

©Коллектив авторов

ГИНЗЕНОЗИДЫ ВЛИЯЮТ НА СИСТЕМУ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ОТМЕНЫ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

М.И. Айрапетов^{1,2*}, С.О. Ереско^{1,3}, Д.В. Кочкин^{4,5}, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, П.Д. Шабанов^{1,6}

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

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

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

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1

⁵Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

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

Длительное употребление алкоголя служит причиной развития нейровоспаления в различных структурах головного мозга. Одним из механизмов, задействованных в этом процессе, является повышенная активность TLR-сигнальных внутриклеточных путей. Ряд исследователей указывают на способность экстракта женьшеня или его отдельных гинзенозидов снижать повышенную активность сигнальных путей, опосредующих эффекты Toll-подобных рецепторов (TLR). Целью работы была оценка влияния суммы гинзенозидов, полученной из экстракта культуры клеток женьшеня (*Panax japonicus*), на состояние системы TLR-сигнализации в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс на модели длительной алкоголизации в период отмены алкоголя. Результаты исследования показали, что гинзенозиды способны вносить изменения в систему TLR-сигнализации, которая была изменена длительной алкоголизацией у крыс. В прилежащем ядре отмечено воздействие гинзенозидов на содержание мРНК TLR3 и TLR4, тогда как в гиппокампе значимо гинзенозиды повлияли на уровень мРНК TLR7. Кроме того, было оценено воздействие суммы гинзенозидов на ряд транскрипционных факторов и цитокинов — участников TLR-сигнализации. Таким образом, результаты настоящего исследования подтвердили, что гинзенозиды могут влиять на экспрессию генов, кодирующих компоненты TLR-сигнальных путей передачи сигналов, однако это влияние носит разнонаправленный характер в разных структурах головного мозга.

Ключевые слова: гинзенозиды; мозг; нейровоспаление; TLR; прилежащее ядро; гиппокамп

DOI: 10.18097/PBMC20226806459

ВВЕДЕНИЕ

Различные виды растений рода *Panax* (женьшень), включая *P. ginseng*, *P. quinquefolius* и *P. notoginseng*, используются в качестве лекарственных растений на протяжении нескольких тысячелетий [1]. Препараты на основе женьшеня находят широкое применение благодаря содержанию в своем химическом составе большого разнообразия фармакологически активных компонентов, включая гинзенозиды, фитостерин, полиацетилен, полифенолы, полисахариды, органические кислоты, аминокислоты, витамины и минералы, каждый из которых может играть потенциальную роль в лечении и профилактике заболеваний [1-5]. В ряде стран активно проводятся исследования молекулярных мишеней, которые могут объяснить наблюдаемые фармакологические эффекты у различных соединений женьшеня [1]. Одними из основных биологически активных компонентов растений рода *Panax* являются гинзенозиды, которые, по данным литературы, обладают противовоспалительным, антиоксидантным и противораковым эффектами [5]. Сообщается, что только на основе гинзенозидов женьшеня в мире зарегистрировано 152 лекарственных препарата

и 119 находятся на стадии клинических испытаний [6]. В последние годы ведутся активные исследования гинзенозидов как потенциальных фармакологических агентов, снижающих развитие нейровоспалительного процесса, который проявляется на первых этапах при развитии различных патологических состояний нервной системы (нейродегенеративные болезни, травмы головного мозга, бактериальные и вирусные инфекционные заболевания, интоксикации) [1, 7-15].

Результаты исследований последних лет подтверждают тот факт, что употребление алкоголя служит сигналом для активации нейровоспалительных путей в различных структурах головного мозга [16-21], что в свою очередь отражается на запуске тех патогенетических молекулярных механизмов, которые задействованы в формировании алкоголизма — тяжёлого социально значимого заболевания [19-21]. Результаты многолетних (более чем двадцатилетних) исследований подтверждают тот факт, что некоторые подтипы Toll-подобных рецепторов (англ. Toll-like receptor, TLR) опосредуют развитие нейровоспаления в структурах головного мозга при длительном употреблении этанола [16-18]. Имеются сведения, что TLR-сигнализация не только способствует

развитию нейровоспаления в головном мозге, но может быть вовлечена в механизмы регуляции функциональной активности нейромедиаторных систем [22–24], внося определённый вклад в формирование патологического влечения к алкоголю.

Результаты исследований указывают на способность экстракта растений рода *Panax* и ряда отдельных гинзенозидов воздействовать на механизмы нейровоспаления посредством изменения состояния системы TLR-сигнализации [25–29]. В связи с этим представляется интересным исследовать влияние гинзенозидов на систему TLR-сигнализации в головном мозге после предварительного длительного поступления алкоголя в организм. Целью нашей работы была оценка влияния суммы гинзенозидов, полученной из экстракта культуры клеток *Panax japonicus*, на состояние системы TLR-сигнализации на уровне мРНК в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс на модели длительной алкоголизации в период отмены алкоголя.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток *Panax japonicus*

Суспензионная культура клеток женьшеня японского (*Panax japonicus* С.А. Мей. var. *repens* Maxim.) получена в 1998 г. из каллуса корня интактного двулетнего растения (Приморский край). Штамм зарегистрирован во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений под №62 [30]. Культуру клеток *P. japonicus* выращивали (в соответствии с коллекционным паспортом) на модифицированной питательной среде с минеральной основой [31] с добавлением сахарозы (2,5%), витаминов [32], α -нафтилуксусной кислоты (2 мг/л) и кинетина (1 мг/л). Культивирование проводили в темноте при 26°C, на калалке (90 об./мин), в колбах объёмом 250 мл с укупоркой двойным слоем алюминиевой фольги и слоем офсетной бумаги (30–40 мл суспензии в колбе).

Подготовка проб для анализа гинзенозидов

Навеску растительного материала (25 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70% (по объёму) водного метилового спирта в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ-12, “Сапфир”, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин (Микроцентрифуга МЦФ, “Армед”, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 40°C). Полученный экстракт суспендировали в 1 мл 5% (по объёму) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (“Supelco”, США). Патрон промывали 3 мл 5% (по объёму) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде, аналиты смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 40°C. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1:1, по объёму) и фильтровали с помощью нейлонового фильтра с порами 0,2 мкм (Acrodisc, “Pall Corporation”, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией высокого разрешения при ионизации электрораспылением (ВЭЖХ-ИЭР-МС)

Анализ проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (“Waters”, США), оснащённом гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (“Waters”, США). Пробу в объёме 1 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; “Waters”, Ирландия). Температура колонки составляла 40°C, объёмная скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% (по объёму) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% (по объёму) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение тритерпеновых гликозидов женьшеня проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (растворитель Б, % по объёму): 0–1 мин — 15%, 1–5 мин — 15%→30%, 5–15 мин — 30%→38%, 15–15,5 мин — 38%→45%, 15,5–23 мин — 45%, 23–23,5 мин — 45%→95%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100–1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации — 120°C, температура десольвации — 250°C, напряжение на капилляре — 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы — 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/ч. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (“Waters”, США).

