

Институт экспериментальной медицины

На правах рукописи

Ереско Сергей Олегович

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЙ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ
TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ
ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА

Научные специальности:

1.5.4. Биохимия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент

Айрапетов Марат Игоревич

доктор медицинских наук

Бычков Евгений Рудольфович

Санкт-Петербург

2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Система toll-подобных рецепторов.....	16
1.2 Сигнальные каскады реакций TLR.....	18
1.3 Участие toll-подобных рецепторов в нейроиммунных механизмах при воздействии этанола.....	22
1.3.1 Роль TLR3 в патогенезе алкоголизма.....	23
1.3.2 Роль TLR4 в патогенезе алкоголизма	25
1.3.3 Роль TLR7 в патогенезе алкоголизма.....	28
1.4 Участие HMGB1 в нейроиммунных механизмах при алкоголизации.....	29
1.5 Участие молекул микро-РНК в реализации нейроиммунных механизмов при алкоголизации.....	33
1.6 Новые потенциальные подходы нейроиммунной терапии алкоголизма.....	34
1.6.1. Глициризин.....	35
1.6.2 Рифампицин.....	36
1.6.3 Гинзенозиды.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1 Эксперименты <i>in vivo</i> на крысах.....	42
2.2 Моделирование длительного воздействия этанола и отмены.....	42
2.3 Культивирование клеток <i>Rana japonicus</i>	43
2.4 Подготовка проб для анализа гинзенозидов.....	44
2.5 ВЭЖХ-ИЭР-МС.....	44
2.6 Внутривентрикулярное введение суммы гинзенозидов.....	45
2.7 Внутривентрикулярное введение рифампицина.....	46
2.8 Забор биоматериала.....	46
2.9 Выделение РНК.....	46
2.10 ОТ-ПЦР.....	47
2.11 Статистическая обработка данных.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49

3.1 Состояние экспрессии генов TLR и провоспалительных цитокинов в структурах головного мозга крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене.....	49
3.1.1 Уровень экспрессии <i>Tlr3</i> в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене.....	49
3.1.2 Уровень экспрессии <i>Tlr4</i> в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене.....	50
3.1.3 Уровень экспрессии <i>Tlr7</i> в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене.....	51
3.1.4 Уровень экспрессии провоспалительных цитокинов в условиях длительного воздействия этанола и при отмене.....	53
3.1.5 Корреляционный анализ.....	55
3.2 Уровень экспрессии гена <i>Hmgb1</i> в структурах мозга крыс при длительном воздействии этанола и при отмене	56
3.3 Состояние экспрессии генов системы TLR в прилежащем ядре мозга крыс при отмене длительного воздействия этанола и при использовании рифампицина.....	57
3.3.1 Влияние рифампицина на экспрессию генов toll-подобных рецепторов	57
3.3.2 Влияние рифампицина на экспрессию генов адаптерных белков и транскрипционных факторов.....	58
3.3.3 Влияние рифампицина на экспрессию генов цитокинов в прилежащем ядре головного мозга крыс в период отмены длительного воздействия этанола.....	59
3.3.4 Влияние рифампицина на экспрессию гена <i>Hmgb1</i> в прилежащем ядре головного мозга крыс в период отмены этанола.....	61
3.4 Влияние очищенной суммы гинзенозидов на систему toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены длительного воздействия этанола.....	62
3.4.1 Анализ полученной из суспензионной культуры клеток женьшеня японского суммы гинзенозидов.....	62

3.4.2 Влияние суммы гинзенозидов на экспрессию генов toll-подобных рецепторов.....	62
3.4.3 Влияние суммы гинзенозидов на экспрессию генов транскрипционных факторов.....	64
3.4.4 Влияние суммы гинзенозидов на уровень экспрессии генов цитокинов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены этанола.....	65
3.4.5 Влияние суммы гинзенозидов на уровень экспрессии гена <i>Hmgb1</i> в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены этанола.....	67
3.5 Содержание микро-РНК в прилежащем ядре головного мозга крыс при длительном воздействии этанола	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	70
4.1 Экспрессия генов TLR и провоспалительных цитокинов в условиях длительного воздействия этанола и при отмене в головном мозге крыс.....	70
4.2 Экспрессия гена <i>Hmgb1</i> в условиях длительного воздействия этанола и при отмене в головном мозге крыс.....	76
4.3 Анализ экспрессии генов системы TLR-сигнализации при использовании рифампицина.....	78
4.4 Анализ экспрессии генов системы TLR-сигнализации при использовании суммы гинзенозидов.....	83
4.5 Содержание микроРНК в условиях длительного воздействия этанола в головном мозге крыс.....	90
Заключение.....	92
Список сокращений.....	94
Благодарности.....	95
Список литературы.....	96

Введение

Актуальность исследования

Систематическое злоупотребление населением этанол-содержащей продукцией представляет собой серьёзную социальную проблему, решение которой является важной задачей системы здравоохранения (Шабанов П.Д., 1998, 2002, 2012; Ерышев О.Ф., 2002).

Масштабность этой проблемы сохраняется на сегодняшний день во многих странах мира (Буров Ю.В., 1985; Ерышев О.Ф., 2002; Шабанов П.Д., 2002, 2012; Ветлугина, Т. П., 2023). В связи с этим существует необходимость в проведении исследований, направленных на получение новых сведений об особенностях развития метаболических изменений в организме при хроническом поступлении высоких доз этанола. Нервная ткань является одной из наиболее восприимчивых к поступлению этанола в организм ввиду большого содержания в ней липидов и воды (Буров Ю.В., 1985; Шабанов П.Д., 1998, 2002, 2012). По этой причине представляется важным проведение исследований, направленных на нейрохимический анализ изменений, развивающихся в головном мозге при систематическом поступлении этанола в организм (Буров Ю.В., 1985; Шабанов П.Д., 1998, 2002, 2012). Вторая причина, по которой нервная ткань представляет наибольший интерес в отношении изучения влияния этанола – это крайне сложная система регуляции протекающих здесь биохимических процессов, а поступление этанола в организм служит причиной их дисрегуляции, что в свою очередь приводит к развитию различных дисфункций в структурах головного мозга (Буров Ю.В., 1985; Шабанов П.Д., 1998, 2001, 2002, 2007, 2008, 2012; Дробленков, А.В., 2008, 2011).

В последние годы исследователи уделяют внимание изучению изменений в нейроиммунных механизмах, которые реализуются в нервной ткани среди различных отделов головного мозга при систематическом / длительном употреблении продукции, содержащей этанол (Coleman L.G. et al., 2018; Crews F.T. et al., 2013, 2017; Orio L. et al., 2019; Sanchez-Alavez M. et al., 2018; Melbourne, J.K.,

2019). Результаты исследований последних лет позволили сделать заключение, что поступление этанола приводит к повышению активности генов некоторых подтипов toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) в головном мозге, а также к повышению экспрессии генов их эндогенных агонистов (Antón M. et al., 2017; Crews F.T. et al., 2013; Pascual M. et al., 2015; Whitman B.A. Et al., 2013).

В экспериментах на грызунах и при исследовании посмертных образцов мозга людей, страдающих алкоголизмом, было показано, что этанол увеличивает экспрессию TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7) на уровне белка в головном мозге, которая сохраняется в течение длительного времени (Vetreno R.P. et al., 2012, 2013).

Активация TLR с помощью специфических агонистов служит сигналом для запуска внутриклеточных каскадов реакций, которые приводят к активации многих генов врожденной иммунной системы (Crews F.T. et al., 2017; Hanke M.L. et al., 2011; Okun E. et al., 2009), а также к развитию нейровоспалительного процесса в ЦНС, результатом чего может быть повышенный уровень нейротоксичности с последующей гибелью нейронов и клеток нейроглии в головном мозге (Blednov et al., 2011, 2013; Qin et al., 2008, 2013).

Помимо участия TLR в реализации нейровоспалительного процесса, TLR также могут играть роль в регуляции иных молекулярно-клеточных механизмов, которые также могут быть задействованы в развитии патологического влечения к алкоголю (Warden A.S. et al., 2018; Randall P.A., et al., 2018; Liu J. et al., 2011).

В имеющихся работах исследователи в основном сосредоточили свое внимание на изучении уровня активности TLRs и мРНК различных провоспалительных факторов на моделях алкоголизации крыс и мышей (Lawrimore S.J. et al., 2019; Blednov Y.A. et al., 2017; Qin L et al., 2007, 2008, 2012). В тоже время представляет интерес анализ динамики изменения уровня активности TLRs при отмене алкоголя и изучение продолжительности нейровоспалительного процесса в ЦНС, опосредованного TLRs.

Важно понять и то, как изменяется уровень активности TLRs в различных структурах мозга, которые в первую очередь подвержены воздействию алкогольной интоксикации и которые входят в систему подкрепления. Такие

структуры головного мозга рассматриваются ключевыми при изучении механизмов различных форм аддикции, включая алкогольную (Ноздрачев, А.Д., 2000; Шабанов П.Д., 1998, 2001, 2002, 2007, 2008, 2012; Nestler E.J., 2005) Дробленков, А.В., 2008, 2011; Koob, G.F., 2014; Coleman L.G., 2018; Crews F.T., 2013, 2017). Особый интерес здесь представляют такие структуры мозга, как медиальная префронтальная кора (mPFC), гиппокамп, стриатум, миндалевидное тело, энторинальная кора (EC). Чтобы получить ответы на эти вопросы и приблизиться еще немного к пониманию того, как осуществляется функционирование нейроиммунной сигнализации в патогенезе алкоголизма, необходимо проведение дополнительных исследований.

Изучение механизмов активации воспалительного процесса посредством TLR-зависимой сигнализации может открыть новые мишени для фармакологического воздействия (Crews F.T. et al., 2017), которое может быть использовано в комплексной терапии алкоголизма, а также для профилактики развития тяжёлых форм алкогольной энцефалопатии (Цыган, В.Н., 2007; Газатова Н.Д., 2018; Crews F.T. et al., 2017; Ветлугина, Т.П., 2023).

Степень разработанности темы

В имеющейся литературе убедительно доказывается тот факт, что длительное воздействие этанола активирует механизмы врожденной иммунной системы посредством повышения экспрессии мРНК и белка компонентов TLR-зависимых путей передачи сигналов. Воздействие агонистов toll-подобных рецепторов запускает сходные с этанолом молекулярные пути передачи сигналов в клетках нервной ткани, которые ведут к повышению активности провоспалительных генов, тогда как, напротив, применение антагонистов toll-подобных рецепторов (до / после воздействия этанола) снижает экспрессию генов нейровоспаления. Таким образом, на данный момент сложилось представление о нейровоспалительной теории развития алкоголизма, суть которой заключается в том, что патогенез алкоголизма неразрывно связан с активацией генов системы врожденного иммунитета. Несмотря на это большая часть данных для

формирования данной гипотезы было получено на структурах коры головного мозга, а также в экспериментах *in vitro*, тогда как другие структуры головного мозга, ассоциированные с развитием алкоголизма, изучены недостаточно, иногда имеются лишь краткие сведения. Данное направление исследований получило активное развитие в последние 10-15 лет, однако исследований, направленных на фармакологическую коррекцию наблюдаемых изменений на молекулярном уровне потенциальными фармакологическими агентами выполнено не так много. Таким образом, существует необходимость в проведении исследований, направленных на анализ системы toll-подобных рецепторов среди различных структур головного мозга, ассоциированных с развитием алкоголизма, а также при применении потенциальных фармакологических агентов, направленных на коррекцию изменений на молекулярном уровне. В частности, к таким соединениям могут быть отнесены гинзенозиды женьшеня и рифампицин, которые, по данным литературы, зарекомендовали себя как средства для коррекции системы нейровоспаления при различных патологических состояниях нервной системы. Данные соединения обладают способностью проникать через ГЭБ и снижали уровень экспрессии провоспалительных медиаторов. Существует предположение, что механизм действия гинзенозидов может быть опосредован их влиянием на систему toll-подобных рецепторов, а для рифампицина показана его прямая связь с MD2, коррецептором TLR4, что служит причиной ингибирования передачи TLR-сигнальных внутриклеточных путей передачи сигналов.

Цель исследования

Изучить динамику экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга крыс в условиях хронической алкоголизации, отмены этанола, и на фоне фармакотерапии.

Задачи исследования

1. Изучить динамику экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга (гиппокамп, энторинальная

кора, стриатум, миндаля) крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола.

2. Изучить динамику экспрессии генов цитокинов (Il-1b, Ccl2) в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола. Выявить функциональные взаимосвязи между экспрессией TLR3/4/7 и экспрессией Il-1b и Ccl2 в гиппокампе, энторинальной коре головного мозга, стриатуме и миндале.

3. Изучить экспрессию лигандов TLRs (Hmgb1, микроРНК) в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола.

4. Изучить эффекты рифампицина и гинзенозидов на экспрессию генов системы toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга алкоголизованных крыс, подвергнутых отмене этанола.

Научная новизна

Новизна выполненного исследования заключается в том, что впервые был выполнен анализ экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга у длительно алкоголизованных крыс, а также на разных сроках отмены длительного воздействия этанола. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии гена *Tlr3* не был подвержен изменениям в большинстве исследованных структур мозга (стриатум, прилежащее ядро, миндалевидное тело, энторинальная кора), за исключением небольшого снижения в гиппокампе, экспрессия генов *Tlr4* и *Tlr7* не была изменена ни в одной из исследованных структур головного мозга. Однако были получены сведения о наличии разнонаправленных изменений в экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4* и *Tlr7* при отмене длительного воздействия этанола на разных сроках. Степень изменений в экспрессии генов зависела не только от сроков после отмены этанола и региона головного мозга, но также и от моделирования воздействия этанола, т.е. от продолжительности и концентрации вводимых доз раствора этанола. Таким образом, разные варианты моделирования длительной алкоголизации оказывают

различный эффект на экспрессию генов системы toll-подобных рецепторов. Оценка уровня экспрессии других генов из системы toll-подобных рецепторов (гены адаптерных белков, транскрипционных факторов, про- и противовоспалительных цитокинов) также показала наличие изменений в исследованных структурах мозга крыс как в группах длительного воздействия этанола, так и при отмене этанола на разных сроках. Полученные данные являются новыми как для отечественной, так и для мировой литературы, так как анализ экспрессии серии генов из системы toll-подобных рецепторов в исследованных структурах головного мозга ранее не выполнялся.

Оригинальным в работе является фармакологический подход, направленный на коррекцию изменённых молекулярных механизмов длительным воздействием этанола в таких структурах головного мозга как гиппокамп и прилежащее ядро. Данные структуры мозга являются наиболее подверженными различным изменениям при длительном воздействии этанола. Существуют предположения, что изменения в данных структурах могут быть ключевыми при формировании алкогольной зависимости. Результаты исследования показали, что гинзенозиды женьшеня и рифампицин обладают эффектом, направленным на восстановление уровня экспрессии ряда генов из системы toll-подобных рецепторов.

Теоретическая и практическая значимость

Научно-теоретическая значимость работы определяется доказательством вовлеченности генов системы toll-подобных рецепторов в патогенетические молекулярные механизмы, которые развиваются при длительном воздействии этанола и при отмене этанола в ряде двигательных и эмоциогенных структур головного мозга, таких как стриатум, прилежащее ядро, гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора. В работе показано, что разные модели длительного воздействия этанола разнонаправленно изменяют экспрессию генов системы toll-подобных рецепторов, а также то, что разные структуры головного мозга реагируют разнонаправленно на длительное поступление этанола в организм, а также при отмене его поступления. Теоретическая значимость

диссертационной работы заключатся и в том, что в работе были получены сведения о способности гинзенозидов женьшеня и рифампицина вносить изменения в экспрессию генов TLR-системы, что еще раз указывает на то, что давно известный иммуномодулирующий эффект у этих соединений может быть опосредован их влиянием на молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, в том числе на систему toll-подобных рецепторов.

Практическая значимость работы вытекает из понимания того, что полученные данные об изменении экспрессии генов TLR-системы вскрывают один из молекулярных патогенетических путей, которые развиваются в исследованных структурах головного мозга, которые являются ключевыми в механизмах развития алкоголизма, что создает предпосылки для использования данных путей в качестве фармакологических мишеней для коррекции существующих изменений. Другим практическим результатом работы является и то, что используемые в работе фармакологические субстанции, такие как гинзенозиды женьшеня и антибиотик рифампицин, обладают корректирующим эффектом в отношении изменённой экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов. Кроме того, практическим результатом является и то, что имеющийся патогенетический молекулярный механизм способен быть регулируемым вплоть до восстановления по ряду показателей до уровня контрольных значений при использовании фармакологических субстанций, что открывает новые возможности для изучения путей фармакологической коррекции наблюдаемых изменений в исследованных структурах головного мозга при длительном воздействии этанола посредством воздействия на систему toll-подобных рецепторов.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в длительном воздействии этанола на крыс-самцов линии Вистар с помощью двух моделей – полупринудительное длительное воздействие раствором этанола в качестве единственного источника жидкости, а также с помощью внутригастрального введения раствора этанола через желудочный зонд. Сумма гинзенозидов, а также антибиотик рифампицин

вводились животным внутривенно на протяжении первых 7-ми суток отмены длительного воздействия этанола. Гинзеноиды женьшеня были получены путем экстракции их из культуры женьшеня японского, который предварительно был культивирован в условиях *in vitro* (МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра физиологии растений). По результатам экстрагирования была получена сумма гинзенозидов и масс-спектрометрически оценен её химический состав на предмет количественной оценки содержания различных групп соединений гинзенозидов. По окончании эксперимента производился забор структур головного мозга крыс (стриатум, прилежащее ядро, гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора), выполнено суммарное выделение молекул РНК из структур мозга, получены кДНК в ходе реакций обратной транскрипции, определялся уровень относительной экспрессии генов методом реал-тайм ПЦР. Состояние здоровья животных оценивалось на протяжении всего эксперимента.

Основные научные результаты

1. Получены сведения о состоянии экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга у длительно алкоголизованных крыс, а также на разных сроках отмены длительного воздействия этанола. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии гена *Tlr3* не был подвержен изменениям в большинстве исследованных структур мозга (стриатум, прилежащее ядро, миндалевидное тело, энторинальная кора), за исключением небольшого снижения в гиппокампе, экспрессия генов *Tlr4* и *Tlr7* не была изменена ни в одной из исследованных структур головного мозга. Однако были получены новые сведения о наличии выраженных разнонаправленных изменений в экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4* и *Tlr7* в условиях отмены длительного воздействия этанола на разных сроках в динамике; см. разделы 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.3.1, 3.4.2 (Айрапетов М.И. и соавт., 2020) (личный вклад составляет не менее 80%).

