимости от опиоидов требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Browne C.J., Godino A., Salery M., Nestler E.J. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction // *Biol Psychiatry*. 2020. Vol. 87. Is. 1. P. 22–33. DOI: 10.1016/j.biopsych.2019.06.027.
2. Kojiam A.S., Singh K.D., Nameirakpam B.S., Haobam R., Rajashekar Y. Drug addiction and treatment: An epigenetic perspective // *Biomed Pharmacother*. 2024. Vol. 170. P. 115951. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115951.
3. Parkins E.V., Gross C. Small Differences and Big Changes: The Many Variables of MicroRNA Expression and Function in the Brain // *J. Neurosci*. 2024. Vol. 44. Is. 32. P. e0365242024. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0365-24.2024.
4. Гринкевич Л.Н. Роль микроРНК в обучении и долговременной памяти // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020. Т. 24. № 8. DOI: 10.18699/VJ20.687.
5. Dajas-Bailador F., Bonev B., Garcez P., Stanley P., Guillemot F., Papalopulu N. MicroRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons // *Nature neuroscience*. 2012. Vol. 15. Is. 5. P. 697. DOI: 10.1038/nn.3082.
6. Joilin G., Guévremont D., Ryan B., Claudianos C., Cristino A.S., Abraham W.C., Williams J.M. Rapid regulation of microRNA following induction of long-term potentiation in vivo // *Front Mol Neurosci*. 2014. Vol. 7. P. 98. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00098.
7. Gasparyan A., Maldonado Sanchez D., Navarrete F., Sion A., Navarro D., García-Gutiérrez M.S., Rubio Valladolid, G., Jurado Barba R., Manzanares J. Cognitive Alterations in Addictive

Disorders: A Translational Approach // Biomedicines. 2023. Vol. 7. P. 1796. DOI: 10.3390/biomedicines11071796.

8. Pu L., Bao G-B., Xu N-J., Ma L., Pei G. Hippocampal Long-Term Potentiation Is Reduced by Chronic Opiate Treatment and Can Be Restored by Re-Exposure to Opiates // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. Is.5. P. 1914-1921. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-05-01914.2002.

9. Gunnarsdóttir B., Zerbi V., Kelly C. Multimodal gradient mapping of rodent hippocampus // NeuroImage. 2022. Vol. 253. P. 119082. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2022.119082.

10. Kohl M.M., Shipton O.A., Deacon R.M., Rawlins J.N.P., Deisseroth K., Paulsen O. Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity // Nature neuroscience. 2011. Vol. 14. Is. 11. P. 1413-1415. DOI: 10.1038/nn.2915.

11. Mamiya T., Noda Y., Ren X., Hamdy M., Furukawa S., Kameyama T., Yamada K., Nabeshima T. Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor // Br. J. Pharmacol. 2001. Vol. 132. Is. 5. P. 1111-1117. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703912.

12. Сорокина Н.С., Береговой Н.А., Старостина М.В. Влияние миелопептидов на развитие синдрома отмены у мышей с хронической зависимостью от морфина // Наркология. 2023. Т. 22. № 6. С. 62-66. DOI: 10.25557/1682-8313.2023.06.62-66.

13. Sim S.E., Lim C.S., Kim J.I., Seo D., Chun H., Yu N.K., Lee J., Kang S.J., Ko H.G., Choi J.H., Kim T., Jang E.H., Han J., Bak M.S., Park J.E., Jang D.J., Baek D., Lee Y.S., Kaang B.K. The Brain-Enriched MicroRNA miR-9-3p Regulates Synaptic Plasticity and Memory // J. Neurosci. 2016. Vol. 36. Is. 33. P. 8641-8652. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0630-16.2016.

14. Aten S., Hansen K.F., Hoyt K.R., Obrietan K. The miR-132/212 locus: a complex regulator of neuronal plasticity, gene expression and cognition // RNA & Disease. 2016. Vol. 3. Is. 2. P. e1375.

15. Wu Y., Kawakami R., Shinohara Y., Fukaya M., Sakimura K., Mishina M., Watanabe M., Ito I., Shigemoto R. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. Is. 40. P. 9213-9226. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2134-05.2005.

16. Jia M., Wang X., Zhang H., Wang X., Ma H., Yang M., Li Y., Cui, C. MicroRNA-132 is involved in morphine dependence via modifying the structural plasticity of the dentate gyrus neurons in rats // Addiction Biology. 2022. Vol. 27. Is. 1. P. e13086. DOI: 10.1111/adb.13086.