Моделирование длительной алкоголизации

Работа выполнена на 27 крысах-самцах линии Wistar (начальный возраст 2–3 месяца, масса тела 280±30 г), полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). На протяжении всего эксперимента животные имели неограниченный доступ к корму и воде. Для моделирования длительного употребления алкоголя была выполнена полупринудительная алкоголизация животных 20% раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 2 месяцев. Контрольная группа крыс получала воду.

Введение суммы гинзенозидов животным

После длительного употребления этанола (2 месяца) была произведена отмена алкоголизации. На протяжении 7 суток отмены алкоголизации одной группе животных (n=8) вводили гинзенозиды в дозе 50 мг/кг (внутрибрюшинно (в/б), ежедневно, 1 раз в сутки), а другой группе животных (n=8) — инъекции физиологического раствора в эквивалентном количестве (в/б, ежедневно, 1 раз в сутки). Контрольная группа крыс (n=11), которые не были подвергнуты алкоголизации, получала инъекции физиологического раствора в эквивалентном количестве (в/б, ежедневно, 1 раз в сутки).

Забор биоматериала

По окончании эксперимента на 7 сутки отмены алкоголизации крыс декапитировали и производили забор необходимых структур головного мозга (прилежащее ядро, гиппокамп). Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C.

ПЦР в режиме реального времени

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

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Graph Pad Prism v.6. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Таблица. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr3</i>	AACCTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTTT
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA
<i>NfκB</i>	ATACTGCTTTGACTCACTCC	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Irf3</i>	AATTCCTCCCCTGGCTC	CATGGGATCCTGAACTTTGT
<i>Irf1</i>	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC
<i>Hmgbl</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTCGGTAGAGTCATACTGGA

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полученной из суспензионной культуры клеток женьшеня японского суммы гинзенозидов

Хроматографический анализ показал, что в полученном экстракте из суспензионной культуры клеток женьшеня японского суммарное содержание гинзенозидов составило 83% (чистота вводимой суммы гинзенозидов). Кроме того, был проведён хроматографический анализ данной суммы гинзенозидов. Выделенная сумма гинзенозидов в основном содержала тритерпеновые гликозиды олеаноловой кислоты (основной компонент — гинзенозид R0) и протопанаксадиола (гинзенозиды Rb1, Rc, Rb2/Rb3, Rd). Ориентировочное содержание основных гинзенозидов (% от общей массы): R0 — 33%; Rb1 — 12%; Rc+Rb2+Rb3+Rd — 13%; другие тритерпеновые гликозиды (в сумме) — 25%.

Влияние суммы гинзенозидов на систему Toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены алкоголя

Длительная алкоголизация крыс привела к снижению уровня мРНК TLR3 на 7 сутки отмены алкоголя и к повышению уровня мРНК TLR4 в прилежащем ядре головного мозга (англ. nucleus accumbens, NAc) (рис. 1). Введение суммы гинзенозидов алкоголизированным животным привело к значимому повышению уровня мРНК TLR3, а также к снижению содержания мРНК TLR4 в NAc (рис. 1). Содержание мРНК TLR7 в NAc не было изменено ни в одной из исследуемых групп животных. В гиппокампе (англ. hippocampus, HIP), напротив, на 7 сутки отмены длительной алкоголизации отмечался повышенный уровень мРНК всех исследованных нами подтипов TLR; при этом наиболее значимое повышение уровня мРНК характерно для TLR4 (рис. 2). Введение суммы гинзенозидов не повлияло на экспрессию генов TLR3 и TLR4 в HIP, однако понизило уровень мРНК TLR7 до уровня контрольных значений (рис. 2).

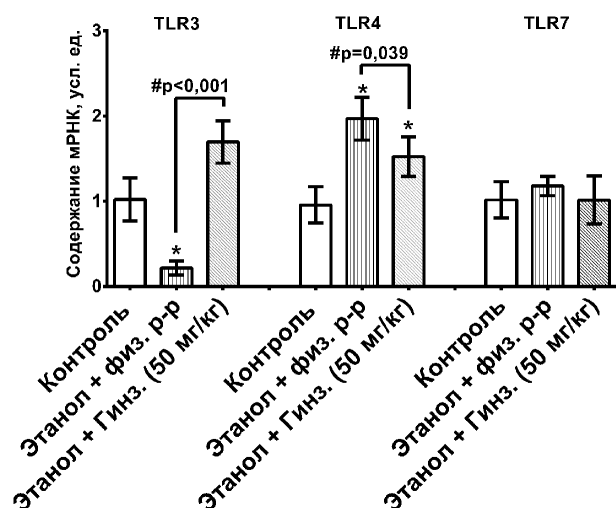


Рисунок 1. Уровень мРНК TLRs в NAc (* $p<0,05$ по отношению к контролю).

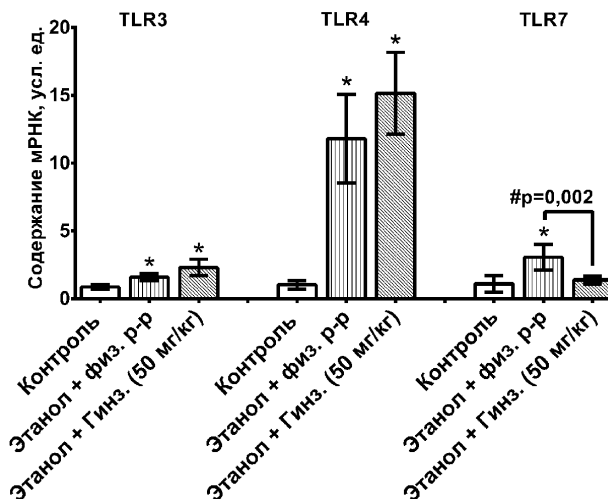


Рисунок 2. Уровень мРНК TLRs в HIP (* $p<0,05$ по отношению к контролю).

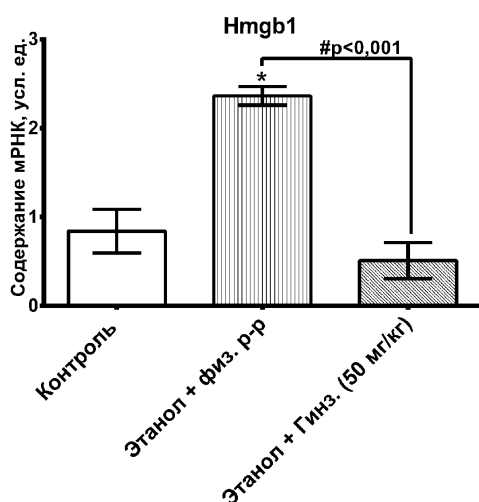


Рисунок 3. Уровень мРНК Hmgb1 в NAc (* $p<0,05$ по отношению к контролю).