2. Выявлено, что не только уровень экспрессии генов *Tlr* подвержен выраженным изменениям при отмене длительного воздействия этанола, но вся

система генов toll-подобных рецепторов (эндогенные агонисты, гены адаптерных белков, транскрипционных факторов, про- и противовоспалительных цитокинов) изменена в той или иной мере в структурах головного мозга у экспериментальных животных; см. разделы 3.1.4, 3.2, 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4, 3.4.3, 3.4.4, 3.5 (Айрапетов М.И. и соавт., 2020; 2022; Airapetov M. I. et al., 2024) (личный вклад составляет не менее 80%).

3. Показано, что коррекция изменённых молекулярных механизмов длительным воздействием этанола в гиппокампе и прилежащем ядре головного мозга крыс с помощью потенциальных противонейровоспалительных соединений рифампицина и гинзенозидов позволила оказать влияние на экспрессию серии генов из системы toll-подобных рецепторов. Выбранные соединения в работе зарекомендовали себя, по данным литературы, как потенциальные нейропротекторы, которые способны устранять признаки нейровоспалительного ответа при различных патологических состояниях центральной нервной системы, а также модулировать уровень экспрессии исследуемых генов и их продуктов трансляции. Полученные сведения о восстановлении ряда изменённых молекулярных механизмов с помощью выбранных фармакологических соединений являются весьма интересными и открывают перспективу новому направлению в этой области исследований для дальнейших работ; см. разделы 3.3, 3.4 (Айрапетов М.И. и соавт., 2022; Airapetov M. I. et al., 2024) (личный вклад составляет не менее 80%).

4. Полученные сведения о состоянии экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов указывают на вовлеченность данной системы в патогенетические механизмы, которые развиваются в ходе длительного воздействия этанола в эмоциогенных и двигательных структурах головного мозга. Это расширяет имеющиеся теоретические представления об участии toll-подобных рецепторов в нейробиологии алкоголизма, см. раздел 1.3 (Airapetov M. I. et al., 2021) (личный вклад составляет не менее 80%).

Положения, выносимые на защиту

1. Алкоголизация (1 месяц) не вызывает существенных нарушений экспрессии TLR3/4/7 в эмоциогенных структурах мозга крыс. В то же время, отмена этанола стимулирует резкий дисбаланс экспрессии генов TLR3/4/7 и провоспалительных цитокинов (IL-1 β и CCL2) на протяжении двух недель наблюдения.

2. Положительная корреляция между уровнем экспрессии генов TLR3/4/7 и уровнем экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β и CCL2) указывает на важную роль TLR3/4/7 в развитии нейровоспаления при хроническом и несистематизированном потреблении этанола.

3. Одним из механизмов нейровоспаления при длительной алкоголизации может быть повышение экспрессии эндогенного активатора TLRs – секреторного белка Hmgb1 и изменение содержания микроРНК (miR-155, miR-let7b, miR-96, и miR-182) в эмоциогенных структурах мозга.

4. У хронически алкоголизированных крыс, подвергнутых отмене этанола, рифампицин снижет экспрессию генов нейровоспаления и активирует гены противовоспалительных цитокинов β 10 и β 11 в прилежащем ядре головного мозга.

5. У хронически алкоголизированных крыс, подвергнутых отмене этанола, гинзенозиды корректируют дисбаланс экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга.

Степень достоверности и апробация материалов исследования

Степень достоверности определяется достаточным числом экспериментальных животных (120 взрослых крыс линии Вистар), которые были распределены на 12 групп по 10 животных в каждой группе. Работа выполнена с использованием современных биохимических, молекулярно-генетических и фармакологических методов исследований. Была проведена корректная статистическая обработка данных, которая позволила сделать выводы о достоверности полученных результатов в диссертационной работе.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, включая 5 журнальных статей (из них 5 статей в журналах Scopus).

Личный вклад автора

Вклад автора выполненного диссертационного исследования осуществлялся на всех этапах работы и состоял в планировании и подготовке экспериментальной части, в непосредственном выполнении экспериментов, в получении и анализе полученных результатов, в их обсуждении и написании научных публикаций (статей и тезисов), написании рукописи текста диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Система toll-подобных рецепторов

Последнее десятилетие ознаменовалось открытием большого количества образраспознающих рецепторов (PRR, pattern recognition receptors) и интенсивным их изучением. Они выявлены у всех многоклеточных организмов, начиная от беспозвоночных (например, губки) и заканчивая млекопитающими и человеком (Кокряков В.Н., 2006; Кетлинский С.А., 2008; Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017). На сегодняшний день известно 5 семейств сигнальных PRR: Toll-подобные рецепторы (TLRs), лектиновые рецепторы С-типа, рецепторы-мусорщики, NOD-подобные рецепторы и CARD хиликазы (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017). Все PRR специфически соединяются с различными молекулярными структурами микроорганизмов, включая бактерии, грибы, вирусы, одноклеточные простейшие. PRR специфически реагируют и на ряд веществ растительного происхождения и сложные синтетические молекулы. Все эти соединения служат их экзогенными лигандами. PRR способны специфически реагировать и на ряд веществ собственного организма – эндогенные лиганды (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017).

Наиболее хорошо изучено семейство TLRs. У человека обнаружено 10, у мыши 13 представителей данного типа (TLR1-TLR13) (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017, Yamamoto M., et al., 2002). Все TLRs имеют сходное строение и представляют собой интегральные трансмембранные белки, состоящие из 3-х частей, различающихся по своим функциям. Внеклеточная N-концевая область, ответственная за связывание лиганда, имеет 19-25 повторяющихся лейцин-богатых участков. За ним следует переходный участок, обогащенный цистеином, который отвечает за прикрепление рецептора к белкам мембраны. И, наконец, цитоплазматический участок, представленный TIR-доменом (Toll/IL-1-рецептор), осуществляет взаимодействие между TLRs и адапторными белками, приводя в

действие внутриклеточные сигнальные каскады реакций (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017) (Таблица 1).

Таблица 1 – Адапторные белки TLR (Murphy K., et al., 2017)

Рецептор	Адапторный белок
TLR1/TLR2	Myd88/TIRAP
TLR3	TRIF
TLR4	Myd88/ TIRAP; TRIF/TRAM
TLR2/TLR6	Myd88/ TIRAP
TLR7	Myd88
TLR8	Myd88
TLR9	Myd88
TLR11/TLR12	Myd88
TLR13	Myd88

В ЦНС экспрессируются все подтипы TLRs и распределены следующим образом: TLR1-TLR9 экспрессируются клетками микроглии, TLR3 и TLR7-9 экспрессируются нейронами, TLR2-3 и TLR9 астроцитами, TLR2-3 олигодендроцитами (Hanke M.L., et al., 2011; Esen N., et al., 2009; Алексеева О.С., 2019) (Рисунок 1).

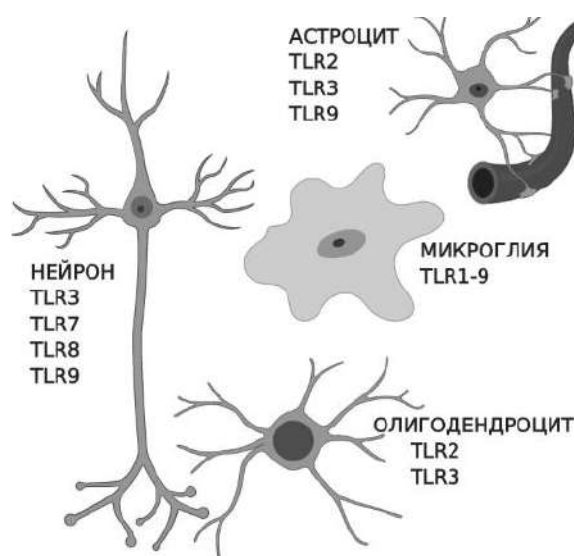


Рисунок 1 – Экспрессия TLR в ЦНС
(Айрапетов М.И. и др., 2021)

При этом важно отметить, что TLR1-2 и TLR4-6 локализируются на поверхности цитоплазматической мембраны, а TLR 3, 7-13 выявляются на эндосомах внутри клетки (Leifer C.A., et al., 2016; Nie L., et al., 2018).

1.2 Сигнальные каскады реакций TLR

Все TLR функционируют как димеры. При этом TLR2 образует гетеродимеры с TLR1 или TLR6, а TLR11 с TLR12. TLR3-5, 7-9 и TLR13 образуют гомодимеры (Akira S., et al., 2004). После распознавания лиганда (Таблица 2) происходит димеризация TLR с образованием гетеродимера или гомодимера, после чего происходят конформационные изменения рецептора, необходимые для взаимодействия цитоплазматического TIR-домена с внутриклеточными адапторными белками и последующей активации каскада реакций внутриклеточной сигнализации (Akira S., et al., 2004).

Самый распространённый случай, когда TIR-домен рецептора TLR связывается с адапторным белком MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88). MyD88 взаимодействует с киназами семейства IRAK (IL-1 receptor associated kinase); семейство состоит из нескольких ферментов: IRAK1-4 и IRAK-M. Вначале активируется киназа IRAK4, после IRAK1. Активация последней приводит к ее взаимодействию с фактором TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Этот фактор может запускать два пути передачи сигнала: 1) активация фактора транскрипции AP-1 посредством MAP-киназ (mitogen-activated protein kinase), JNK-киназ (c-Jun N-terminal kinases) и p38; 2) активация комплекса TAK1/TAB и IKK (I κ B kinase). После активации IKK происходит фосфорилирование и деградация ингибиторного белка I κ B, что приводит к освобождению димера NF- κ B и его последующей транслокации в ядро, где NF- κ B связывается с промоторными участками генов, активирующих и регулирующих развитие воспалительной реакции. Такой внутриклеточный сигнальный механизм функционирует при активации почти всех известных TLRs, за исключением TLR3. Это указывает на то, что разные патогены, активирующие различные TLRs, инициируют в принципе единый универсальный

путь активации воспалительной реакции (Лебедев К.А., Понякина И.Д. (2017)). TIR-домен TLR3 и TLR4 может взаимодействовать с адапторным белком TRIF (TIR-domain containing adaptor inducing IFN β) (Smith K.M., et al., 2000). Белок TRIF активирует TRAF6 и TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3). В результате этого происходит активация внутриклеточного фактора TBK1 (TANK-binding kinase 1) и затем IRF3 (Interferon regulatory factor 3). Активированный IRF3 запускает экспрессию генов IFN β и IFN α , необходимых для развития противовирусного ответа (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017).

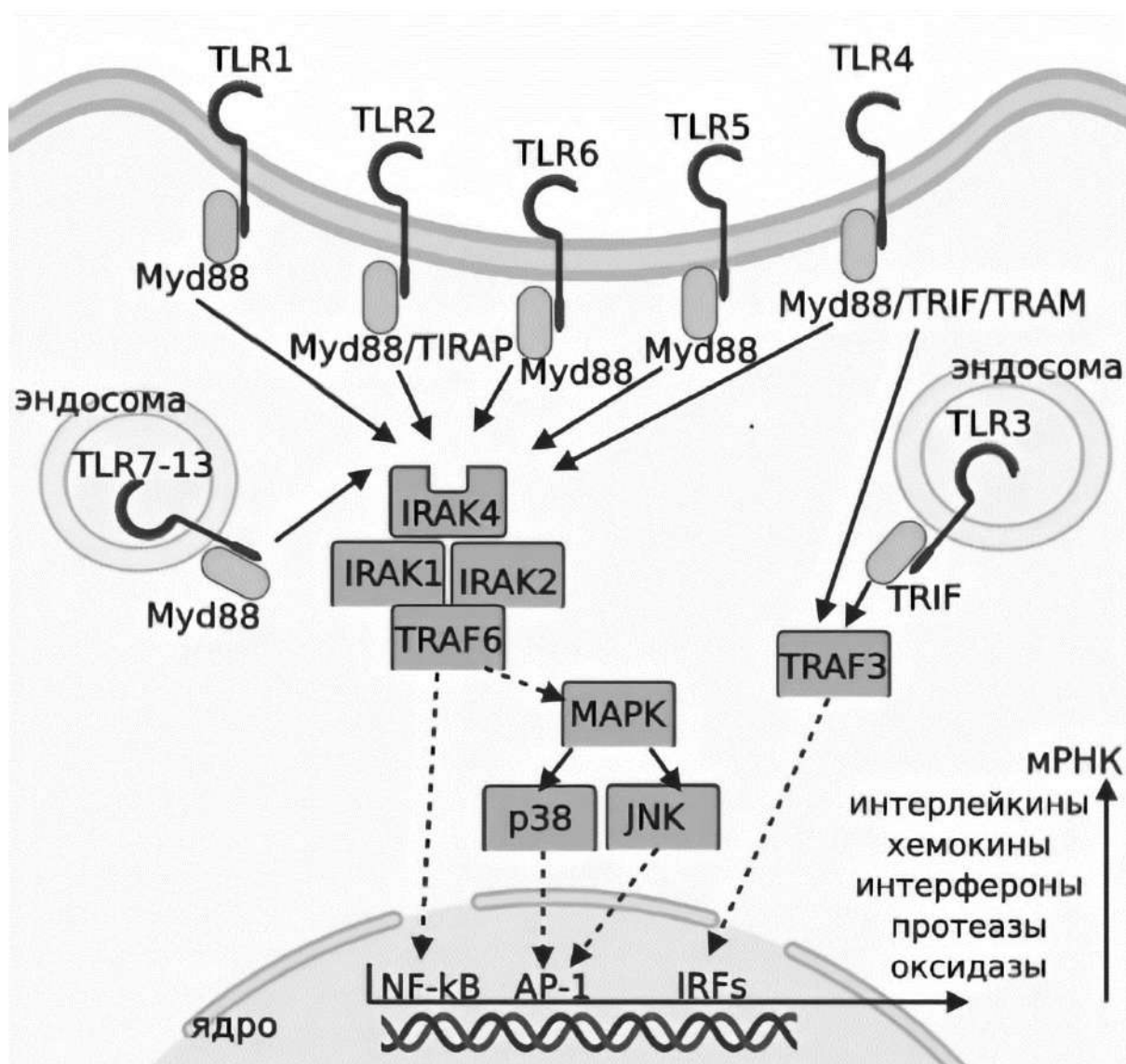


Рисунок 2 – Сигнальные каскады реакций TLR
(Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017).

Кроме перечисленных, идентифицирован ряд и других адапторных белков, необходимых для проведения сигнала от определенных TLR. Белок TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) участвует вместе с MyD88 в проведении сигнала от TLR2 и TLR4, но не от других TLR (Sinch-Jasuja H., et al., 2001). Адапторный белок TRAM (TRIF-related adaptor molecule), взаимодействующий с TRIF, используется для проведения сигнала от TLR4 (Fitzgerald K., et al., 2003).

Более того, активация TLRs приводит к запуску нескольких внутриклеточных сигнальных путей. В результате возникают сложные внутриклеточные каскады реакций, которые могут обуславливать как усиление, так и торможение конечного эффекта экспрессии цитокинов. Так, например, активация TLR3 и TLR4 может усилить экспрессию TLR2 на поверхности макрофагов Myd88-независимым способом, тогда как возбуждение TLR7 и TLR9 вызывают его экспрессию Myd88-зависимым способом (Nilsen N., et al., 2004). Активация TLR4 может положительно регулировать TLR2, TLR4 и TLR9 (Fitzgerald K., et al., 2003). Такое регулирование (TLR-TLR) часто приводит к усилению иммунного ответа, привлекая большее количество TLRs, однако начальная стимулирующая доза и время активации второго TLR, участвующего в процессе, могут оказывать существенное влияние на иммунный ответ (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017; Nilsen N., et al., 2004; An H., et al., 2006; Lee M.C., et al., 2007; Napolitani G., et al., 2005). Помимо этого, разные подтипы TLRs могут совместно формировать синергетический эффект или формировать обратные реакции по отношению к другому TLR. Стимуляция дендритной клетки агонистом TLR2 противодействует экспрессии IL10 и IL12, которая инициируется агонистами TLR3 и TLR4. TLR8 ингибирует TLR7 и TLR9, а TLR9 ингибирует TLR7 в результате прямых или опосредованных взаимодействий между ними (Wang J., et al., 2006).

Таблица 2 – Лиганды TLRs (Volkov M.Y., 2016; Takagi M., et al., 2017; Jang T.H., et al., 2015; Murphy K et al., 2017)

Рецептор	Экзогенные лиганды	Эндогенные лиганды
TLR1	Триацетилированные пептиды	Неизвестны
TLR2	Зимозан, диацетилированные пептиды, триацетилированные пептиды, липотейхоевая кислота	rHSP70, gp96, HMGB1, мочевая кислота, гиалуроновая кислота, α -синуклеин
TLR3	Двухцепочечные РНК (dsRNA), поли (I:C)	мРНК, статмин
TLR4	Липополисахарид (ЛПС)	HMGB1, HSP60, HSP70, HSP72, гиалуроновая кислота, фибриноген, белок S100, мочевая кислота, гепарансульфатные фрагменты, тенасцин-с
TLR5	Флагеллин	Неизвестны
TLR6	Зимозан, диацетилированные пептиды, триацетилированные пептиды, липотейхоевая кислота, липоарабиноман	Неизвестны
TLR7	Имиквимод, гардиквимод, одноцепочечные РНК (ssRNA), miRNAs let-7, microRNA-21, имидазохиолин, локсорибин, бропиримин	Неизвестны
TLR8	Одноцепочечные РНК (ssRNA), ssRNA40/Lyovesc, гардиквимод	Неизвестны
TLR9	ДНК с неметилированными олигодезоксинуклеотидами CpG	Комплексы хроматин-IgG
TLR10*	Двухцепочечные РНК (dsRNA)	Неизвестны
TLR11**	Профилин и профилин-подобные белки	Неизвестны
TLR12**	Профилин	Неизвестны
TLR13**	Одноцепочечные РНК (ssRNA)	Неизвестны

* - обнаружен только у человека, ** - обнаружен только у мышей

1.3 Участие toll-подобных рецепторов в нейроиммунных механизмах при воздействии этанола

Употребление этанола способствует активации системы врожденного иммунитета посредством TLR (Рисунок 3), что выражается в повышении уровня ряда провоспалительных сигнальных молекул (Цыган, В.Н., 2007; Газатова Н.Д., 2018; Crews F.T., et al., 2017; Ветлугина, Т.П., 2023). Из TLRs в контексте патогенеза алкоголизма в литературе наибольшее внимание уделяется TLR3, TLR4, TLR7 (Crews F.T., et al., 2011, 2013, 2014, 2015, 2017; Hanke M.L., et al., 2011; Qin L., et al., 2012; Okun E., et al., 2009; Coleman L.G., et al., 2017; Pascual M., et al., 2015; Qin L., et al., 2007).

Повышенный уровень провоспалительных цитокинов играет важную роль в развитии состояния нейротоксичности с последующей гибелью множества клеток в ЦНС. В то время как микроглия считается основным источником провоспалительных цитокинов в ЦНС, окончательно не выяснено, какую роль играют нейроны в цепи нейроиммунной сигнализации, вызванной этанолом (Lawrimore C.J., et al., 2017; Алексеева О.С., 2019). Активность TLRs зависит от уровня экзогенных и эндогенных лигандов, которыми они активируются. Потребление этанола сопровождается увеличением уровня эндогенных лигандов, в частности, HMGB1 (Crews F.T., et al., 2017), белки теплового шока (Vabulas R.M., et al., 2002), белки распада внеклеточного матрикса (Wang J., et al., 2006), различные варианты микро-РНК (Volkov M.Y., 2016; Takagi M., et al., 2017; Jang T.H., et al., 2015; Murphy K., et al., 2017). Эндогенные лиганды высвобождаются в ответ на активацию воспалительного процесса в мозге и в ходе апоптотических повреждений клеток в ЦНС (Crews et al., 2011, 2013, 2014, 2015, 2017). Экзогенные лиганды и различные цитокины могут транспортироваться с током крови в ЦНС с периферии (Crews F.T., et al., 2015).

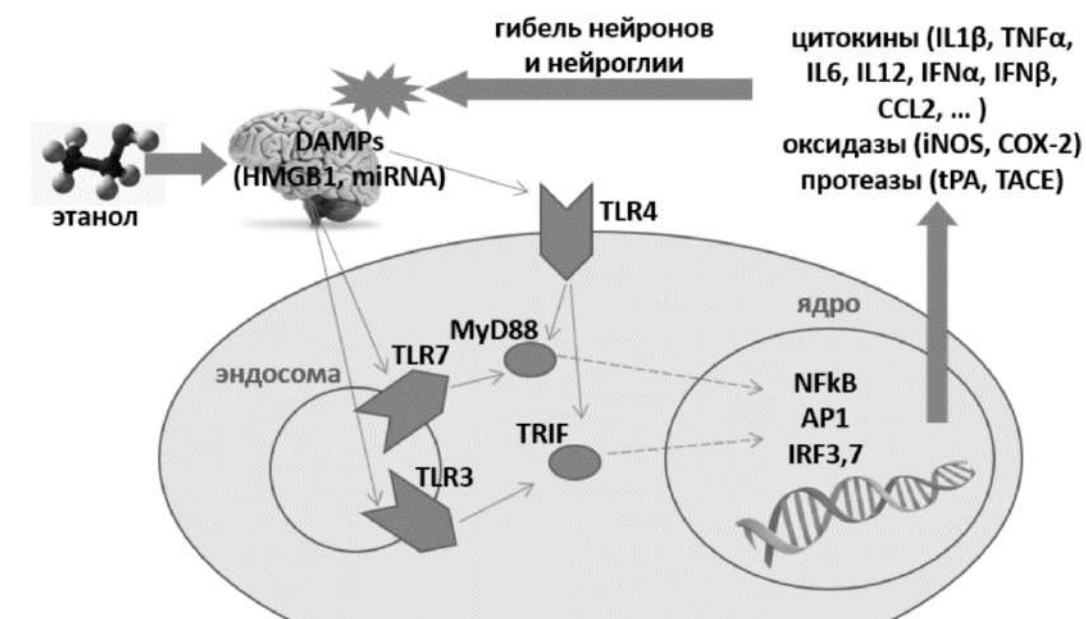


Рисунок 3 – Гипотетические представления о воздействии этанола на систему toll-подобных рецепторов в головном мозге

1.3.1 Роль TLR3 в патогенезе алкоголизма

Повышенный уровень мРНК TLR3 был отмечен и в посмертных образцах орбифронтальной коры головного мозга людей, страдающих алкоголизмом (Crews F.T., 2013). Имеются данные, которые указывают на то, что TLR3-зависимая сигнализация оказывает влияние на уровень добровольного потребления этанола в экспериментах на грызунах (McCarthy G.M., et al., 2018; Warden A.S., et al., 2019). Алкоголизация мышей в течение 10 дней приводит к увеличению уровня мРНК TLR3 в головном мозге мышей, а также к увеличению уровня экспрессии белка TLR3 в орбифронтальной и энторинальной коре (Crews F.T. et al., 2013).

Однократное введение внутривенно агониста TLR3, поли (I:C) (полиинозиновая-поли-цитидиловая кислота – синтетический аналог двухцепочечной РНК вирусов), мышам приводит к увеличению уровня добровольного потребления этанола в двухпоилочном тесте, при этом повышение уровня потребления этанола развивается в течение нескольких дней (Warden A.S., et al., 2019).

Исследуя последствия применения поли (I:C) на экспрессию генов в прилежащем ядре (nucleus accumbens, NA) мозга крыс, было показано, что

активация агонистом TLR3 приводит к увеличению уровня мРНК TLR3, COX2 (cyclooxygenase 2) и генов глутаматергической системы (mGluR2 – metabotropic glutamate receptor 2; mGluR3; GLT1 – glutamate transporter 1), а также гена BDNF (brain-derived neurotrophic factor). При этом увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением мРНК TLR3 (Randall P.A., et al., 2019).

Применение поли (I:C) приводит в префронтальной коре мозга мышей к повышению экспрессии ряда провоспалительных генов (CCL5, CCL2, IL-1b, IL-6 и др.). При этом, когда свободный доступ к этанолу предоставлялся мышам во время пиковой активации провоспалительного ответа, уровень добровольного потребления этанола мышами снижался и не изменялся, когда доступ к этанолу был предоставлен мышам на нисходящем пути активации врожденной иммунной системы. Данные результаты позволяют предположить, что постепенное повышение воспалительного ответа может опосредованно вносить свой вклад в увеличение уровня влечения к алкоголю у мышей. Тем самым авторы делают вывод, что *конкретные пути и баланс между цитокинами могут регулировать уровень тяги к алкоголю* (Warden A.S., et al., 2019).

В модели 10-дневной алкоголизации мышей этанолом однократное введение агониста TLR3 поли (I:C) приводило к увеличению уровня мРНК TRAIL в орбитофронтальной и в энторинальной коре головного мозга мышей (Lawrimore S.J., et al., 2019). В работе на культурах клеток было показано, что добавление этанола вызывает активацию TLR3, что способствует высвобождению IFN β (interferon-beta) и IFN γ (interferon-gamma) нейронами и астроцитами. При этом была отмечена повышенная активность гена TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) после внесения в культуру клеток поли (I:C). Блокирование гена TRAIL приводило к снижению уровней IFN β и IFN γ как в астроцитах, так и в нейронах. Исследуя же совместное действие этанола и агониста TLR3 (поли (I:C)), было показано увеличение уровней мРНК TNF- α , IL-1 β и IL-6, а также увеличение уровней белков p38 и IRF3 в культурах клеток микроглии и нейронов (Lawrimore S.J., et al., 2019).

В одной из работ было показано, что мРНК TLR3 и компоненты TRIF-зависимого пути были повышены в префронтальной коре мозга мышей через 24 часа после отмены этанола. Экспрессия связанных с TLR3 и компонентов TRIF-зависимого пути увеличилась в прилежащем ядре, но при этом уменьшилась в миндалевидном теле. Кроме того, Amlexanox, ингибитор комплекса ИКК ϵ /TBK1, снижает иммунную активацию TRIF-зависимого пути в мозге и уменьшает потребление этанола. Таким образом, было сделано предположение, что *TRIF-зависимый путь регулирует уровень потребления этанола* (Liu J., et al., 2011).

Снижение активности MyD88-зависимого пути коррелирует с уменьшенным потреблением этанола и повышенными уровнями TRIF-зависимого пути. С целью проверки опосредованного действия поли (I:C) через MyD88 использовали самок мышей нокаутных по гену Myd88 и показали, что введение поли (I:C) не изменял уровня потребления алкоголя у нокаутов Myd88, что указывает на то, что вызванные поли (I:C) изменения в потреблении алкоголя зависят от MyD88-зависимого пути (Warden A.S., et al., 2019).

Исходя из экспериментальных данных, выполненных на различных модельных объектах, можем сделать вывод о том, что TLR3 играет важную роль в патогенезе алкоголизма, однако точные механизмы TLR3-зависимой сигнализации остаются все еще окончательно неустановленными.

1.3.2 Роль TLR4 в патогенезе алкоголизма

Наибольшее количество работ направлено на изучение вовлеченности TLR4 в механизмы активации провоспалительной сигнализации в результате потребления этанола (Pascual M., et al., 2015; Blednov Y.A., et al., 2017; Harris R.A., et al., 2016; June H.L., et al., 2015) (Рисунок 4).

Большое количество данных получено на крысах и мышах с применением генетических и фармакологических манипуляций (нокаут TLR4 и применение антагонистов), которые показали, что *активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола*, но наблюдаются изменения TLR4-опосредованного

сигналинга впоследствии употребляемого алкоголя (Blednov Y.A., et al., 2017; Harris R.A., et al., 2016).

Исследование на мышах показало, что употребление этанола мышами в течение 2 недель привело к активации TLR4-зависимых провоспалительных процессов, которые характеризовались активацией MAP-киназ и NF- κ B с последующим выделением COX-2 (Cyclooxygenase 2) iNOS (Inducible nitric oxide synthase), HMGB1 (high-mobility group protein B1). 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 (Montesinos J., et al., 2015). Нокаунт же гена TLR4 ингибирует продукцию провоспалительных медиаторов, блокируя активацию MAP-киназ и NF- κ B путей в астроцитах (Alfonso-Loeches S., et al., 2010). На нокаутных мышах по гену TLR4, было показано, что такие мыши защищены от вызванного этанолом в течение 5 мес. повышения уровня концентрации цитокинов и хемокинов в мозге, тогда как наличие гена TLR4 приводит к увеличению концентрации цитокинов (IL-1 β , IL-17, TNF- α) и хемокинов (MCP-1, MIP-1 α , CX3CL1) в крови и в стриатуме мозга мышей (Pascual M., et al., 2015).

Было показано, что этанол приводит к накоплению в коре головного мозга полиубиквитинированных форм белков и способствует активации работы иммунопротеасом и аутофаголизосом (Sinch-Jasuja H., et al., 2001). Мыши, не имеющие рецепторов TLR4, защищены и в этом случае были от вызванных этанолом таких изменений (Pla A., et al., 2014).

Имеются данные о том, что TLR4/MCP-1-опосредованный сигналинг в миндалевидном теле и вентральной тегментальной области (ventral tegmental area, VTA) делает крыс предрасположенными к повышенному уровню потребления этанола. Такой сигналинг поддерживается повышенной экспрессией кортикотропин-рилизинг фактора (CRF), который способен оказывать обратную

регуляцию TLR4 (June H.L., et al., 2015). Кроме того, имеются данные, что уровень MCP-1 с одновременным повышением уровня активности микроглии увеличиваются в VTA, миндалевидном теле, черной субстанции и в гиппокампе у людей, страдающих алкоголизмом (He J., et al., 2008).

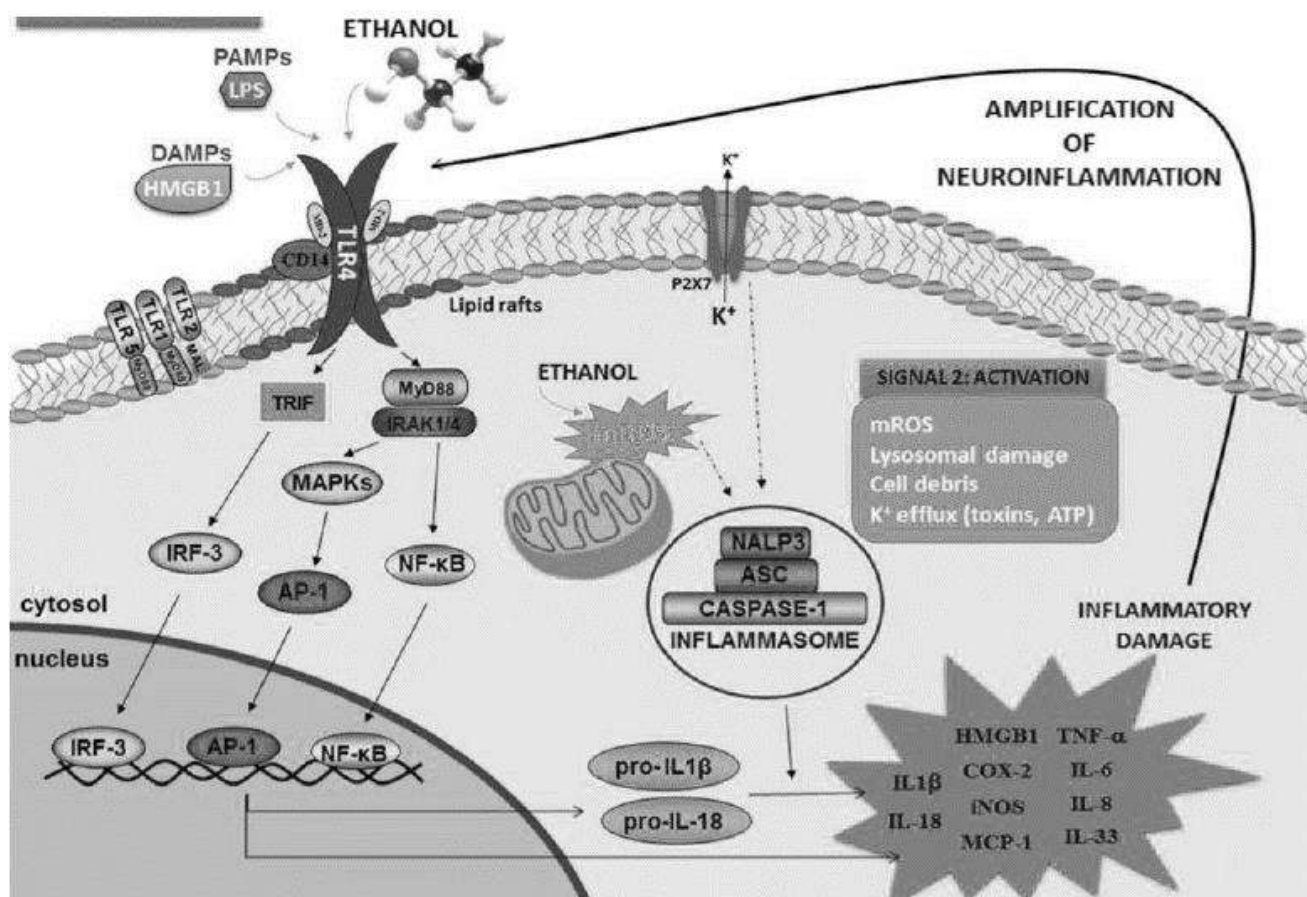


Рисунок 4 – Активация нейровоспалительного процесса посредством TLR4 (Montesinos J., 2016).

Предполагается, что TLR4-MyD88-зависимый сигналинг опосредует острые депрессивные расстройства, которые развиваются впоследствии потребления этанола, а также может быть вовлечен в регуляцию ГАМК-ергической трансмиссии в ЦНС (Blednov Y.A., et al., 2017). В одной из работ крысы, нокаутированные по гену TLR4, уменьшили уровень добровольного потребления алкоголя. Авторы данной работы предполагают, что это было связано со снижением экспрессии субъединицы GABA_A α2 в миндалевидном теле крыс (Liu J., et al., 2011).

Внутрибрюшинное введение лиганда TLR4 LPS (lipopolysaccharide, липополисахарида) ускоряет развитие тревожного поведения у животных, впоследствии подвергающихся воздействию этанола (Breese G.R., et al., 2008). Мыши, лишённые TLR4 или MyD88 становились менее чувствительными к седативным и опьяняющим эффектам от этанола, тогда как мыши лишённые TLR2 не отличались от контрольных мышей в этих тестах (Breese G.R., et al., 2008).

Все это указывает на то, что *TLR4, возможно, могут опосредованно взаимодействовать с рецепторами нейромедиаторов (или другими мишенями), регулируя опосредованно уровень потребления этанола.*

1.3.3 Роль TLR7 в патогенезе алкоголизма

Помимо уже описанных TLR3 и TLR4 имеется небольшое количество исследований, направленных на изучение TLR7 в патогенезе алкоголизма. Так, экспрессия TLR7 повышена в гиппокампе человека в посмертных образцах мозга (Coleman L.G., et al., 2017). Имеются сведения о том, что этанол вызывает секрецию агониста TLR7 (miRNA let-7b), что приводит к TLR7-опосредованной активации нейродегенеративных процессов в ЦНС (Coleman L.G., et al., 2017). Для оценки влияния этанола на TLR7 и let-7b использовали культуру среза гиппокампо-энториальной коры (HEC) крыс. В исследовании сообщается, что ткань алкоголизированного гиппокампа имеет повышенную экспрессию TLR7 (Coleman L.G., et al., 2017). Было обнаружено, что этанол вызывает образование комплексов HMGB1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта через активацию TLR7 (Coleman L.G., et al., 2017). Этанол вызывает увеличение экспрессии TLR7 и высвобождение let-7b и HMGB1 из микроглии. Ингибирование HMGB1 глицирризином предотвращало развитие нейротоксичности (Coleman L.G., et al., 2017).