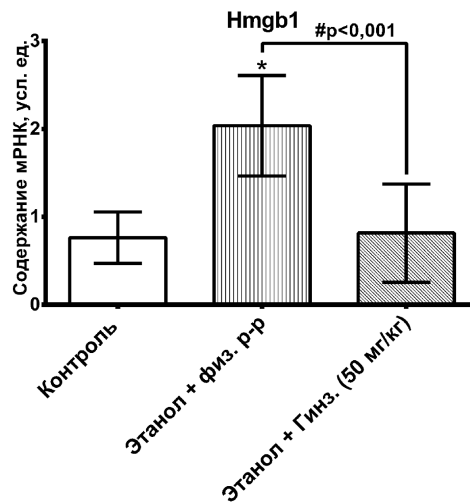


Рисунок 4. Уровень мРНК Hmgb1 в HIP (* $p<0,05$ по отношению к контролю).

Таким образом, используемая нами сумма гинзенозидов оказала влияние на уровень экспрессии TLR, изменённый в ходе длительного потребления этанола. Однако немаловажен и тот полученный нами результат, что это влияние носит разнонаправленный характер между исследуемыми нами структурами головного мозга.

Влияние суммы гинзенозидов на содержание мРНК Hmgb1 в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены алкоголя

Результаты эксперимента показали повышенный уровень мРНК Hmgb1 в NAc и в HIP длительно алкоголизованных крыс в период отмены алкоголя на 7 сутки, при этом в группе животных, получавших в этот период инъекции гинзенозидов, уровень мРНК Hmgb1 достигал уровня контрольных значений, как в NAc, так и в HIP мозга крыс (рис. 3, 4).

Влияние суммы гинзенозидов на транскрипционные факторы в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены алкоголя

Мы оценили уровень мРНК ряда транскрипционных факторов, которые являются участниками TLR-зависимой сигнализации. Уровень мРНК Nf-κB статистически не различался ни в одной из исследуемых нами групп животных (рис. 5, 6). Содержание мРНК IRF3 было повышено в NAc на 7 сутки отмены длительной алкоголизации, а введение суммы гинзенозидов восстановило его уровень до уровня контрольных значений (рис. 5). Изменений в содержании мРНК IRF3 в HIP не выявлено, однако обнаружено повышение уровня мРНК IRF1 на 7 сутки отмены алкоголя, гинзенозиды не оказали значимого влияния на уровень мРНК IRF1 (рис. 6).

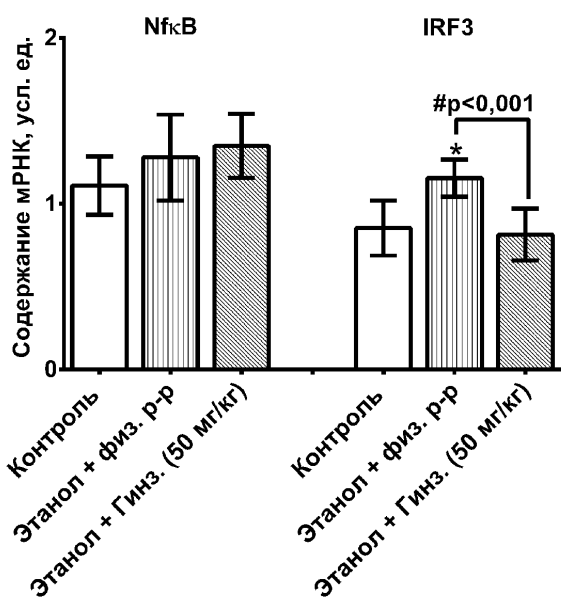


Рисунок 5. Уровень мРНК факторов транскрипции в НАс (* $p < 0,05$ по отношению к контролю).

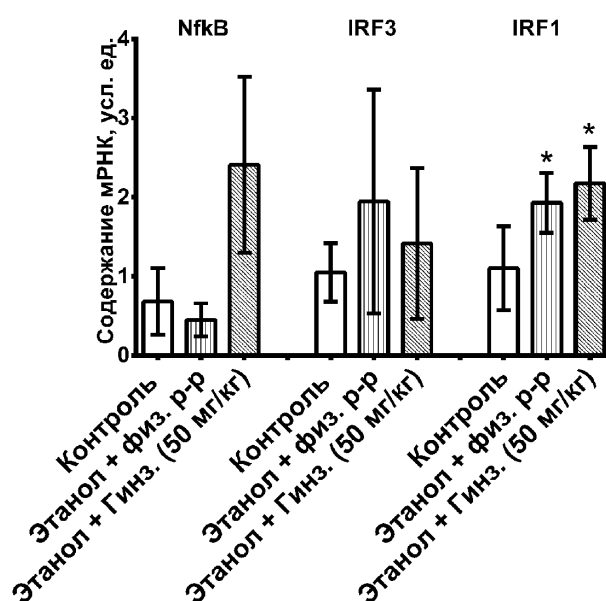


Рисунок 6. Уровень мРНК факторов транскрипции в НІР (* $p < 0,05$ по отношению к контролю).

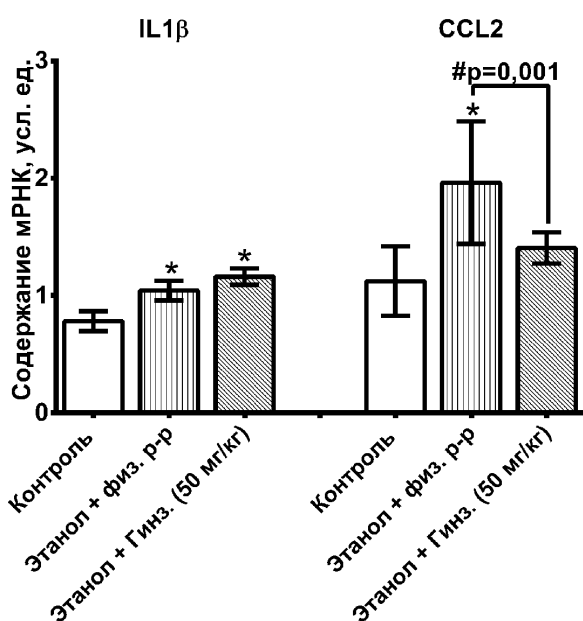


Рисунок 7. Уровень мРНК цитокинов в НАс (* $p < 0,05$ по отношению к контролю).

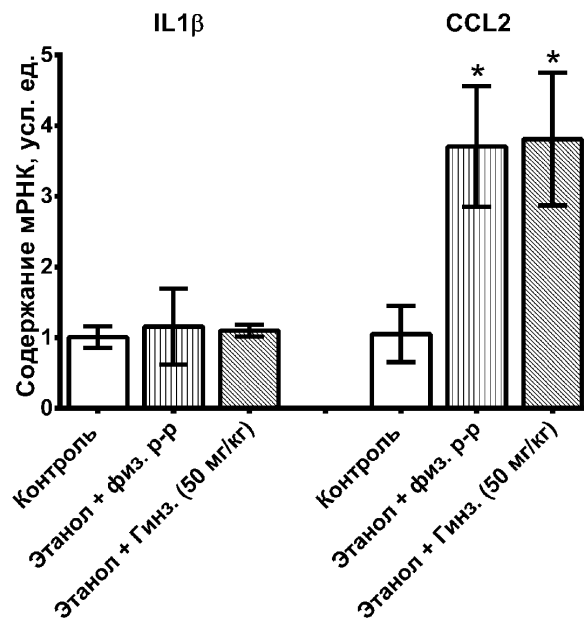


Рисунок 8. Уровень мРНК цитокинов в НІР (* $p < 0,05$ по отношению к контролю).