1.4 Участие HMGB1 в нейроиммунных механизмах при алкоголизации

Большая роль уделяется белку HMGB1 как критическому фактору, вовлеченному в механизмы индукции генов врожденной иммунной системы после поступления этанола, что может способствовать развитию не только воспалительного процесса в мозге, но также изменять функциональность нейромедиаторных систем мозга (Lewohl J.M., et al., 2000; Valles S.L., et al., 2004; Crews F.T., et al., 2011, 2013, 2014, 2017; Esen N., et al., 2009; Okun E., et al., 2009), приводить к нейротоксическому эффекту с последующей нейродегенерацией (Айрапетов М.И., et al., 2020, 2021; Becker H.C., 2014; Blednov Y.A et al., 2011; Qin L., et al., 2013; Lawrimore C.J., et al., 2017; Fernandez-Lizarbe S., et al., 2009) (Рисунок 5).

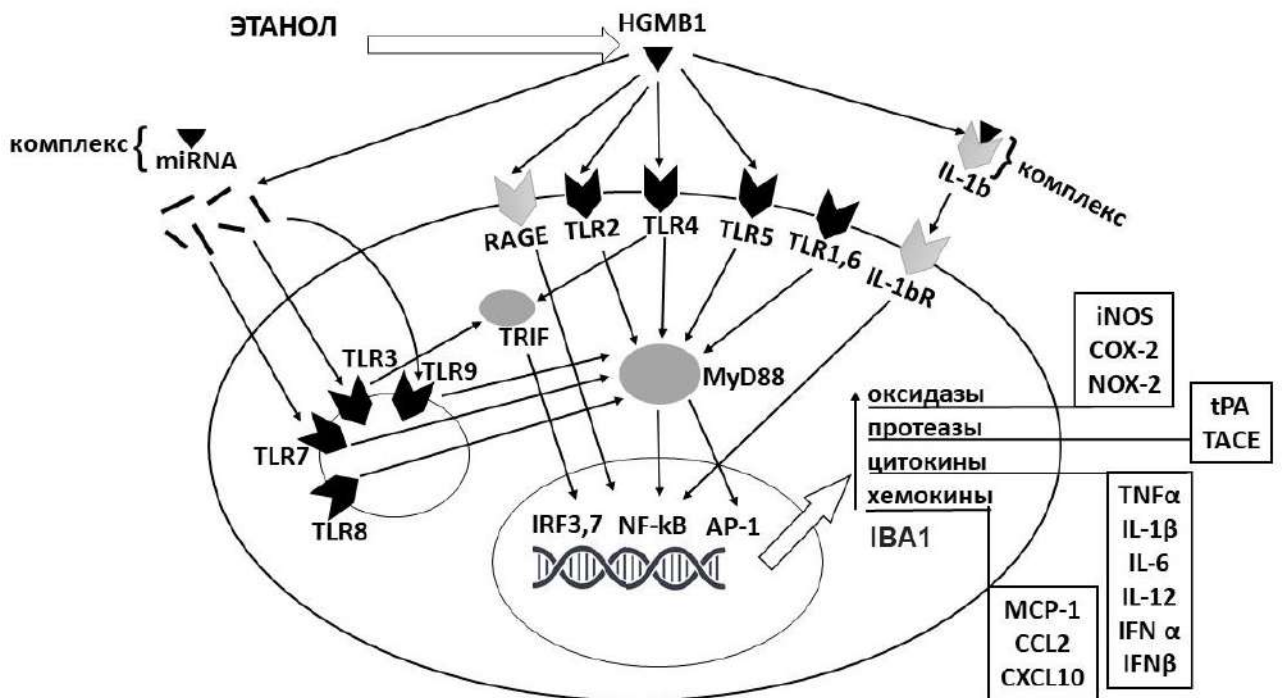


Рисунок 5 – Роль белка HMGB1 во внутриклеточном сигналинге
(Айрапетов, М.И., 2019)

Исследования показывают, что потребление этанола является причиной повышенного уровня экспрессии HMGB1 и TLR в головном мозге (Leifer C.A., et al., 2016).

HMGB1 секретируется большинством клеток головного мозга (Pascual M., et al., 2011). Показано, что нейроны и клетки глии выпускают HMGB1 во время возбуждения рецепторов глутамата (Zou J., et al., 2012). Известно, что длительное потребление алкоголя сопровождается эксайтотоксическим эффектом глутамата (Crews F.T. et al., 2013, 2015; Vetreno R.P., et al., 2014). Возможно, именно эксайтотоксичность и является одной из причин повышенного уровня экспрессии HMGB1 при длительном воздействии этанола.

Исследование на культурах клеток гиппокампаально-энторинальной коры цитометрическим методом показало, что HMGB1 высвобождается в основном клетками микроглии и в меньшей степени клетками астроглии и нейронами. Высвобождаясь во внеклеточное пространство, HMGB1 способен связываться с мембранными рецепторами микроглии, такими как TLR-2, TLR-4, TLR-5, а также с TLR-2 астро- и олигодендроцитов. Активация данных рецепторов приводит к запуску внутриклеточных каскадов реакций, результатом чего служит активация транскрипционных факторов, таких как NF- κ B, IRF-3 и IRF7, AP1 с последующей экспрессией ряда цитокинов, хемокинов, оксидаз и протеаз (см. рисунок) (Yamamoto M., et al., 2002; Шабанов П.Д., et al., 2008; Walter T.J., et al., 2017; Crews F.T., et al., 2000; Qin L., et al., 2013; Lawrimore C.J., et al., 2017; Alfonso-Loeches S., et al., 2011; Fernandez-Lizarbe S., et al., 2009; Yamamoto M., et al., 2002; Vabulas R.M., et al., 2002).

Известно, что длительное употребление алкоголя активирует микроглию и астроциты (Fernandez-Lizarbe S., et al., 2009), повышает экспрессию цитокинов, хемокинов, оксидаз и других генов врожденной иммунной системы в мозге мышей (Alfonso-Loeches S., et al., 2011; Fernandez-Lizarbe S., et al., 2009). В эксперименте на мышцах с использованием агониста TLR4 липополисахарида было показано устойчивое увеличение экспрессии белка и мРНК TNF α в мозге, которая сохранялась в течение 10 мес. после отмены алкоголя (Lawrimore C.J., et al., 2017).

Аналогично в эксперименте при 10-ти дневной алкоголизации мышей этанолом устойчиво повышало уровень цитокина MCP-1 (он же CCL2) в головном мозге в течение не менее 7 дней после окончания приема этанола. MCP-1 является наиболее мощным фактором хемотаксиса моноцитов в организме млекопитающих, осуществляет контроль за выходом клеток из кроветворных органов, их транспорту к месту воспаления (Alfonso-Loeches S., et al., 2011).

Результаты на крысах показали, что этанол приводит к длительной активации механизмов врожденной иммунной сигнализации в префронтальной коре, которая коррелирует с нейрокогнитивными дисфункциями (Leifer C.A., et al., 2016).

Выполненные исследования на грызунах в условиях алкоголизации этанолом и на посмертных образцах мозга человека, страдающего алкоголизмом, показывают повышенную экспрессию HMGB1 и toll-подобных рецепторов в префронтальной коре мозга (Leifer C.A., et al., 2016; Yamamoto M., et al., 2002), гиппокампе (Айрапетов М.И., et al., 2020; Шабанов П.Д. Калишевич С.Ю., 1998; Yamamoto M., et al., 2002) и мозжечке (Zou J., et al., 2010; Yamamoto M., et al., 2002).

В исследованиях, выполненных на посмертных образцах префронтальной коры мозга людей, страдающих алкоголизмом, показали повышенные уровни HMGB1, а также рецепторов TLR2, TLR3 и TLR4 (Шабанов П.Д., и др. 2008) и рецептора RAGE (Nie L., et al., 2018).

В эксперименте на крысах подросткового и взрослого возраста было показано, что воздействие этанола в подростковом возрасте приводит к длительному увеличению уровня экспрессии TLR4 и TLR3 в префронтальной коре мозга крыс, сохраняясь при этом и во взрослом мозге. Стоит также отметить, что TLR3 были локализованы в слоях 2 и 3 префронтальной коры. Повышенный уровень экспрессии TLR4 и TLR3 коррелировал в префронтальной коре животных с развитием когнитивных дисфункций, при исследовании процессов обучения и памяти с помощью теста Барнса (Leifer C.A., et al., 2016).

Воздействие этанола в подростковом возрасте увеличивает экспрессию TLR4 и HMGB1 в орбитофронтальной коре, которая длительно сохраняется и отмечается в последствии во взрослом мозге крыс. Отмечается также повышенная экспрессия

провоспалительных цитокинов, оксидаз и других врожденных иммунных генов в орбифронтальной коре взрослого человека через 25 дней после последнего воздействия этанола, таких как $TNF\alpha$, MCP-1, NOX2, COX2, фибронектин, S100 β , а также MyD88. Уровень iNOS оставался неизменным. При этом уровни экспрессии HMGB1 и TLR4 в орбифронтальной лобной коре (OFC) коррелируют с уровнем потреблением алкоголя. Исследования на посмертных образцах мозга людей, страдающих алкоголизмом, также обнаруживают повышенную экспрессию HMGB1, TLR2, TLR3 и TLR4 (Leifer C.A., et al., 2016).

Также показано, что у молодых женщин, регулярно употребляющих алкоголь, наблюдается повышенное содержание HMGB1 в плазме крови (Айрапетов М.И. и др., 2018).

Исследование уровня мРНК рецепторов TLR2, TLR4, TLR9 и RAGE в мозжечке мышей, алкоголизированных в течение 5 мес., показало значительное увеличение экспрессии рецепторов, также был повышен уровень мРНК HMGB1 в сравнении с группой контроля (Zou J., et al., 2010).

Воздействие алкоголя в течение 5 недель повышает иммунореактивность воспалительного фактора аллотрансплантата 1 (AIF-1) в лобной коре, миндалинах, гиппокампе, черной субстанции и мозжечке. При этом уровень AIF-1 остается повышенным спустя 28 дней после отмены алкоголя в лобной коре, миндалинах и в черной субстанции (Yamamoto M., et al., 2002).

Последние работы, выполненные методом иммунопреципитации РНК показали, что белок HMGB1 способен образовывать комплексы с молекулами микро-РНК let-7b (HMGB1-let-7b) в микровезикулах, выделенных из срезов головного мозга (Айрапетов М.И. и др., 2020). Выполненная ко-иммунопреципитация для HMGB1 и IL-1 β на посмертных образцах гиппокампа людей, страдающих алкоголизмом, позволила обнаружить подобные комплексы. Известно, что HMGB1 увеличивается в печени при длительной алкоголизации, однако комплексов HMGB1 – IL-1 β там обнаружено не было. На данный момент сложно сделать вывод о физиологической роли данных комплексов, но, вероятно,

они вносят свой вклад в нейроиммунную сигнализацию мозга (Шабанов П.Д. Калишевич С.Ю., 1998).

Из всего выше сказанного хочется отметить то, что во всех экспериментах исследователи брали во внимание в основном только структуры префронтальной коры мозга, несколько исследований было сосредоточено на гиппокампе и мозжечке. Однако роль HMGB1 в других структурах мозга остаётся неизученной.

1.5 Участие молекул микро-РНК в реализации нейроиммунных механизмов при алкоголизации

Ряд исследователей отмечают изменения в содержании молекул микро-РНК (miR) в плазме крови и в ряде структур головного мозга при длительном воздействии алкоголя на организм (Lim Y., et al., 2021; Перегуд Д.И., и др., 2022). Микро-РНК – класс малых некодирующих РНК, которые, чаще всего, нацеливаясь на мРНК могут участвовать в механизмах синтеза белка в клетке. Помимо этой общеизвестной опосредованной регуляторной роли, молекулы miR также могут выступать в качестве физиологических специфических лигандов к toll-подобным рецепторам (TLR) и инициировать сигнальные каскады иммунного ответа (Bayraktar R., et al., 2019).

Имеются сведения, что многие из молекул miR потенциально могут контролировать ключевые механизмы, определяющие развитие нейровоспаления и нейродегенерации в результате длительного употребления алкоголя (Lim Y., et al., 2021; Lehmann S.M., et al., 2012; Lippai D., et al., 2013; Coleman L.G., et al., 2017; Ureña-Peralta J.R., et al., 2018, 2020). Известно, что некоторые подтипы TLR также связаны с развитием нейровоспалительных и нейродегенеративных событий в головном мозге при длительном употреблении алкоголя (Lim Y., et al., 2021; Lehmann S.M., et al., 2012; Lippai D., et al., 2013; Coleman L.G., et al., 2017; Ureña-Peralta J.R., et al., 2018, 2020). В ряде исследований сообщается о возможной функциональной взаимосвязи между miR-let7b, miR-96, miR-182, miR-155 и TLR в ЦНС (Lehmann S.M., 2012; Lippai D., 2013; Coleman L.G., 2017; Ureña-Peralta J.R.,

2018, 2020). В связи с этим представляется интересным оценить уровень этих микро-РНК и экспрессию генов TLR в Nac в условиях алкоголизации у крыс, что и послужило целью данного исследования.

Из литературных данных известно, что исследуемые нами miR могут иметь функциональную взаимосвязь с сигнальными путями toll-подобных рецепторов (TLR7 и TLR4), которые участвуют в инициации нейровоспалительных событий, развивающихся при хронической алкоголизации (Lim Y., et al., 2021; Lehmann S.M., et al., 2012; Lippai D., et al., 2013; Coleman L.G., et al., 2017; Ureña-Peralta J.R., et al., 2018, 2020). Известно, что miR-let7b является эндогенным агонистом TLR7 (Lehmann S.M., 2012; Айрапетов М.И., 2020). Изменение экспрессии miR-let7b может иметь функциональную взаимосвязь с TLR7-сигнальным каскадом реакций (Lehmann S.M., 2012; Coleman L.G., et al., 2017; Айрапетов М.И. и др., 2020). Описано, что при активации TLR4 наблюдается повышение miR-155 в микроглии головного мозга мышей, тогда как у нокаутных по гену *Tlr4* (TLR4-КО) этого не наблюдается (Lippai D., et al., 2013). У мышей TLR4-КО не изменяется содержание miR-96 коре головного мозга, тогда как длительная алкоголизация у мышей дикого типа снижала в уровень miR-96 (Ureña-Peralta J.R. et al., 2018, 2020).

1.6 Новые потенциальные подходы нейроиммунной терапии алкоголизма

Нейроиммунная терапия, вероятно, не принесет пользы там, где уже произошли серьёзные нейродегенеративные изменения. Однако нейроиммунная терапии могла бы помочь в предотвращении острого ответа сигналов врожденной иммунной системы, которые могут стать причиной нейротоксического повреждения мозга. На данный момент уже существуют фармакологические препараты, которые имеют иммуномодулирующие эффекты в головном мозге, такие как миноциклин (микроглиальный ингибитор), рапамицин (ингибитор mTORC1), азитромицин (микроглиальный ингибитор), рифампин (ингибитор TLR4), индометацин (ингибитор COX-2), симвастатин (ингибитор NF-κB), пиоглитазон (агонист PPARγ), налтрексон (ингибитор TLR4), этанерцепт

(антагонист $\text{TNF}\alpha$), амлексанокс (ингибитор ИКК/ТБК1), глициризин (ингибитор HMGB1) (Coleman L.G., et al., 2018).

1.6.1. Глициризин

Глициризин (GL) находится в больших количествах в корнях солодки (*Glycyrrhiza radix*) и состоит из глицирризиновой кислоты (Рисунок 6) и двух молекул глюкуроновой кислоты. GL уже много лет используется в странах Восточной Азии как противовоспалительное, противоаллергическое, и противовирусное средство. В Японии инъекции GL используются при аллергическом воспалении с 1948 года. Кроме того, было высказано предположение, что GL оказывает нейропротекторное действие при постишемическом повреждении мозга крыс (Kim S.W., et al., 2012).

В дальнейшем было показано прямое связывание GL с HMGB1 и последующее ингибирование транслокации HMGB1 из активированных или поврежденных клеток (Kim S.W. et al., 2012.). При этом терапия глициризином считается достаточно безопасной благодаря длительному клиническому опыту применения (Рисунок 7). Псевдоальдостеронизм является единственным главным побочным эффектом глицирризина (Okuma Y. Et al., 2014).

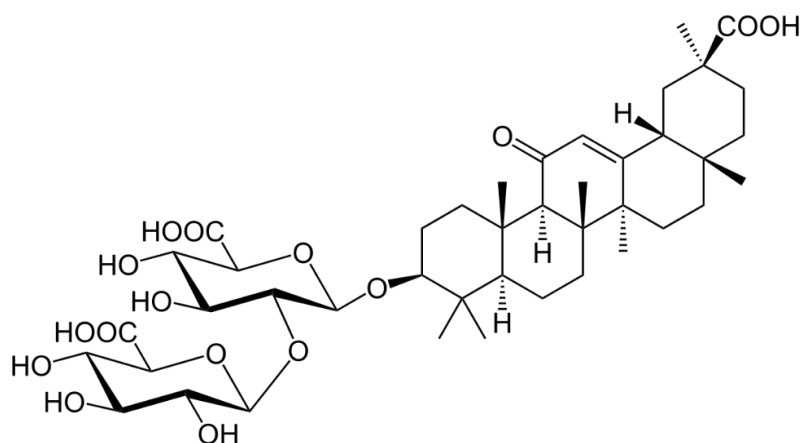


Рисунок 6 – Структурная формула глицирризиновой кислоты

Эти противовоспалительные эффекты глицирризина показали снижение плазменных уровней HMGB1, что может способствовать защите головного мозга от повреждений. Применение глицирризина при травмах головного мозга показывает, что спустя 6 ч после приема приводит на 90% к ингибированию экспрессии таких факторов, как $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ (Coleman L.G., 2018; Okuma Y. Et al., 2014).

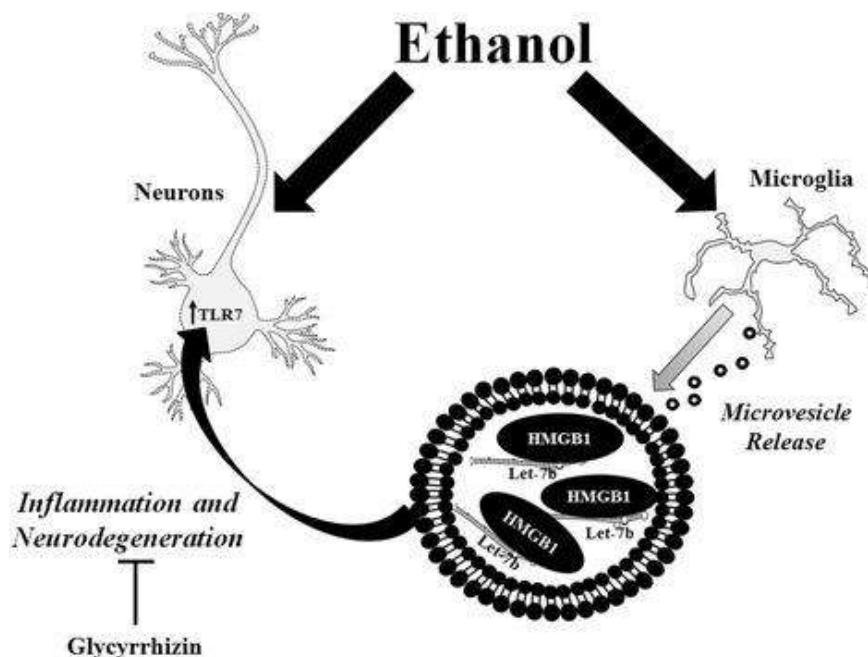


Рисунок 7 – Предполагаемый механизм секреции HMGB1 и let-7 с помощью микровезикул (Coleman L.G., 2017).

Таким образом данное соединение может быть перспективным с целью фармакокоррекции нейроиммунной сигнализации в условиях длительного потребления алкоголя.

1.6.2 Рифампицин

Рифампицин (Rif) (Рисунок 8) – антибиотик широкого спектра действия из группы ансамицинов, который используется при лечении туберкулёза, а также других инфекций: стафилококковой, менингококковой, лепры (Ebenezer G.J., et al., 2021; Cao Y., et al., 2022). Rif может быть как в связанной форме – с белками плазмы

подавляло индуцированную литий-пилокарпином нейродегенерацию гиппокампа, снижая уровень цитохрома С в гиппокампе (Ali A.E., et al., 2018).

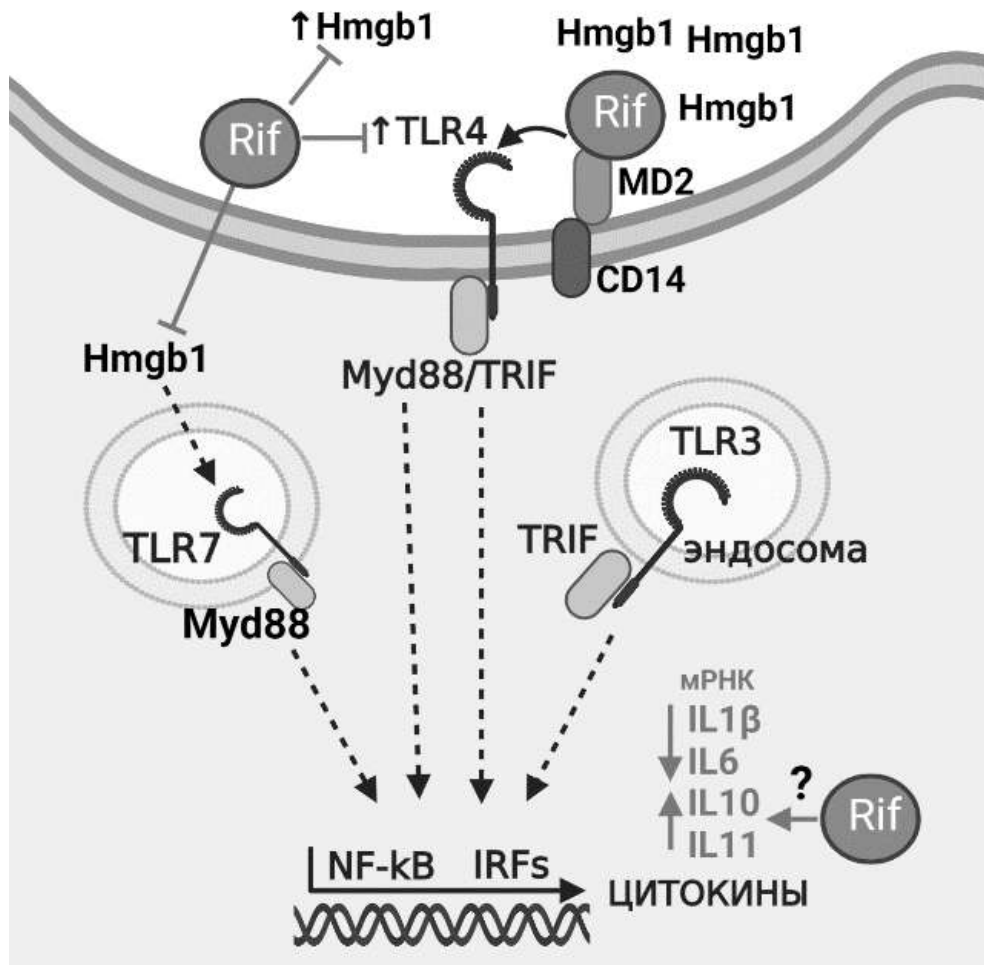


Рисунок 9 – Предполагаемые пути действия Rif
(Айрапетов М.И. и др., 2021; Airapetov M.I. et al, 2024)

Этих сведений достаточно, чтобы заключить, что Rif обладает нейропротекторными свойствами, однако точный механизм действия остаётся неизвестным. В одном из исследований, выполненном на культуре микроглиальных клеток, имеются сведения о конкуренции Rif и липополисахарида за связывание с белком MD2. Белок MD2 необходим для связывания лиганда TLR4 с последующим проведением сигнала. Rif, связываясь с данным белком, способствовал угнетению сигналинга LPS-CD14-MD2-TLR4-NFκB в эксперименте, и, как следствие, отмечалось снижение активации NF-κB и содержания провоспалительных факторов (NO, IL-1β, TNFα). Таким образом, Rif,

конкурентно связываясь с MD2, может блокировать TLR4-зависимую сигнализацию (Wang X., et al., 2013) (Рисунок 9).

1.6.3 Гинзенозиды

Различные виды растений рода *Panax* (*Женьшень*), включая *P. Ginseng*, *P. Quinquefolius* и *P. Notoginseng*, используются в качестве лекарственных растений на протяжении нескольких тысячелетий (He Y., et al., 2018). Широкое применение растение находит благодаря содержанию в своем химическом составе большого разнообразия фармакологически активных компонентов, включая гинзенозиды (Рисунок 10), фитостерин, полиацетилен, полифенолы, полисахариды, органические кислоты, аминокислоты, витамины и минералы, каждый из которых может играть потенциальную роль в лечении и профилактике некоторых заболеваний (He Y., et al., 2018; Mahady G.B., et al., 2000; Cui L., et al., 2016; Nguyen N.H., et al., 2019; Tam D.N.H., 2018). В ряде стран активно реализуются исследования молекулярных мишеней, которые могут объяснять наблюдаемые фармакологические эффекты у различных соединений женьшеня (He Y., et al., 2018). Одними из основных биологически активных компонентов растений рода *Panax* являются гинзенозиды, которые, по данным литературы, обладают противовоспалительным, антиоксидантными и противораковыми эффектами (Tam D.N.H., 2018).

Сообщается, что только на основе гинзенозидов женьшеня в мире зарегистрировано 152 лекарственных препарата и 119 находятся на стадии клинических испытаний (Fan S., et al., 2020). В последние годы активно исследуются гинзенозиды как потенциальные фармакологические агенты с целью снижения развития 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) (He Y., et al., 2018; González-Burgos E., et al., 2015; Wang X., et al., 2015; Xu X., et al., 2020; Li J., et al.,

2021; Cai L., et al., 2021; Sun Y., et al., 2022; Gong L., et al., 2022; Zheng Z., et al., 2022; Xu X., et al., 2022).

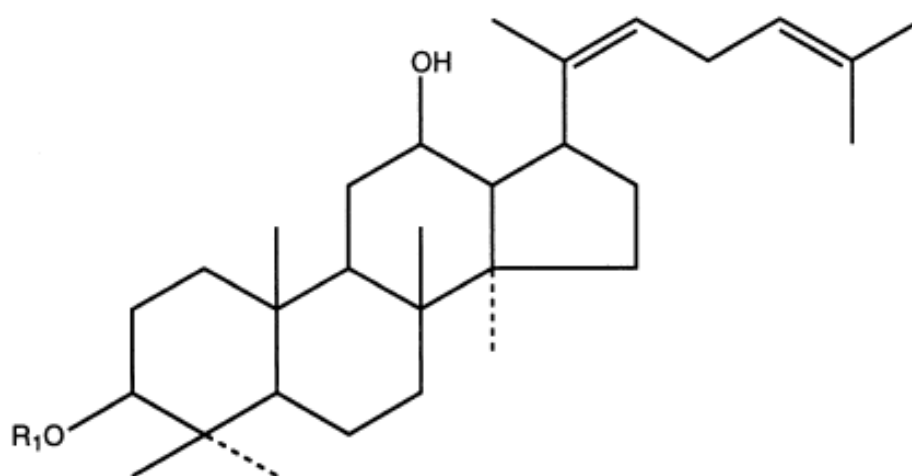


Рисунок 10 – Общая структурная формула гинзенозидов

Результаты исследований последних лет подтверждают тот факт, что употребление алкоголя служит сигналом для активации нейровоспалительных путей в различных структурах головного мозга (Ramos A., et al., 2022; Coleman L.G.J., et al., 2021; Airapetov M., et al., 2021; Becker H.C., et al., 2014; Gano A., et al., 2022; Griffin W.C., et al., 2022), что в свою очередь отражается на запуске тех патогенетических молекулярных механизмов, которые задействованы в формировании алкоголизма – тяжелого социально значимого заболевания (Becker H.C., et al., 2014; Gano A., et al., 2022; Griffin W.C., et al., 2022). За последние более, чем 20 лет, результаты исследований подтверждают тот факт, что некоторые подтипы Toll-подобных рецепторов (TLR) опосредуют развитие нейровоспаления в структурах головного мозга при длительном употреблении этанола (Ramos A., et al., 2022; Coleman L.G.J., et al., 2021; Airapetov M., et al., 2021). Имеются сведения, что TLR-сигнализация не только способствует развитию нейровоспаления в головном мозге, но может быть вовлечена и в механизмы регуляции функциональной активности нейромедиаторных систем (Femenia T., et al., 2018;

Tripathi A.S., et al., 2021; Shirayama Y., et al., 2022), что может также вносить вклад в формирование патологического влечения к алкоголю.

Имеются результаты исследований, которые указывают на способность экстракта растений рода *Panax* и ряда отдельных гинзенозидов женьшеня воздействовать на механизмы нейровоспаления посредством изменения состояния системы TLR-сигнализации (Pannacci M., et al., 2006; Rhule A., et al., 2008; Beamer C.A., et al., 2012; Kim T.W., et al., 2012; Zhao B.S., et al., 2014). Представляется интересным исследовать влияние гинзенозидов на систему TLR-сигнализации в головном мозге после предварительного поступления алкоголя в организм. Таким образом, одна из задач нашей работы заключалась в оценке 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.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Эксперименты *in vivo* на крысах

Работа выполнена на 120 крысах-самцах линии Вистар (начальный возраст 2-3 мес., масса тела = 280 ± 30 г.), полученные из питомника лабораторных животных («Рапполово», Россия), с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС). Животные были разделены по 10 штук в группе (всего 12 групп), что необходимо для получения статистически достоверных данных. Лабораторные животные содержались в виварии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Животные содержались в отдельном помещении для содержания крыс при комнатной температуре и при естественном световом режиме. Кормление осуществлялось *ad libitum*, в первой половине дня при свободном доступе к воде (за исключением тех экспериментальных групп, где существует необходимость в моделировании длительного воздействия алкоголя только путем полупринудительного спаивания крыс раствором этанола, где раствор этанола служит единственным источником жидкости).

Работа рассмотрена и одобрена Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ, заключение № 131-03-8 от 29 апреля 2024 г. На протяжении всего эксперимента животные имели неограниченный доступ к корму и воде.

2.2 Моделирование длительного воздействия этанола и отмены

Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены на организм крыс было выполнено в работе по нескольким протоколам:

Протокол 1: Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены выполнялось путем полупринудительного употребления крысами 20%-го раствора этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 1 мес. с последующей его отменой. Мозг изымался в последний день длительного

воздействия этанола, а также на разных сроках отмены этанола – на 1-е сутки, на 7-е сутки, на 14-е сутки.

Протокол 2: Моделирование состояния отмены после длительного воздействия этанола выполнялось путем полупринудительного употребления крысами 20%-го раствора этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 2 мес. с последующей его отменой. Мозг изымался на 7-е сутки отмены длительного воздействия этанола.

Протокол 3: Моделирование состояния отмены после длительного воздействия этанола выполнялось путем внутрижелудочного введения 20%-го раствора этанола с помощью желудочного зонда в течение 2 месяцев (2 г/кг этанола, ежедневно с понедельника по пятницу, всего 40 введений) с последующей его отменой. Контрольной группе – вводилась вода через зонд в эквивалентном количестве. Мозг изымался на 10-е сутки отмены.

Протокол 4: Моделирование длительного воздействия этанола выполнялось путем внутрижелудочного введения 20%-го раствора этанола с помощью желудочного зонда в течение 1 месяца (2 г/кг этанола, ежедневно с понедельника по пятницу, всего 20 введений). Контрольной группе – вводилась вода через зонд в эквивалентном количестве. Мозг изымался в последний день длительного воздействия этанола.

Использованные нами протоколы моделируют умеренный уровень воздействия этанола на протяжении длительных сроков и основаны на ранее описанных протоколах различными группами исследователей (Буров Ю.В. и др., 1985; Лелевич В.В. и др., 2017; Coleman L.G.J. et al., 2018; McMahan R.H. et al., 2021; Tucker A.E. et al., 2022).

2.3 Культивирование клеток *Panax japonicus*

Суспензионная культура клеток женьшеня японского (*Panax japonicus* С. А. Меу. Var. *Repens* Maxim.) получена в 1998 г. из каллуса корня интактного двулетнего растения (Приморский край, Россия). Штамм зарегистрирован во

Всероссийской коллекции культур клеток высших растений под № 62 (Nosov A.M., 2014). Культуру клеток *P. Japonicus* выращивали на кафедре физиологии растений МГУ им. М.В. Ломоносова (г. Москва) (в соответствии с коллекционным паспортом) на модифицированной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы (2.5%), витаминов по Уайту, α -НУК (2 мг/л) и кинетина (1 мг/л). Культивирование проводили в темноте при 26°C, на качалке (90 об./мин), в колбах объемом 250 мл с укупоркой двойным слоем алюминиевой фольги и слоем офсетной бумаги (30–40 мл суспензии в колбе).

2.4 Подготовка проб для анализа гинзенозидов

Навеску растительного материала (25 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70% (по объему) 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, 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 объему) раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (“Supelco”, США). Патрон промывали 3 мл 5% (по объему) 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 объему) и фильтровали с помощью нейлонового фильтра с порами 0.2 мкм (Acrodisc, “Pall Corporation”, США).

2.5 ВЭЖХ-ИЭР-МС

Анализ проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (“Waters”, США), оснащенный гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром

XEVO QTOF (“Waters”, США). Пробу в объеме 1 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; “Waters”, Ирландия). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) 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 объему): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15 → 30%, 5–15 мин – 30 → 38%, 15–15.5 мин – 48 → 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).

2.6 Внутривнутрибрюшинное введение суммы гинзенозидов

Моделирование длительного воздействия этанола и его отмены выполнено по Протоколу 2 (см. выше). На протяжении 7 сут. отмены алкоголизации производились одной группе животных (n=10) внутривнутрибрюшинные инъекции суммы гинзенозидов (50 мг/кг), а другой группе (n=8) инъекции физ. р-ра в эквивалентном количестве. Контрольной группе крыс (n=9), которые не были подвергнуты алкоголизации, были выполнены инъекции физ. р-ра в эквивалентном количестве.

2.7 Внутривнутрибрюшинное введение рифампицина

Моделирование длительного воздействия этанола и его отмены выполнено по Протоколу 3 (см. выше). На протяжении 7 сут. отмены алкоголизации производились одной группе животных (n=8) внутривнутрибрюшинные инъекции рифампицина (100 мг/кг), а другой группе (n=8) инъекции физ. р-ра в эквивалентном количестве. В работе был использован коммерческий препарат рифампицина (Рифампицин, лиофилизат д/приг.концентрата д/приг р-ра для инфузий», 150 мг, «Белмедпрепараты», Беларусь). Контрольной группе крыс (n=9) были выполнены инъекции физ. р-ра.

2.8 Забор биоматериала

По окончании эксперимента крыс декапитировали в последний день воздействия этанола и на разных сроках отмены этанола, производили забор необходимых структур головного мозга (амигдала, стриатум, медиальная энторинальная кора, гиппокамп, прилежащее ядро). Границы структуры мозга были определены в соответствии с атласом мозга крысы (Paxinos G., et al., 2017). Образцы мозга немедленно замораживали и хранили при температуре -80°C.

2.9 Выделение РНК

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

2.10 ОТ-ПЦР

Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Перед проведением ОТ для микроРНК было выполнено полиаденилирование микроРНК с помощью поли(А)-полимеразы *E. coli* («New England Biolabs Inc.», США) по ранее описанной методике (Shi R., 2012). ОТ для микроРНК проводили в 10 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) и специфического PolyT-адаптера (5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN-3').

Концентрацию полученной кДНК в ходе ОТ измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 («Implen», Германия).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени проводили в амплификаторе Mx3005P («Stratagene», США) в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green («Евроген», Россия) и смесь специфических прямых и обратных праймеров (Таблица 3) («Beagle», Россия). Относительный уровень содержания мРНК и miR рассчитывался методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, содержание мРНК нормировали к уровню экспрессии гена *Gapdh*, уровень miR нормировали к уровню экспрессии гена *U6*.

2.11 Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v.6. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна – Уитни для малых независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при значении $p \leq 0.05$.

Корреляционный анализ также был выполнен в программе Graph Pad Prism v.6. Уровень взаимосвязи между двумя сравниваемыми переменными определяли по коэффициенту детерминации (R^2).