Влияние суммы гинзенозидов на содержание мРНК цитокинов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены алкоголя

Ответной реакцией на изменения функциональной активности внутриклеточных путей TLR-зависимой сигнализации служат изменения в экспрессии ряда провоспалительных цитокинов. Мы сосредоточили свое внимание на содержании мРНК генов, кодирующих цитокины IL-1 β и CCL-2. Содержание мРНК IL-1 β в НАс было повышено у животных группы отмены алкоголя, получавших как инъекции физиологического раствора, так и инъекции

суммы гинзенозидов. Содержание мРНК другого провоспалительного цитокина CCL-2 было повышено у животных, подвергнутых длительной алкоголизации, при этом инъекции суммы гинзенозидов снизили этот показатель до уровня контрольных значений (рис. 7).

В НІР уровень мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β не изменился ни в одной из исследуемых нами групп, однако содержание мРНК CCL-2 было повышено как у животных в группе отмены алкоголя с выполненными инъекциями физиологического раствора, так и в группе с инъекциями суммы гинзенозидов (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Длительное употребление алкоголя приводит к активации нейровоспалительных путей с последующей нейродегенерацией в ряде структур головного мозга, отвечающих за эмоциональный и когнитивный контроль [16-21]. К таким структурам, в частности, относятся выбранные нами для исследования структуры НР NAc [19]. NAc — вентральная часть стриатума головного мозга, которая является важной частью мезолимбического пути, участвующего в системе внутреннего подкрепления, опосредующей формирование различных форм аддикции, в частности алкогольной аддикции [33-35]. Данные нейровизуализации свидетельствуют о развитии выраженного нейродегенеративного процесса в NAc при длительном употреблении алкоголя [36], однако ключевые механизмы, опосредующие этот процесс, остаются неизвестными. НР — область головного мозга, которая отвечает прежде всего за формирование памяти, но являясь частью лимбической системы, связана также с регуляцией эмоциональных ответов. Хроническое употребление алкоголя приводит к активации путей нейровоспаления и нейродегенерации в НР, включая снижение белого вещества, потерю олигодендроцитов и других глиальных клеток, подавляет процесс нейрогенеза [19, 21, 37-38].

Экстракт женьшеня, содержащий различные соединения, а также отдельные гинзенозиды могут снижать развитие нейровоспалительного процесса [1, 7-15, 25-29]. Результаты исследований показывают влияние гинзенозидов на систему TLR при ряде патологических состояний нервной системы [25-29], однако на модели длительной алкоголизации, влияние гинзенозидов на систему TLR среди различных структур головного мозга ранее не исследовали. В 2008 г. в работе Rhule и соавт. сообщалось, что экстракт *Panax notoginseng* ингибирует секрецию провоспалительных молекул и активацию врождённой иммунной системы, индуцированную активацией TLR4 [26]. В экспериментах Beamer и соавт. применение экстракта *Panax notoginseng* вызывало подавление активации микроглии, измеряемую снижением экспрессии молекул CD40 и CD86, уменьшением синтеза медиаторов воспаления IL-6 и TNF- α и уровня оксида азота [27]. При исследовании эффекта отдельных гинзенозидов было показано, что гинзенозид Rg5 ингибировал экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и циклооксигеназы (COX), а также уровень активных форм NF- κ B при ЛПС (липолисахарид)-стимулированном воспалении лёгких у мышей. Ингибирующее действие Rg5 (10 мг/кг) было сопоставимо с действием дексаметазона (5 мг/кг). Авторы предположили, что эффект опосредуется путём ингибирования связывания ЛПС с TLR4 на макрофагах [28]. Гинзенозид Rg1 обладает активностью в отношении подавления сигнальных путей от TLR3 и TLR4, уменьшая синтез факторов нейровоспаления, индуцированных фрагментом β -амилидного пептида A β 25-35 (пептид для моделирования болезни Альцгеймера)

в клетках NG108-15. Rg1 снижал содержание белков и мРНК TLR3, TLR4, NF- κ B и TRAF6 (англ. TNF Receptor Associated Factor 6), понижал уровни белков TNF- α , IFN- γ и iNOS в лизатах клеточного супернатанта [29]. В другой работе гинзенозид Rg1 уменьшал воспаление, вызванное алкоголем, подавляя путь TLR4/NF- κ B в печени мышей, тем самым оказывая гепатопротекторный эффект [39]. Гинзенозид Rg4 снижал воспаление и проявлял защитный эффект при экспериментальном сепсисе. Применение Rg4 снижало уровни цитокинов, включая TNF- α и IL-1 β , а также уровень NO в тканях почек мышей. Добавление Rg4 к HMGB1-активированной культуре эндотелиальных клеток пупочных вен человека понижало экспрессию TLR4 и TNF- α [40]. Влияние гинзенозида Rg2 было исследовано на модели черепно-мозговой травмы с внутримозговым кровоизлиянием у крыс. Введение Rg2 снижало уровни IL-1 β и TNF- α в поражённом полушарии мозга и ингибировало увеличение экспрессии TLR4, MyD88, p-I κ B α и p-NF- κ B, уменьшало снижение экспрессии окклюдина и клаудина-5 в поражённом полушарии [11]. Гинзенозид Rb1 напрямую снижает уровень активных форм кислорода, ингибирует митохондриальный путь апоптоза, защищая кардиомиоциты новорожденных крыс от ишемического повреждения, уменьшает высвобождение цитохрома c и уровень повреждения нервной ткани, вызванного митохондриальным стрессом в модели церебральной ишемии [41].

Имеются единичные исследования, в которых изучалось содержание мРНК TLR3 в NAc после воздействия этанола. В одной из работ было отмечено небольшое повышение мРНК TLR3 на 1 сутки отмены длительной алкоголизации в NAc у крыс, на более поздних сроках содержание мРНК ранее не исследовалось [42]. В другой работе активация TLR3 агонистом поли(I:C) приводила к повышению уровней мРНК нейроиммунных генов (TLR3, COX-2), глутаматергических генов (mGluR2, mGluR3, GLT1) и нейротрофического фактора BDNF в NAc, а увеличение содержания мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением уровня мРНК TLR3. Таким образом, активация TLR3 вызывает длительные изменения в экспрессии генов и содержании белков, которые могут быть связаны с аддиктивным поведением, направленным на поиск и употребление алкоголя. Кроме того, исследования *in vitro* показывают, что как этанол, так и поли(I:C) увеличивают уровень мРНК TLR3 в нейрональных клетках [43]. В работе с нокаутными по *Tlr4* мышами было показано, что TLR4 играет значимую роль в функционировании NAc [44]. Соответственно, изменения в системе TLR4 будут также отражаться на функционировании NAc. Однако есть результаты исследования, в котором нокдаун *Tlr4* в NAc у мышей не уменьшал уровень добровольного потребления алкоголя в тестах непрерывного или прерывистого доступа к алкоголю [45]. Относительно вклада TLR7 в NAc при развитии или моделировании каких-либо патологий ЦНС исследований не проводилось. Лишь в нашей более ранней работе было показано, что уровень содержания

мРНК TLR7 не изменялся на 7 сутки отмены длительной алкоголизации [35], что согласуется с результатами, полученными нами в ходе данного исследования, хотя и на иной модели алкоголизации.

Повышенная активность системы TLR4 в условиях длительной алкоголизации в гиппокампе и её роль в активации путей нейровоспаления показана неоднократно. Большое количество данных получено на крысах и мышах с применением генетических и фармакологических манипуляций (нокаут гена TLR4 и применение антагонистов), которые показали, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола, но наблюдаются изменения TLR4-опосредованного сигналинга вследствие употребляемого алкоголя [45, 46]. Исследование на мышах показало, что потребление этанола мышами в течение 2 недель приводило к активации TLR4-зависимых провоспалительных процессов, которые характеризовались активацией MAP-киназ и NF-κB с последующим выделением COX-2, iNOS, HMGB1 [47]. Развитие воспалительного процесса на фоне повышенной активности этих провоспалительных сигнальных молекул привело в эксперименте к демиелинизации аксонов и к структурным синаптическим изменениям в результате повреждения белков миелина и синаптических белков, что в последующем сказывалось у мышей на ухудшении когнитивных параметров в тестах распознавания объектов, пассивного избегания и обонятельного поведения [47]. Нокаут гена *Tlr4* сопровождался торможением продукции провоспалительных медиаторов, блокадой активации сигнальных путей MAP-киназ и NF-κB в астроцитах [48]. Таким образом, не исключено, что наблюдаемые нейродегенеративные изменения в условиях длительного потребления алкоголя в гиппокампе также могут реализовываться посредством повышенной активности TLR4-сигналинга. Данные об изменении уровня экспрессии TLR3 и TLR7 в HIP в условиях длительной алкоголизации также имеются, хотя физиологический смысл этих изменений всё ещё до конца не понят. Влияние этанола на TLR7 и микро-РНК let-7b было исследовано на культуре ткани гиппокампально-энторинальной коры мозга крыс, ткань гиппокампа при воздействии этанола характеризовалась повышенным содержанием TLR7 [49]. Кроме того, было обнаружено, что этанол индуцировал образование комплексов HMGB1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством передачи сигнала через TLR7 [49]. Этанол вызывает увеличение содержания белка TLR7 и высвобождение let-7b и HMGB1 из микроглии. Ингибирование HMGB1 глицирризином предотвращало развитие нейротоксичности [49].

Повышенный уровень мРНК всех исследуемых нами TLR в HIP ещё раз указывает на происходящие здесь изменения в системе TLR в условиях длительной алкоголизации. Интересным результатом было то, что используемая нами сумма гинзенозидов (50 мг/кг) понизила уровень мРНК TLR4 в NAc,

а также нормализовала уровень мРНК TLR7 в гиппокампе до уровня контрольных значений, что указывает на способность суммы гинзенозидов вносить изменения в патологические изменения в системе TLR, хотя и представляется интересным в дальнейшем оценить вклад отдельных гинзенозидов, а также их влияние на иные структуры головного мозга.

Белок HMGB1 является эндогенным агонистом TLR4 и TLR7 и повышенный уровень экспрессии гена обычно коррелирует с повышением активности TLR4- и TLR7-зависимых путей внутриклеточной сигнализации. Предполагается, что белок HMGB1 может быть вовлечён в повышенную активацию системы врождённой иммунной системы в условиях длительной алкоголизации [18, 49-50]. В работе Whitman и соавт. [50] повышение количества белка HMGB1 коррелировало с повышением уровня мРНК провоспалительных цитокинов в префронтальной коре мозга у длительно алкоголизированных мышей. В другой работе с длительной алкоголизацией крыс было показано, что уровень белка HMGB1 в лобной коре мозга крыс не изменился в группах длительной алкоголизации и 1 дня отмены алкоголя, однако понизился в группе 28 дня отмены этанола; кроме того, содержание ни одного из исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов не было изменено на 28 суток отмены алкоголя в лобной коре мозга крыс [51]. В мозжечке длительно алкоголизированных мышей отмечено небольшое повышение содержания мРНК *Hmgb1*. Кроме того, в мозжечке наблюдался повышенный уровень мРНК TLR2, TLR4, TLR9 и RAGE и уровень мРНК провоспалительных цитокинов про-IL-1β, TNF-α, CCL-2 [52]. Результаты нашего более раннего исследования также продемонстрировали, что в стриатуме, амигдале и HIP мозга длительно алкоголизированных крыс в период отмены алкоголя на разных сроках происходят разнонаправленные изменения в экспрессии генов *Hmgb1* и *Il1β* [53]. В данной работе важным результатом оказалось то, что введение суммы гинзенозидов (50 мг/кг) восстановили патологически повышенный уровень мРНК *Hmgb1* до уровня контрольных значений, как в HIP, так и в NAc головного мозга длительно алкоголизированных крыс.

О влиянии гинзенозидов на IRF3 и IRF1 известно немного. Однако отметим, что исследование с применением гинзенозида Rb3 также показало уменьшение количества фосфорилированных форм IRF3 в тканях повреждённой кожи, причём это изменение было наиболее очевидно в микрососудистых эндотелиальных клетках [54]. Другой гинзенозид (Rg3) в ином эксперименте уже индуцировал фосфорилирование IRF3 и его транслокацию в ядро [55]. Гинзенозид Rg1 способствовал ангиогенезу в процессе заживления диабетической раны посредством передачи сигналов от miR-23a и снижения уровня IRF1 [56]. Таким образом, воздействие гинзенозидов на пути нейровоспаления посредством воздействия на транскрипционные факторы также возможно.

Результаты нашего эксперимента также показали, что повышенный уровень мРНК IRF3 в NAc был восстановлен до уровня контрольных значений в группе с инъекциями гинзенозидов. В гиппокампе наблюдаемый повышенный уровень IRF1 на 7 сутки отмены алкоголя сохранялся в группе с инъекциями суммы гинзенозидов.