Таблица 3 – Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr3</i>	ААСТGGAGAACСТССААГА	САСССТGGAGAAAАСТСТТТ
<i>Tlr4</i>	АСТСТГАТСАТGGСАТТГТТ	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGGTA
<i>Myd88</i>	TCATTGAGAAAAGGTGTCGT	AGTGCAGATAGTGATGAAC
<i>Ticam</i>	GCTCAGCTAGATGATGTGAT	TGACAGTGCAGACCTGG
<i>NfkB1</i>	АТАСТГСТТТГАСТСАСТСС	AGGTATGGGCCATCTGTT
<i>Irf3</i>	ААТТССТССССТGGСТС	CATGGGATCCTGAACTTTGT
<i>Irf1</i>	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC
<i>Hmgb1</i>	СТСТГАТGCAGСТТАТАСГА	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Ccl2</i>	AAGATGATCCCAATGAGTCG	TGGTGACAAATACTACAGCTT
<i>Il10</i>	СТGCAGGACTТТАAGGGТТА	CCTTTGTCTTGGAGCTTATT
<i>Il11</i>	GGGACATGAACTGTGTTTGT	GGTAGGTAGGGAGTCCAGAT
<i>Il6</i>	АСТТСАСАAGТССGAGGСТТ	AATTGCCATTGCACAАСТСТТТТС
<i>miR-182</i>	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-155-5p</i>	ТТААТГСТААТТGTGATAGGGGT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-96-5p</i>	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>miR-let-7b</i>	GCGGCGGCTATACAACCTACTGC	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
<i>U6</i>	TGCTTCGGCAGCACATATAC	AGGGGCCATGCTAATCTTCT
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Состояние экспрессии генов TLR и провоспалительных цитокинов в структурах головного мозга крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене

Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены выполнено по протоколу 1 (см. главу «Материалы и методы»).

3.1.1 Уровень экспрессии *Tlr3* в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене

Результаты выполненного эксперимента показали, что в условиях длительного воздействия этанола отмечается увеличение уровня экспрессии *Tlr3* в медиальной энторинальной коре головного мозга крыс, хотя данное увеличение было статистически недостоверное. В миндалевидном теле и стриатуме уровень экспрессии гена сохраняется без изменений. В гиппокампе наблюдается пониженный уровень экспрессии в группе длительного воздействия этанола в сравнении с группой контроля (Рисунок 11).

В период отмены этанола уровень экспрессии *Tlr3* в миндалевидном теле мозга повышается по отношению к группе длительной алкоголизации на 1-е сутки, на 7-е сутки достигается уровень контрольных значений, на 14-е сутки показатель ниже уровня значений в группе контроля (Рисунок 11).

В медиальной энторинальной коре обнаружено снижение экспрессии на 1-е сутки по отношению к группе алкоголя, на 7-е сутки и 14-е сутки отмечается повышение экспрессии, превышая показатели в группе контроля. В стриатуме наблюдается снижение на 1-е сутки по отношению к группе алкоголя и повышение на 7-е и 14-е сутки отмены этанола, превысив уровень в группе контроля. В гиппокампе мозга крыс отмечается увеличение уровня мРНК на всех исследуемых сроках отмены длительного воздействия этанола (Рисунок 11).

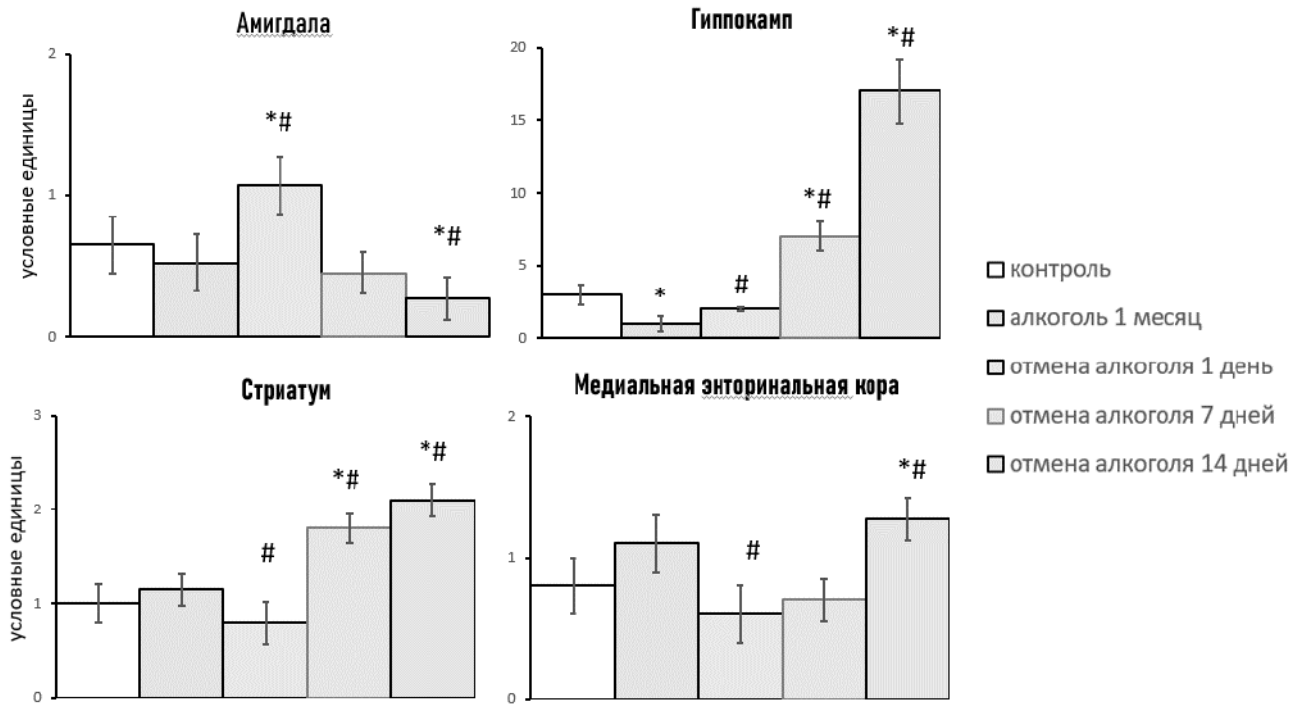


Рисунок 11 – Экспрессия гена *Tlr3* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

3.1.2 Уровень экспрессии *Tlr4* в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене

Уровень экспрессии *Tlr4* не имел статистически достоверных изменений ни в одной из исследуемых структур головного мозга крыс в группе длительного воздействия этанола (Рисунок 12).

В период отмены этанола в миндалевидном теле уровень экспрессии *Tlr4* повышен на 1-е сутки, но на 7-е сутки отмечается снижение до показателей группы контроля. На 14-е сутки отмены этанола уровень экспрессии приобрел значения ниже уровня в группе контроля (Рисунок 12). В медиальной энторинальной коре на 1-е сутки отмены уровень экспрессии увеличен, далее на 7-е сутки – снижен до уровня значений контрольной группы. На 14-е сутки показатель экспрессии приобрел значения ниже уровня контрольной группы (Рисунок 12).

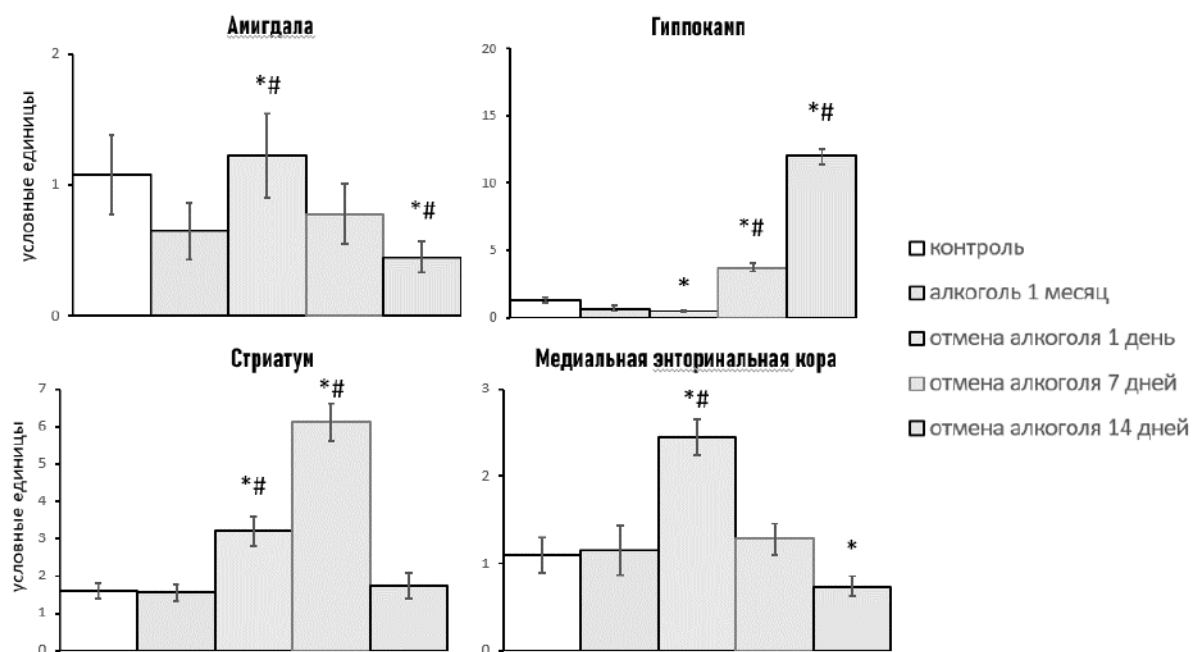


Рисунок 12 – Экспрессия гена *Tlr4* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

В стриатуме мозга крыс показатель экспрессии *Tlr4* повышен на 1-е и 7-е сутки отмены этанола относительно значений в группах контроля и длительного воздействия этанола. На 14 сутки отмены этанола экспрессия *Tlr4* в стриатуме мозга крыс снижается до уровня значений контрольной группы (Рисунок 12). В гиппокампе повышенный уровень экспрессии *Tlr4* на 7-е и 14-е сутки отмены этанола относительно значений в группах контроля и длительного воздействия этанола (Рисунок 12).

3.1.3 Уровень экспрессии *Tlr7* в мозге крыс в условиях длительного воздействия этанола и при отмене

В выполненном нами эксперименте уровень экспрессии *Tlr7* не имел статистически достоверных изменений среди исследованных нами структур головного мозга крыс в группе длительного воздействия этанола (Рисунок 13).

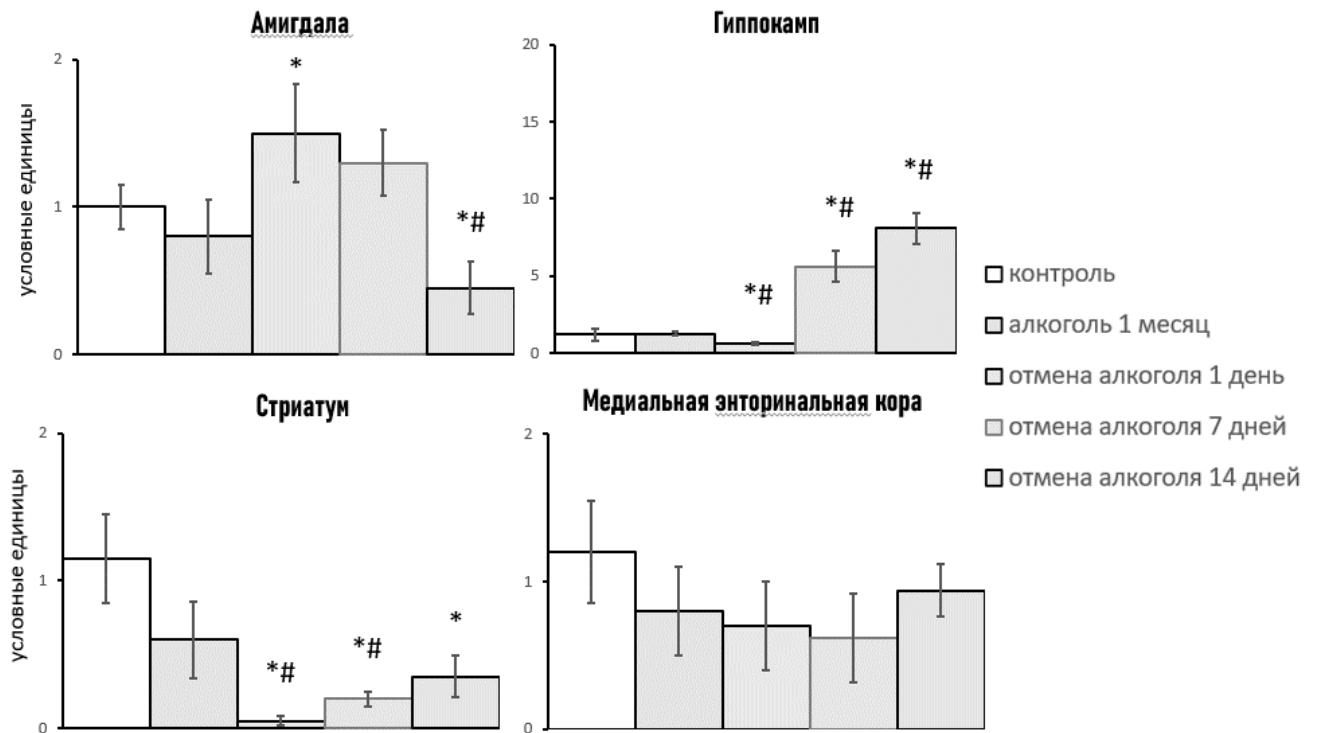


Рисунок 13 – Экспрессия гена *Tlr7* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

При этом в группе животных с отменой этанола в миндалевидном теле мозга уровень экспрессии *Tlr7* увеличен на 1-е сутки отмены, но при этом на 7-сутки и 14-е сутки отмены снижен до уровней ниже значений в группе контроля (Рисунок 13). В медиальной энторинальной коре не выявлено изменений ни в одной из исследуемых экспериментальных групп животных (Рисунок 13). В стриатуме мозга крыс уровень экспрессии *Tlr7* снижен в группе отмены этанола на 1-е сутки относительно значений в группах контроля и длительного воздействия этанола. Кроме того, отмечается сохранение снижения уровня экспрессии в группах на 7-е и 14-е сутки отмены этанола (Рисунок 13). В гиппокампе уровень экспрессии снижен на 1-е сутки отмены этанола, но обнаруживается повышение на 7-е и 14-е сутки отмены, превысив уровень значений в контрольной группе (Рисунок 13).

3.1.4 Уровень экспрессии провоспалительных цитокинов в условиях длительного воздействия этанола и при отмене

Моделирование длительного воздействия этанола вызвало повышение уровня экспрессии гена *Il1 β* в миндалевидном теле головного мозга крыс относительно значений в контрольной группе. Повышенный уровень экспрессии гена *Il1 β* выявлен и при отмене этанола на 1-е сутки, однако на 7-е и 14-е сутки отмены экспрессии гена *Il1 β* не отличается от уровня значений группы контроля (Рисунок 14).

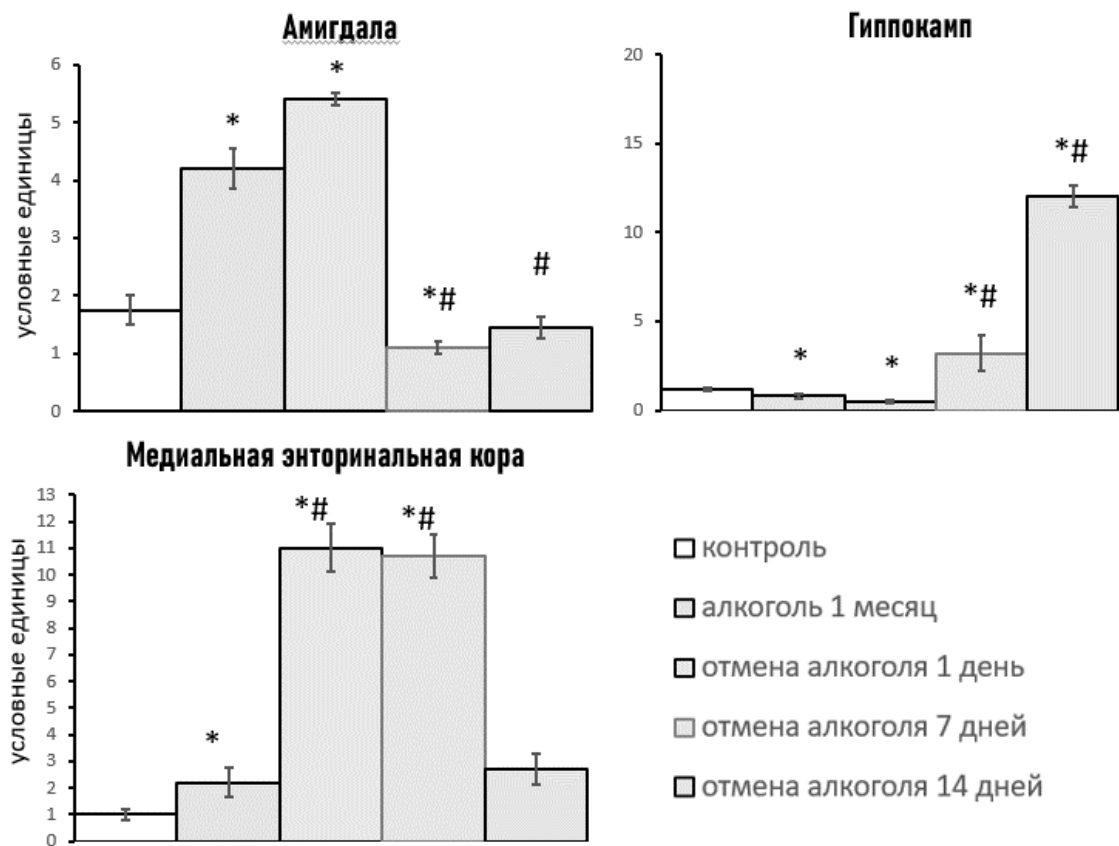


Рисунок 14 – Экспрессия гена *Il1 β* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

В медиальной энторинальной коре отмечается повышенный уровень экспрессии гена в группе длительного воздействия этанола, при этом во всех

исследованных группах отмены этанола значение не имеет значимых отклонений от уровня значений в группе контроля (Рисунок 14). В гиппокампе мозга крыс уровень экспрессии гена *Il1 β* значимо неизменен в группе длительного воздействие этанола и в группе отмены этанола на 1-е сутки, однако на 7-е и 14-е сутки отмены этанола отмечается увеличение экспрессии гена *Il1 β* относительно групп контроля и длительного воздействия этанола (Рисунок 14).