Относительно воздействия гинзенозидов на уровень содержания провоспалительных цитокинов было уже многое сказано. Отсутствие значимых изменений в нашем эксперименте в содержании мРНК IL-1 β в HIP, вероятно, может объясняться тем, что к 7 дню отмены длительной алкоголизации уровень экспрессии *Il1 β* мог нормализоваться в данной структуре мозга, вероятно, за счёт активации компенсаторных противовоспалительных и регенеративных путей внутриклеточной сигнализации. При этом мРНК провоспалительного цитокина CCL-2 сохраняется к 7 дню отмены алкоголизации на повышенном уровне в обеих исследованных нами структурах головного мозга. Сходные результаты нами были выявлены в наших более ранних работах [35, 53]. Инъекции гинзенозидов корректировали данное состояние лишь в прилежащем ядре головного мозга, что ещё раз подтверждает разнонаправленный характер действия суммы гинзенозидов в отношении различных структур головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гинзенозиды способны вносить изменения в систему TLR-сигнализации на уровне мРНК, которая была изменена длительной алкоголизацией у крыс. В прилежащем ядре (NAc) отмечено воздействие гинзенозидов на уровень мРНК TLR3 и TLR4, тогда как в гиппокампе (HIP) значимо гинзенозиды повлияли на уровень мРНК TLR7. Кроме того, было оценено воздействие суммы гинзенозидов на ряд транскрипционных факторов и цитокинов — участников TLR-сигнализации. Таким образом, способность гинзенозидов вносить изменения в экспрессию генов участников TLR-сигнальных путей передачи сигналов была ещё раз подтверждена результатами нашего исследования, однако это влияние носит разнонаправленный характер по отношению к разным структурам головного мозга. В дальнейшем представляется интересным оценить влияние гинзенозидов на TLR-сигнализацию на разных моделях алкоголизации и на разных сроках отмены в динамике, а также влияние гинзенозидов на иные структуры головного мозга. Кроме того, интересным было бы в дальнейшем исследовать дозозависимый эффект на состояние TLR-сигнализации после введения суммы гинзенозидов, а также исследовать воздействие отдельных подтипов гинзенозидов на эту систему. Понимание внутриклеточных мишеней, которые могут быть скорректированы применением гинзенозидов, может помочь в поиске новых фармакологических агентов для коррекции патологических механизмов, вызванных длительным поступлением алкоголя в организм.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят доцента Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (СПбГПМУ) Балашова Л.Д. за предоставленных экспериментальных животных. Выражаем благодарность студентам СПбГПМУ (Васильева В.Ю., Данильченко Е.А., Искалиева А.Р., Белякова Е.Д.), которые принимали активное участие в проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты были проведены с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 EC) и в соответствии с протоколом локального этического комитета ИЭМ (выписка из протокола заседания локального этического комитета №2/15 от 26.02.2015 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. He Y, Yang J, Lv Y, Chen J, Yin F, Huang J, Zheng Q. (2018) A review of ginseng clinical trials registered in the WHO international clinical trials registry platform. *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 1843142. DOI: 10.1155/2018/1843142
2. Mahady G.B., Gyllenhaal C., Fong H.H.S., Farnsworth N.R. (2000) Ginsengs: A review of safety and efficacy. *Nutr. Clin. Care*, **3**(2), 90-101. DOI: 10.1046/j.1523-5408.2000.00020.x
3. Cui L., Wu S.Q., Zhao C.A., Yin C.R. (2016) Microbial conversion of major ginsenosides in ginseng total saponins by endophytes. *J. Ginseng Res.*, **40**(4), 366-374. DOI: 10.1016/j.jgr.2015.11.004
4. Nguyen N.H., Nguyen C.T. (2019) Pharmacological effects of ginseng on infectious diseases. *Inflammopharmacology*, **27**(5), 871-883. DOI: 10.1007/s10787-019-00630-4
5. Tam D.N.H., Truong D.H., Nguyen T.T.H., Quynh L.N., Tran L., Nguyen H.D., Shamandy B.E., Le T.M.H., Tran D.K., Sayed D., Vu V.V., Mizukami S., Hirayama K., Huy N.T. (2018) Ginsenoside Rh1: A systematic review of its pharmacological properties. *Planta Med.*, **84**(3), 139-152. DOI: 10.1055/s-0043-124087
6. Fan S., Zhang Z., Su H., Xu P., Qi H., Zhao D., Li X. (2020) *Panax ginseng* clinical trials: Current status and future perspectives. *Biomed. Pharmacother.*, **132**, 110832. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110832