Уровень экспрессии гена *Ccl2* не имел значимых изменений в миндалевидном теле в группе длительного воздействия этанола, однако в условиях отмены этанола выявлено снижение экспрессии гена *Ccl2* на 1-е сутки, на 7-е сутки отмечается постепенное повышение, на 14-е сутки показатели не отличаются от уровня значений в группе контроля (Рисунок 15).

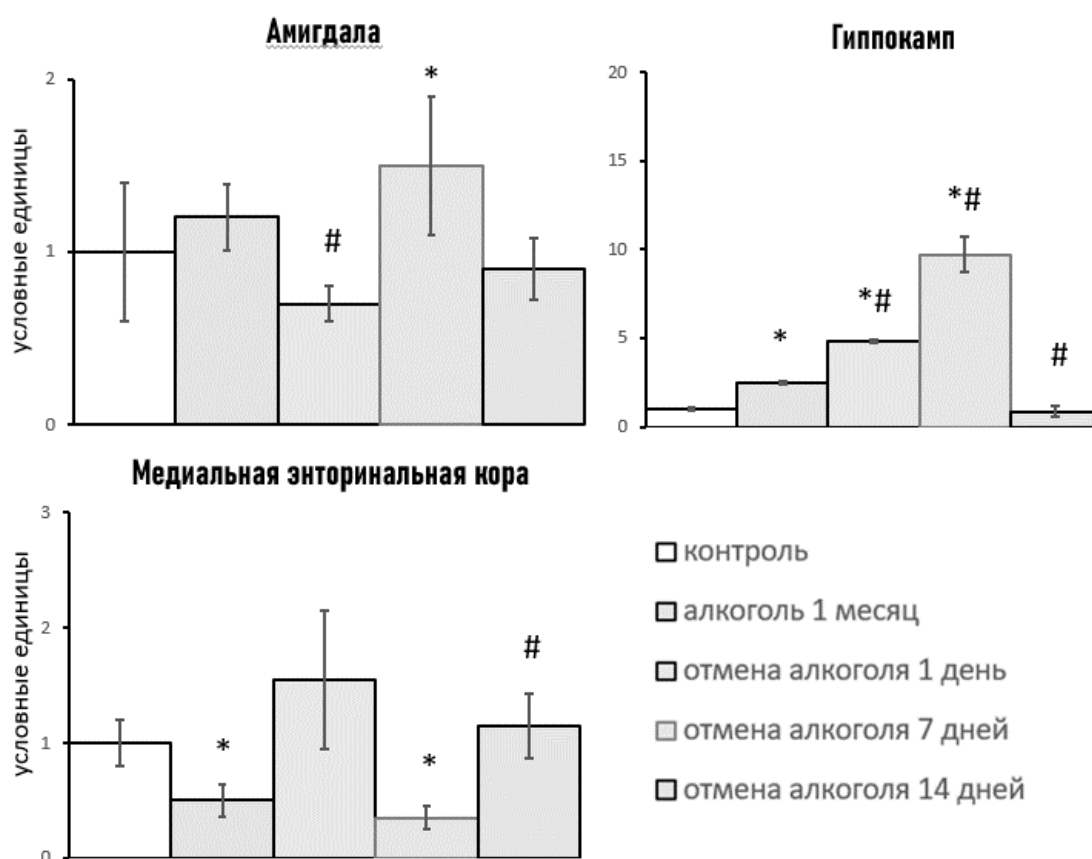


Рисунок 15 – Экспрессия гена *Ccl2* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

Уровень экспрессии гена *Ccl2* снижен в медиальной энторинальной коре в группе длительного воздействия этанола, однако на 1-е сутки показатель экспрессии увеличен, а на 7-е сутки отмены показатель экспрессии ниже уровня в группе контроля. На 14-е сутки отмены этанола уровень экспрессии гена *Ccl2* не отличается значимо от уровня значений в группе контроля (Рисунок 15). Повышена экспрессия гена *Ccl2* в гиппокампе в группе алкоголизации, а также на 1-е и 7-е сут. отмены алкоголя, на 14-е сут. отмены значение достигает уровня контроля (Рисунок 15).

3.1.5 Корреляционный анализ

Выполнен корреляционный анализ между изменениями уровней экспрессии генов TLR и генов провоспалительных цитокинов в группах длительного воздействия этанола и в группах отмены этанола в динамике на 1-е, 7-е и 14-е сетки. В работе наглядно представлены результаты выполненного корреляционного анализа, где была выявлена достоверная корреляция между анализируемыми показателями выбранных групп ($R^2 \geq 0.75$) (Рисунок 16).

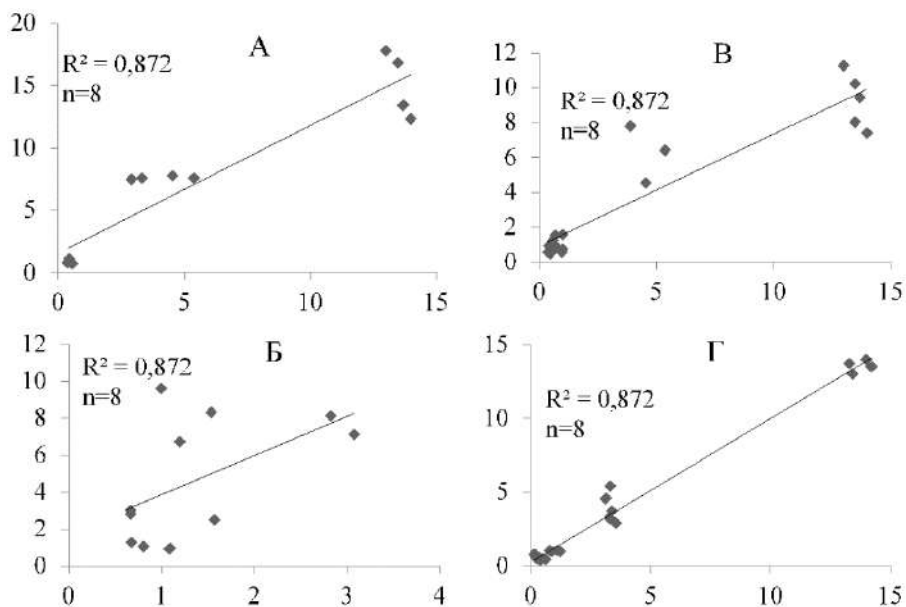


Рисунок 16 – Результаты корреляционного анализа. (А) Уровень мРНК TLR3 коррелирует с уровнем мРНК IL-1β в гиппокампе; (Б) уровень мРНК TLR7 коррелирует с уровнем мРНК IL-1β в гиппокампе; (В) уровень мРНК TLR4 коррелирует с уровнем мРНК IL-1β в mEC и (Г) – в гиппокампе.

3.2 Уровень экспрессии гена *Hmgb1* в структурах мозга крыс при длительном воздействии этанола и при отмене

Результаты выполненного исследования позволили выявить то, что в исследуемых нами структурах головного мозга крыс происходят разнонаправленные изменения в экспрессии гена *Hmgb1* в условиях длительного воздействия этанола и при отмене этанола (Рисунок 17).

Длительное воздействие этанола вызвало повышение уровня экспрессии гена *Hmgb1* в амигдале и стриатуме головного мозга крыс. В гиппокампе не были выявлены значимые изменения в уровне экспрессии *Hmgb1* при моделировании длительного воздействия этанола в эксперименте.

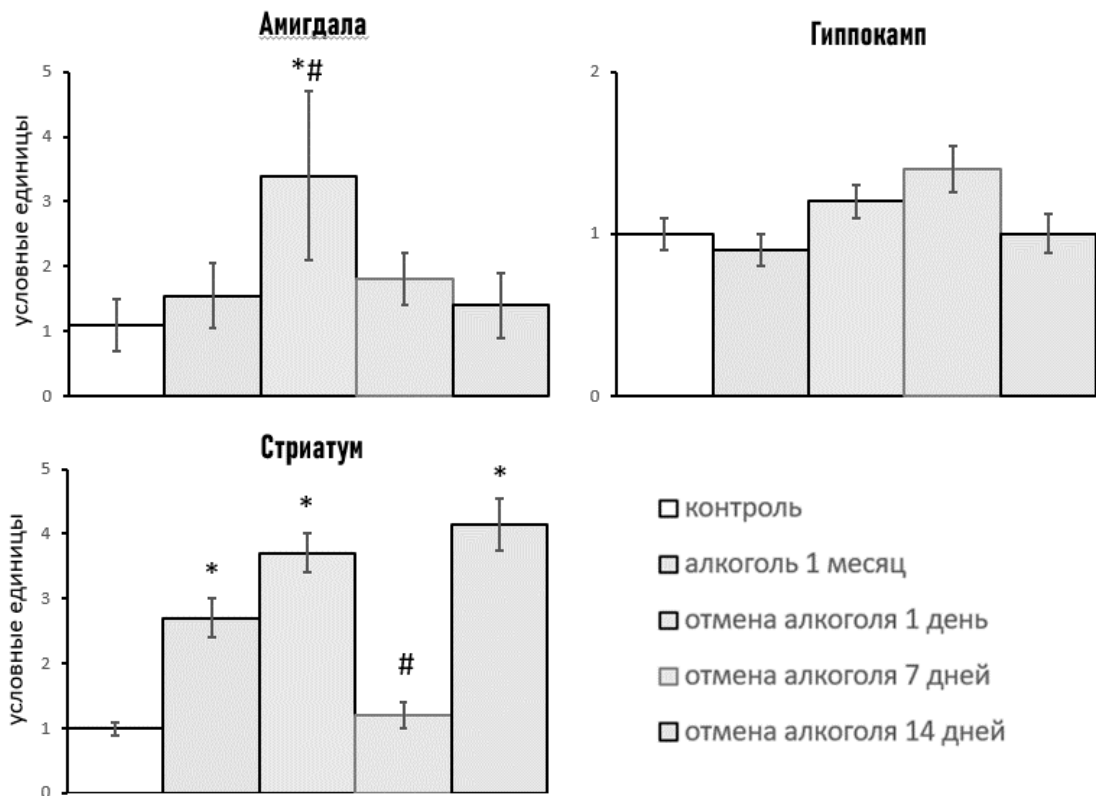


Рисунок 17 – Экспрессия гена *Hmgb1* в различных структурах головного мозга крыс при хронической алкоголизации и в условиях отмены этанола (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

Уровень экспрессии гена *Hmgb1* был исследован при отмене длительного воздействия этанола в динамике. Так, в стриатуме мозга крыс на 1-е сутки отмены этанола обнаружен повышенный уровень экспрессии гена *Hmgb1*, на 7-е сутки экспрессия гена была понижена относительно значений в группе контроля, на 14-е сутки отмены показатель экспрессии значимо повышен в сравнении с уровнем экспрессии в группе контроля. В амигдале выявлен повышенный уровень экспрессии гена на 1-е сутки отмены этанола, однако на 7-е сутки и 14-е сутки значимых изменений не было обнаружено. В гиппокампе мозга крыс отмечена тенденция к повышению уровня экспрессии гена на 1-е и 7-е сутки отмены этанола, однако статистически не значимое. На 14-е сутки отмены изменений не выявлено в гиппокампе мозга крыс (Рисунок 17).

3.3 Состояние экспрессии генов системы TLR в прилежащем ядре мозга крыс при отмене длительного воздействия этанола и при использовании рифампицина

Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены выполнено по протоколу 3 (см. главу «Материалы и методы»).

3.3.1 Влияние рифампицина на экспрессию генов toll-подобных рецепторов

Результаты выполненного ПЦР-анализа не показали значимых изменений в экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr7* на уровне мРНК на 10-е сутки отмены этанола в Nac мозга крыс (Рисунок 18).

Вероятно, уровень экспрессии гена нормализуется в Nac, т.е. изменения его экспрессии здесь имеют менее длительный характер. Однако было отмечено повышение уровня экспрессии гена *Tlr4* на 10-е сутки отмены этанола в Nac. При этом выполненные инъекции рифампицина снизили повышенный уровень экспрессии гена *Tlr4* до уровня значений в контрольной группе (Рисунок 18).

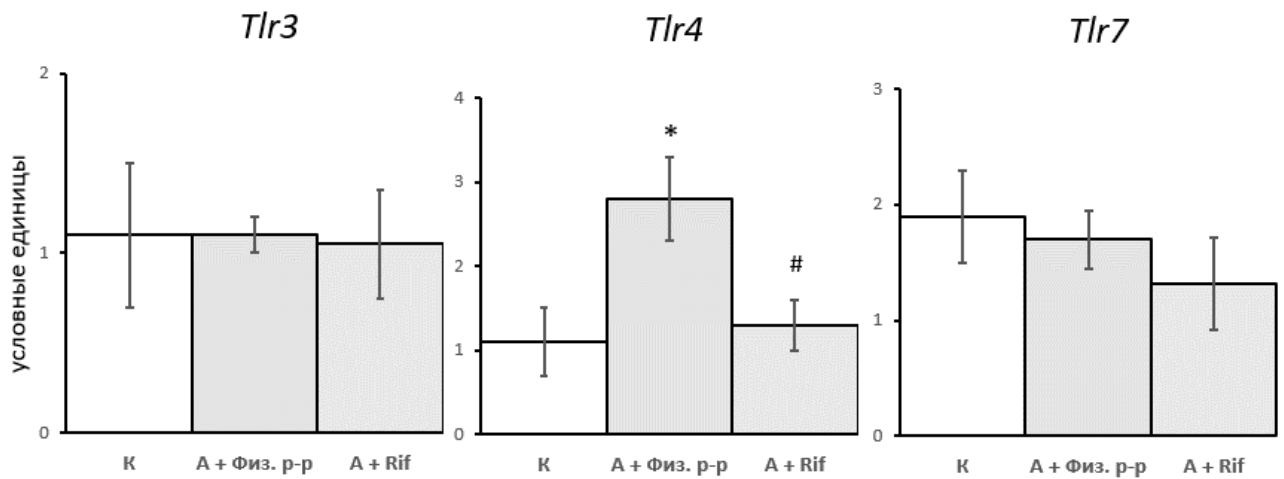


Рисунок 18 – Уровень мРНК TLRs в Nas при коррекции рифампицином (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

3.3.2 Влияние рифампицина на экспрессию генов адаптерных белков и транскрипционных факторов

Далее был исследован уровень экспрессии генов адаптерных белков TLR, которые участвуют в реализации TLR-зависимой внутриклеточной передачи сигналов.

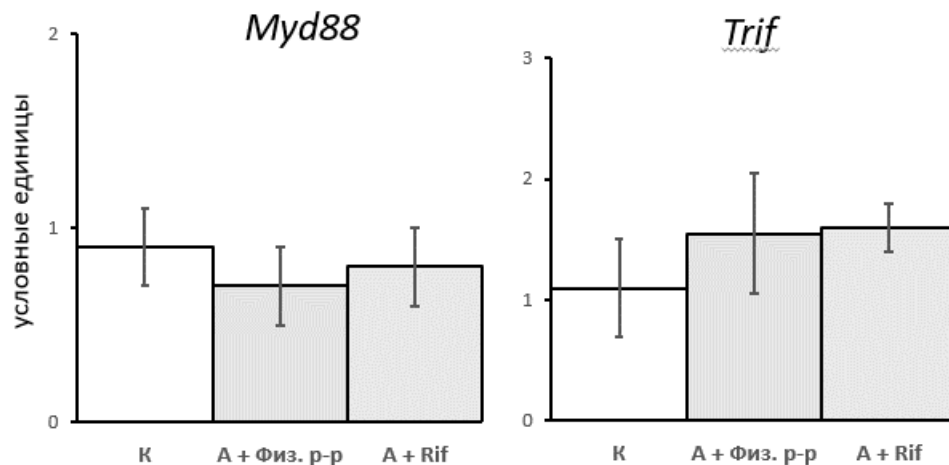


Рисунок 19 – Уровень мРНК адаптерных белков в Nas при коррекции рифампицином

Белки Myd88 и Trif передают сигнал от TLR на каскад внутриклеточных киназ, активируя работу транскрипционных факторов, ответственных за

регуляцию экспрессией про- и противовоспалительных генов (Айрапетов М.И., 2020; Crews F.T., et al., 2011; Coleman L.G. Jr et al., 2020) Однако нами не было обнаружено достоверных изменений в экспрессии генов *Myd88* и *Trif* (Рисунок 19).

Кроме того, не было выявлено значимых изменений в экспрессии генов транскрипционных факторов TLR-зависимой внутриклеточной передачи сигналов NfκB (он же NfκB1), IRF3 и IRF1 (Рисунок 20).

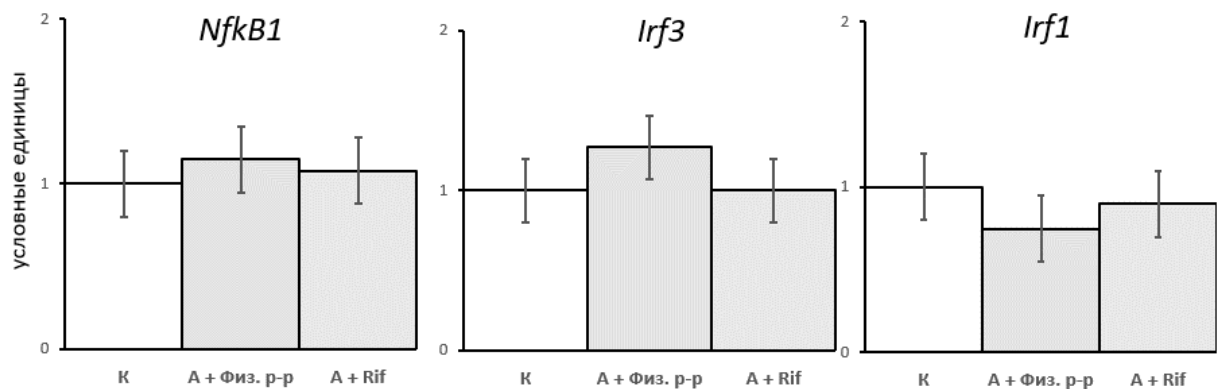


Рисунок 20 – Уровень мРНК транскрипционных факторов в Nac при коррекции рифампицином

Уровень экспрессии адаптерных белков ранее была изучена другими исследователями в Nac мозга крыс в момент длительной алкоголизации и при отмене алкоголя на 1-е сутки, исследователи также не обнаружили изменений в содержаниях мРНК *Myd88* и *Trif* (McCarthy G.M., et al., 2017).