7. González-Burgos E., Fernandez-Moriano C., Gómez-Serranillos M.P. (2015) Potential neuroprotective activity of ginseng in Parkinson's disease: A review. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **10**(1), 14-29. DOI: 10.1007/s11481-014-9569-6
8. Wang X., Wang S., Wang J., Guo H., Dong Z., Chai L., Hu L., Zhang Y., Wang H., Chen L. (2015) Neuroprotective effect of Xueshuantong for injection (lyophilized) in transient and permanent rat cerebral ischemia model. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **2015**, 134685. DOI: 10.1155/2015/134685
9. Xu X., Jin L., Jiang T., Lu Y., Aosai F., Piao H.N., Xu G.H., Jin C.H., Jin X.J., Ma J., Piao L.X. (2020) Ginsenoside Rh2 attenuates microglial activation against toxoplasmic encephalitis via TLR4/NF-κB signaling pathway. *J Ginseng Res.*, **44**(5), 704-716. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.06.002
10. Li J., Huang Q., Chen J., Qi H., Liu J., Chen Z., Zhao D., Wang Z., Li X. (2021) Neuroprotective potentials of *Panax ginseng* against Alzheimer's disease: A review of preclinical and clinical evidences. *Front. Pharmacol.*, **12**, 688490. DOI: 10.3389/fphar.2021.688490
11. Cai L., Hu F., Fu W., Yu X., Zhong W., Liu F., Wang T., Sui D. (2021) Ginsenoside Rg2 ameliorates brain injury after intracerebral hemorrhage in a rat model of preeclampsia. *Reprod. Sci.*, **28**(12), 3431-3439. DOI: 10.1007/s43032-021-00692-2
12. Sun Y., Yang Y., Liu S., Yang S., Chen C., Lin M., Zeng Q., Long J., Yao J., Yi F., Meng L., Ai Q., Chen N. (2022) New therapeutic approaches to and mechanisms of ginsenoside Rg1 against neurological diseases. *Cells*, **11**(16), 2529. DOI: 10.3390/cells11162529
13. Gong L., Yin J., Zhang Y., Huang R., Lou Y., Jiang H., Sun L., Jia J., Zeng X. (2022) Neuroprotective mechanisms of ginsenoside Rb1 in central nervous system diseases. *Front. Pharmacol.*, **13**, 914352. DOI: 10.3389/fphar.2022.914352
14. Zheng Z., Liang S., Sun S., Liu P., Yu L. (2022) Clinical observation of salvianolic acid combined with *Panax notoginseng* saponins combined with basic nursing intervention on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Healthc. Eng.*, **30**, 8706730. DOI: 10.1155/2022/8706730
15. Xu X., Lu Y.N., Cheng J.H., Lan H.W., Lu J.M., Jin G.N., Xu G.H., Jin C.H., Ma J., Piao H.N., Jin X., Piao L.X. (2022) Ginsenoside Rh2 reduces depression in offspring of mice with maternal toxoplasma infection during pregnancy by inhibiting microglial activation via the HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway. *J. Ginseng Res.*, **46**(1), 62-70. DOI: 10.1016/j.jgr.2021.04.003
16. Ramos A., Joshi R.S., Szabo G. (2022) Innate immune activation: Parallels in alcohol use disorder and Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 910298. DOI: 10.3389/fnmol.2022.910298
17. Coleman L.G.J., Crews F.T., Vetreño R.P. (2021) The persistent impact of adolescent binge alcohol on adult brain structural, cellular, and behavioral pathology: A role for the neuroimmune system and epigenetics. *Int. Rev. Neurobiol.*, **160**, 1-44. DOI: 10.1016/bs.irn.2021.08.001
18. Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. (2021) The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism. *Biosci. Trends*, **15**(2), 74-82. DOI: 10.5582/bst.2021.01041
19. Becker H.C., Mulholland P.J. (2014) Neurochemical mechanisms of alcohol withdrawal. *Handb. Clin. Neurol.*, **125**, 133-156. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00009-4
20. Gano A., Lebonville C.L., Becker H.C. (2022) TLR3 activation with polyI:C exacerbates escalated alcohol consumption in dependent male C57BL/6J mice. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, **12**, 1-12. DOI: 10.1080/00952990.2022.2092492
21. Griffin W.C., Lopez M.F., Woodward J.J., Becker H.C. (2022) Alcohol dependence and the ventral hippocampal influence on alcohol drinking in male mice. *Alcohol*, **2022**, DOI: 10.1016/j.alcohol.2022.10.004
22. Femenia T., Qian Y., Arentsen T., Forssberg H., Diaz Heijtz R. (2018) Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain Behav. Immun.*, **69**, 273-282. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.11.022
23. Tripathi A.S., Bansod P., Swathi K.P. (2021) Activation of 5-HT 1b/d receptor restores the cognitive function by reducing glutamate release, deposition of β-amyloid and TLR-4 pathway in the brain of scopolamine-induced dementia in rat. *J. Pharm. Pharmacol.*, **73**(12), 1592-1598. DOI: 10.1093/jpp/rgab095
24. Shirayama Y., Iwata M., Fujita Y., Oda Y., Hashimoto K. (2022) The Toll-like receptor 4 antagonist TAK-242 induces antidepressant-like effects in a rat learned helplessness model of depression through BDNF-TrkB signaling and AMPA receptor activation. *Behav. Brain Res.*, **423**, 113769. DOI: 10.1016/j.bbr.2022.113769
25. Pannacci M., Lucini V., Colleoni F., Martucci C., Grosso S., Sacerdote P., Scaglione F. (2006) *Panax ginseng* C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage Toll-like receptor 4 expression during physical stress. *Brain Behav. Immun.*, **20**(6), 546-551. DOI: 10.1016/j.bbi.2005.11.007
26. Rhule A., Rase B., Smith J.R., Shepherd D.M. (2008) Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by *Panax notoginseng*. *J. Ethnopharmacol.*, **116**(1), 179-186. DOI: 10.1016/j.jep.2007.11.019
27. Beamer C.A., Shepherd D.M. (2012) Inhibition of TLR ligand- and interferon gamma-induced murine microglial activation by *Panax notoginseng*. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **7**(2), 465-476. DOI: 10.1007/s11481-011-9333-0
28. Kim T.W., Joh E.H., Kim B., Kim D.H. (2012) Ginsenoside Rg5 ameliorates lung inflammation in mice by inhibiting the binding of LPS to toll-like receptor-4 on macrophages. *Int. Immunopharmacol.*, **12**(1), 110-116. DOI: 10.1016/j.intimp.2011.10.023
29. Zhao B.S., Liu Y., Gao X.Y., Zhai H.Q., Guo J.Y., Wang X.Y. (2014) Effects of ginsenoside Rg1 on the expression of Toll-like receptor 3, 4 and their signalling transduction factors in the NG108-15 murine neuroglial cell line. *Molecules*, **19**(10), 16925-16936. DOI: 10.3390/molecules191016925
30. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. (2014) Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors. In: *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer, Netherlands, p. 563-623.
31. Murashige T., Skoog F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
32. Smolenskaya I.N., Reshetnyak O.V., Nosov A.V., Zorinants S.E., Chaiko A.L., Smirnova Y.N., Nosov A.M. (2007) Ginsenoside production, growth and cytogenetic characteristics of sustained *Panax japonicus* var. *repens* cell suspension culture. *Biologia Plantarum*, **51**, 235-241.
33. Koob G.F. (2014) Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb. Clin. Neurol.*, **125**, 33-54. DOI: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00003-3
34. Sobstyl M., Kupryjaniuk A., Mierzejewski P. (2021) Nucleus accumbens as a stereotactic target for the treatment of addictions in humans: A literature review. *Neurol. Neurochir. Pol.*, **55**(5), 440-449. DOI: 10.5603/PJNNS.a2021.0065

35. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Скабелкин Д.А., Исканиева А.Р., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. (2022) Влияние рифампицина на систему Toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре мозга длительно алкоголизованных крыс в период отмены алкоголя. Биомедицинская химия, **68**(4), 279-287. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Skabelkin D.A., Iskanieva A.R., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. (2022) The effect of rifampicin on the system of Toll-like receptors in the nucleus accumbens of the brain of long-term alcoholized rats during alcohol withdrawal. Biomeditsinskaya Khimiya, **68**(4), 279-287.] DOI: 10.18097/PBMC20226804279
36. Edith V.S., Anjali D., Eve R., Margaret J.R., Adolf P. (2005) Striatal and forebrain nuclei volumes: Contribution to motor function and working memory deficits in alcoholism. Biol. Psychiatry, **57**(7), 768-776. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.12.012
37. McClintick J.N., Xuei X., Tischfield J.A., Goate A., Foroud T., Wetherill L., Ehringer M.A., Edenberg H.J. (2013) Stress-response pathways are altered in the hippocampus of chronic alcoholics. Alcohol, **47**(7), 505-515. DOI: 10.1016/j.alcohol.2013.07.002
38. Shabani Z., Jafarzadeh Gharehzaadine M. (2020) Effects and potential mechanisms of alcohol use disorder on the fate determination of newly born neurons in the hippocampus. Alcohol Alcohol., **55**(6), 598-602. DOI: 10.1093/alcal/agaa083
39. Xia T., Fang B., Kang C., Zhao Y., Qiang X., Zhang X., Wang Y., Zhong T., Xiao J., Wang M. (2022) Hepatoprotective mechanism of ginsenoside Rg1 against alcoholic liver damage based on gut microbiota and network pharmacology. Oxid. Med. Cell Longev., **2022**, 5025237. DOI: 10.1155/2022/5025237
40. Kim G.O., Kim N., Song G.Y., Bae J.S. (2022) Inhibitory activities of rare ginsenoside Rg4 on cecal ligation and puncture-induced sepsis. Int. J. Mol. Sci. **23**(18), 10836. DOI: 10.3390/ijms231810836
41. Zhou P., Xie W., Sun Y., Dai Z., Li G., Sun G., Sun X. (2019) Ginsenoside Rb1 and mitochondria: A short review of the literature. Molecular Cellular Probes, **43**, 1-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2018.12.001
42. McCarthy G.M., Warden A.S., Bridges C.R., Blednov Y.A., Harris R.A. (2017) Chronic ethanol consumption: Role of TLR3/TRIF-dependent signaling. Addiction Biology, **23**(3), 889-903. DOI: 10.1111/adb.12539
43. Randall P.A., Vetreno R.P., Makhijani V.H., Crews F.T., Besheer J. (2019) The Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C) induces rapid and lasting changes in gene expression related to glutamatergic function and increases ethanol self-administration in rats. Alcohol. Clin. Exp. Res., **43**(1), 48-60. DOI: 10.1111/acer.13919
44. Kashima D.T., Grueter B.A. (2017) Toll-like receptor 4 deficiency alters nucleus accumbens synaptic physiology and drug reward behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **114**(33), 8865-8870. DOI: 10.1073/pnas.1705974114
45. Harris R.A., Bajo M., Bell R.L., Blednov Y.A., Varodayan F.P., Truitt J.M., de Guglielmo G., Lasek A.W., Logrip M.L., Vendruscolo L.F., Roberts A.J., Roberts E., George O., Mayfield J., Billiar T.R., Hackam D.J., Mayfield R.D., Koob G.F., Roberto M., Homanics G.E. (2017) Genetic and pharmacologic manipulation of TLR4 has minimal impact on ethanol consumption in rodents. J. Neurosci., **37**(5), 1139-1155. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2002-16.2016
46. Blednov Y.A., Black M., Benavidez J.M., da Costa A., Mayfield J., Harris R.A. (2017) Sedative and motor in coordination effects of ethanol in mice lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88. Alcohol. Clin. Exp. Res., **41**(3), 531-540. DOI: 10.1111/acer.13314
47. Montesinos J., Pascual M., Pla A., Maldonado C., Rodríguez-Arias M., Miñarro J., Guerri C. (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. Brain Behav. Immun., **45**, 233-344. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.11.015
48. Alfonso-Loeches S., Pascual-Lucas M., Blanco A.M., Sanchez-Vera I., Guerri C. (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. J. Neurosci., **30**(24), 8285-8295. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010
49. Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. (2017) Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. J. Neuroinflammation, **14**(1), 22. DOI: 10.1186/s12974-017-0799-4
50. Whitman B.A., Knapp D.J., Werner D.F., Crews F.T., Breese G.R. (2013) The cytokine mRNA increase induced by withdrawal from chronic ethanol in the sterile environment of brain is mediated by CRF and HMGB1 release. Alcohol. Clin. Exp. Res., **37**(12), 2086-2097. DOI: 10.1111/acer.12189
51. Sanchez-Alavez M., Nguyen W., Mori S., Wills D.N., Otero D., Ehlers C.L., Conti B. (2019) Time course of microglia activation and brain and blood cytokine/chemokine levels following chronic ethanol exposure and protracted withdrawal in rats. Alcohol, **76**, 37-45. DOI: 10.1016/j.alcohol.2018.07.005
52. Lippai D., Bala S., Petrasek J., Csak T., Levin I., Kurt-Jones E.A., Szabo G. (2013) Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. J. Leukoc. Biol., **94**(1), 171-182. DOI: 10.1189/jlb.1212659
53. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. (2021) Экспрессия гена HMGB1 изменяется в стриатуме и амигдале мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола. Биомедицинская химия, **67**(1), 95-99. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. (2021) HMGB1 gene expression changes in the striatum and amigdal of the rat's brain under alcoholization and ethanol withdrawal. Biomeditsinskaya Khimiya, **67**(1), 95-99.] DOI: 10.18097/PBMC20216701095
54. Li Y., Liu H., Zeng Z., Lin H., Chen X., Yuan X., Qiu J., Fu F., Chen Z., Kuang J. (2022) Ginsenoside Rb3 attenuates skin flap ischemia-reperfusion damage by inhibiting STING-IRF3 signaling. J. Mol. Histol. **53**(4), 763-772. DOI: 10.1007/s10735-022-10081-x
55. Choi Y.J., Kang L.J., Lee S.G. (2014) Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg3 through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKK ϵ /IRF3 signalling. Curr. Med. Chem., **21**(8), 1050-1060. DOI: 10.2174/09298673113206660306
56. Cai H.A., Huang L., Zheng L.J., Fu K., Wang J., Hu F.D., Liao R.Y. (2019) Ginsenoside (Rg-1) promoted the wound closure of diabetic foot ulcer through iNOS elevation via miR-23a/IRF-1 axis. Life Sci., **233**, 116525. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.05.081

Поступила в редакцию: 16. 11. 2022.
После доработки: 18. 12. 2022.
Принята к печати: 19. 12. 2022.

GINSENOSIDES AFFECT THE SYSTEM OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE BRAIN OF RATS UNDER CONDITIONS OF LONG-TERM ALCOHOL WITHDRAWAL

M.I. Airapetov^{1,2}, S.O. Eresko^{1,3}, D.V. Kochkin^{4,5}, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, P.D. Shabanov^{1,6}*

¹Institute of Experimental Medicine,

12 Akademika Pavlova str., St. Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: interleukin1b@gmail.com

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

³St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, 14 Professora Popova str., St. Petersburg, 197376 Russia

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie gory, Moscow, 119991 Russia

⁵Timiryazev Institute of Plant Physiology of RAS, 35 Botanicheskaya str., Moscow, 127276 Russia

⁶Kirov Military Medical Academy, 6 Akademika Lebedeva, Russia, St. Petersburg, 194044 Russia

Long-term alcohol consumption causes the development of neuroinflammation in various brain structures. One of the mechanisms involved in this process is the increased activity of TLR-signaling intracellular pathways. Studies confirm the ability of ginseng extract or its individual ginsenosides to reduce the increased activity of TLR-signaling pathways. The aim of our study was to study the effect of the amount of ginsenosides obtained from the extract of the *Panax japonicus* cell line on the state of the TLR-signaling system in the *nucleus accumbens* and hippocampus of the rat brain in a model of long-term alcohol consumption during alcohol withdrawal. The results of the study showed that ginsenosides were able to make changes in the TLR signaling system, which has been altered by long-term alcohol consumption. A significant effect of ginsenosides on the level of TLR3 and TLR4 mRNA in the nucleus accumbens was found, while in the hippocampus, ginsenosides significantly affected the level of TLR7 mRNA. The effect of ginsenosides on the level of mRNA of transcription factors and cytokines involved in TLR-signaling was evaluated. Thus, results of our study confirm that ginsenosides are able to influence the state of TLR-signaling pathways, but this effect is multidirectional in relation to different brain structures. In the future, it seems interesting to evaluate the role of individual ginsenosides in relation to genes of TLR-signaling, as well as the effect of ginsenosides on other brain structures.

Key words: ginsenosides, brain, neuroinflammation, TLR, *nucleus accumbens*, hippocampus

Funding. The study was funded from the budget of the Institute of Experimental Medicine (State Assignment “Pharmacological analysis of the action of neurotropic agents, study of intracellular targets and creation of targeted delivery systems”, No. 0557-2019-0004).

Received: 16.11.2022; revised: 18.12.2022; accepted: 19.12.2022.