3.3.3 Влияние рифампицина на экспрессию генов цитокинов в прилежащем ядре головного мозга крыс в период отмены длительного воздействия этанола

Результаты нашего эксперимента показали, что помимо повышения уровня экспрессии гена *Tlr4* отмечается также повышение уровня экспрессии гена *Ccl2*, а также небольшое повышение экспрессии гена *Il1β* Nac мозга крыс на 10-е сутки отмены этанола (Рисунок 21). Кроме того, нами было обнаружено то, что

одновременно с повышением экспрессии генов провоспалительных цитокинов отмечается пониженная экспрессия генов противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Il11* (Рисунок 21).

Таким образом, полученные данные, возможно, могут свидетельствовать о развитии стойкого провоспалительного состояния в Nac мозга крыс, вызванного длительным поступлением этанола в организм. Вполне возможно, что TLR4-зависимые сигнальные пути могут быть вовлеченными в развитие этих эффектов.

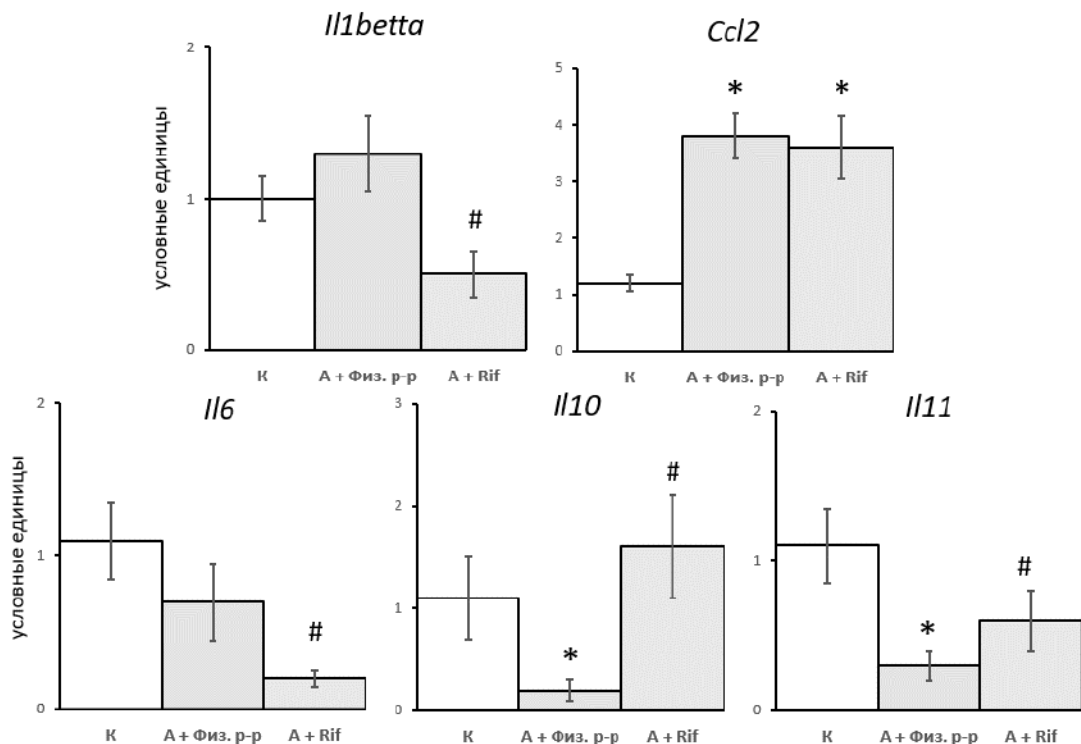


Рисунок 21 – Уровень мРНК цитокинов в Nac при коррекции рифампицином (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

При этом выполненные нами инъекции рифампицина снизили повышенный уровень экспрессии гена *Il1 β* , не оказали значимого влияния на экспрессию гена *Ccl2*. Важно отметить то, что инъекции рифампицина повысили сниженный уровень экспрессии генов противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Il11* (Рисунок 21). Мы исследовали уровень экспрессии еще одного гена провоспалительного цитокина в Nac на 10-е сутки отмены длительного воздействия этанола, однако

значимых изменений в группе отмены этанола нами не было выявлено, однако инъекции рифампицина снизили уровень экспрессии и этого провоспалительного гена до уровней ниже тех значений, что наблюдаются в контрольной группе.

3.3.4 Влияние рифампицина на экспрессию гена *Hmgb1* в прилежащем ядре головного мозга крыс в период отмены этанола

В ходе выполненного эксперимента было обнаружено повышение уровня экспрессии гена *Hmgb1* в Nac (Рисунок 22).

Известно, что белок Hmgb1 является эндогенным агонистом рецептора TLR4. Также установлено, что содержание белка повышается в головном мозге при различных патологических состояниях, в том числе и при алкоголизме. Существуют данные, свидетельствующие о том, что повышение содержания Hmgb1 может инициировать TLR4-зависимую сигнализацию, приводя к повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов в нервной ткани, что служит причиной развития нейровоспалительного процесса. Выполненные инъекции рифампицина снизили повышенный уровень экспрессии гена *Hmgb1* до уровня значений в группе контроля (Рисунок 22).

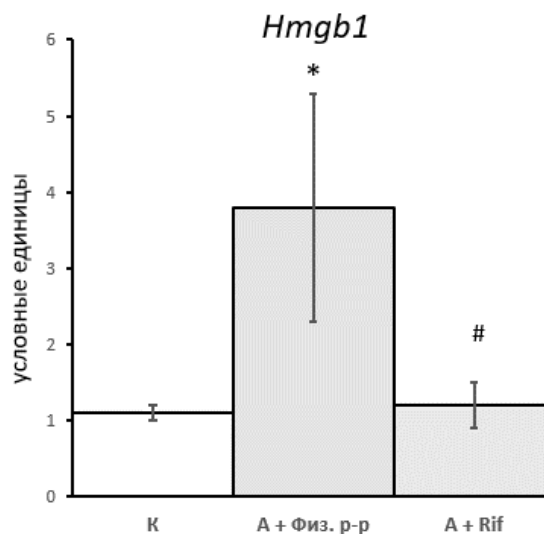


Рисунок 22 – Уровень мРНК *Hmgb1* в Nac

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

3.4 Влияние очищенной суммы гинзенозидов на систему toll-подобных рецепторов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены длительного воздействия этанола

Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены выполнено по протоколу 2 (см. главу «Материалы и методы»).

3.4.1 Анализ полученной из суспензионной культуры клеток женьшеня японского суммы гинзенозидов

Предварительно выполненный хроматографический анализ показал, что в полученном очищенном экстракте из суспензионной культуры клеток женьшеня японского содержание гинзенозидов составило 83%. Также был выполнен хроматографический анализ полученной суммы гинзенозидов. Используя для дальнейшего исследования сумма гинзенозидов содержала в своем составе: тритерпеновые гликозиды олеаноловой кислоты (основной компонент – гинзенозид R_0) и тритерпеновые гликозиды протопанаксадиола (основные гинзенозиды – R_{b1} , R_c , R_{b2}/R_{b3} , R_d). Ориентировочное содержание основных гинзенозидов (% от общей массы): 1. R_0 – 33 %; 2. R_{b1} – 12 %; 3. $R_c + R_{b2} + R_{b3} + R_d$ – 13 %; 4. Другие тритерпеновые гликозиды (в сумме) – 25 %.

3.4.2 Влияние суммы гинзенозидов на экспрессию генов toll-подобных рецепторов

В нашем исследовании длительная алкоголизация крыс привела к значимому снижению уровня экспрессии гена *Tlr3* на 7-е сутки отмены этанола в Nac (Рисунок 23). Уровень экспрессии гена *Tlr4* значимо повышен в Nac на 7-е сутки отмены этанола. Уровень экспрессия гена *Tlr7* в Nac не был изменен ни в одной из исследуемых экспериментальных групп животных. При этом применение суммы гинзенозидов вызвало значимое повышению уровня экспрессии гена *Tlr3* до

уровней превышающих значения в контрольной группе животных. Кроме того, гизенозиды вызвали снижение экспрессии гена *Tlr4* в *Nac* практически до уровня значений в контрольной группе (Рисунок 23).

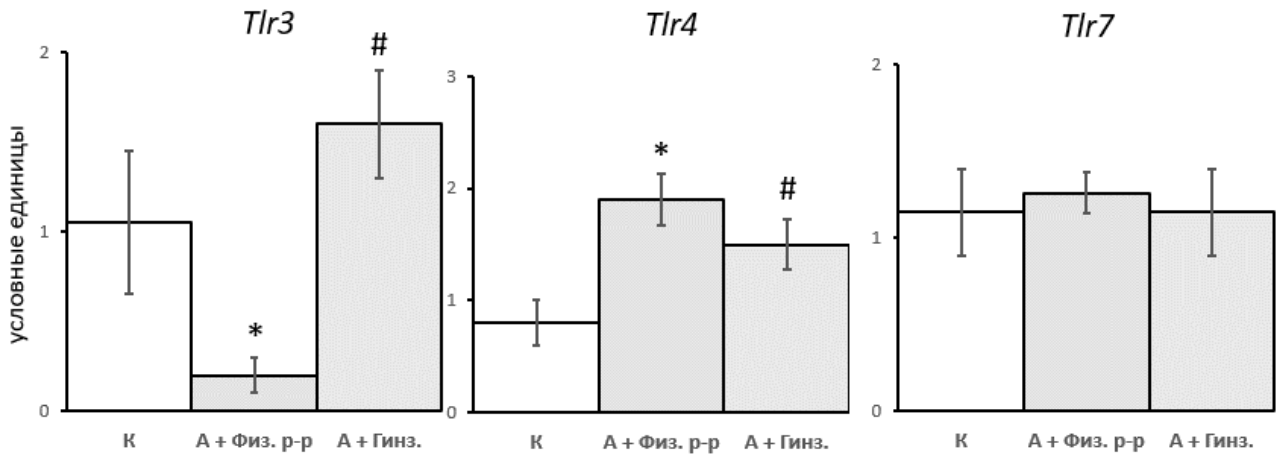


Рисунок 23 – Уровень мРНК TLRs в *Nac*

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

В гиппокампе (HIP) на 7-е сутки отмены длительного воздействия этанола отмечен повышенный уровень экспрессии генов всех исследованных нами подтипов TLR (*Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr7*), при этом наиболее значимое повышение уровня экспрессии было характерно для *Tlr4*.

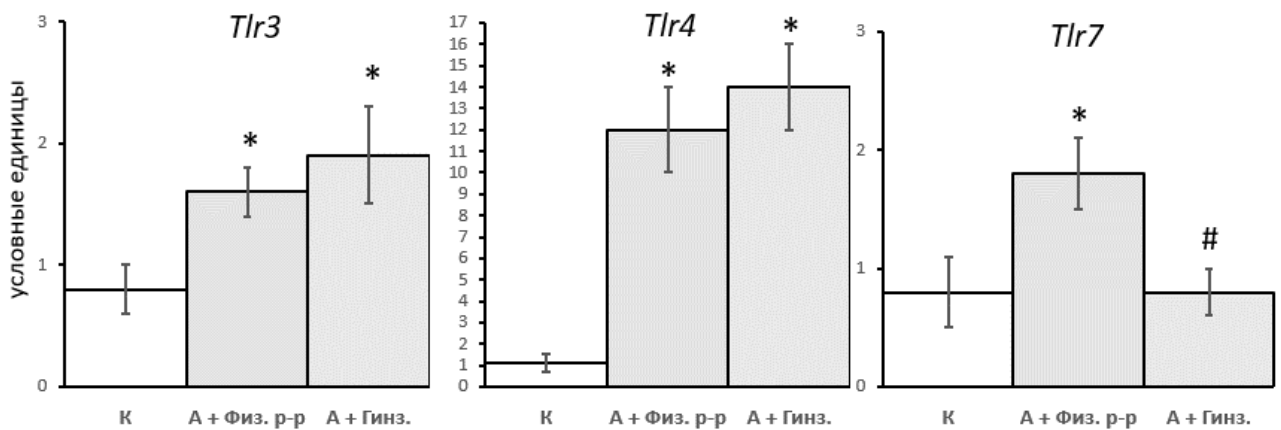


Рисунок 24 – Уровень мРНК TLRs в HIP

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

Введение суммы гинзенозидов не оказало значимого влияния на экспрессию генов *Tlr3* и *Tlr* в гиппокампе, однако понизило уровень экспрессии гена *Tlr7* до уровня значений в контрольной группе (Рисунок 24).

Таким образом, используемая в нашем эксперименте очищенная сумма гинзенозидов оказала влияние на патологически измененный уровень экспрессии генов TLR, связанный с длительным потреблением этанола грызунами.

3.4.3 Влияние суммы гинзенозидов на экспрессию генов транскрипционных факторов

Мы оценили уровень экспрессии генов ряда транскрипционных факторов, которые являются ключевыми компонентами TLR-зависимой сигнализации. Уровень экспрессии гена *NfkB* (он же *NfkB1*) не имел статистически достоверных различий ни в одной из исследуемых нами групп животных в Нас (Рисунок 25).

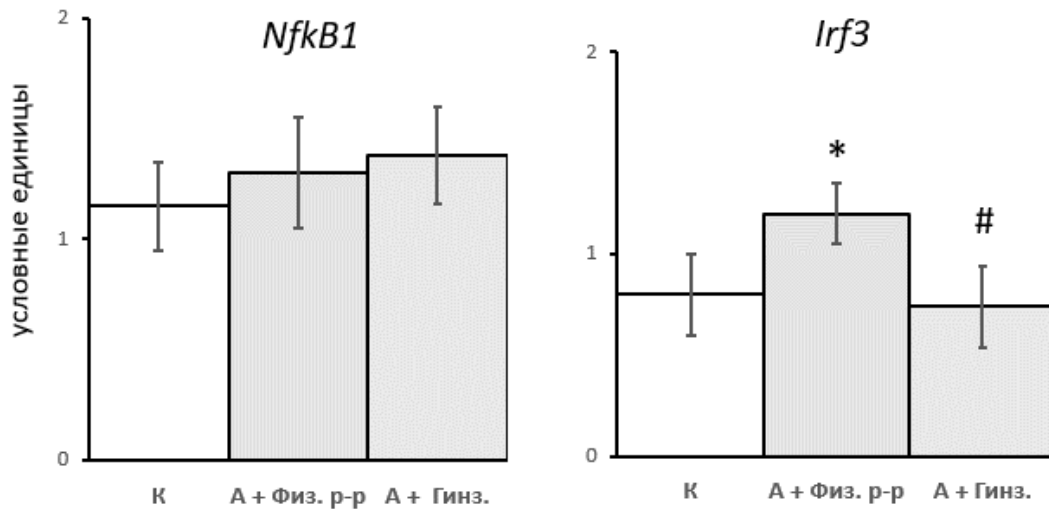


Рисунок 25 – Уровень мРНК факторов транскрипции в Нас

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

Уровень экспрессии гена *Irf3* был повышен в Нас на 7-е сутки отмены длительного воздействия этанола, а введение суммы гинзенозидов восстановило уровень экспрессии гена *Irf3* до уровня значений в группе контроля (Рисунок 25).

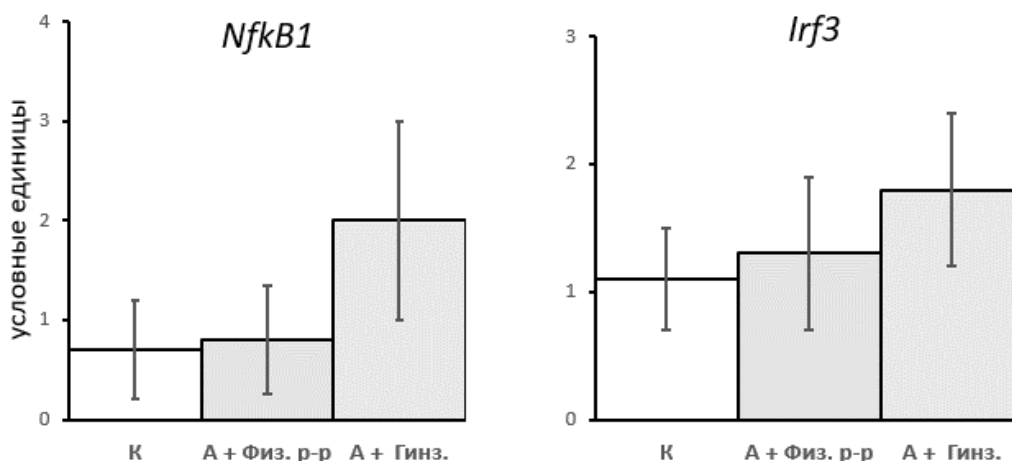


Рисунок 26 – Уровень мРНК мРНК факторов транскрипции в НІР

Изменений в экспрессии гена *Irf3* в гиппокампе мозга крыс не выявлено. Однако в гиппокампе обнаружено повышение уровня экспрессии гена *Irf1* на 7-е сутки отмены этанола, при этом применение гинзенозидов не оказало значимого влияния на уровень экспрессии гена *Irf1* (Рисунок 26). В Нас экспрессия гена *Irf1* нами не была исследована.

3.4.4 Влияние суммы гинзенозидов на уровень экспрессии генов цитокинов в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены этанола

Реакцией на изменения функциональной активности молекулярных внутриклеточных путей TLR-зависимой сигнализации служат изменения в экспрессии ряда генов про- и противовоспалительных цитокинов. С данным эксперименте мы сосредоточили свое внимание на уровне экспрессии ключевых генов нейровоспаления – *Il1 β* и *Ccl2*.

Уровень экспрессии гена *Il1 β* в Нас был повышен как в контрольной группе отмены этанола, так и в группе животных, так и в группе с инъекциями суммы гинзенозидов. Состояние экспрессии гена другого провоспалительного цитокина *Ccl2* было повышено только в контрольной группе отмены этанола, тогда как инъекции суммы гинзенозидов снизили этот показатель до значений группы контроля (Рисунок 27).

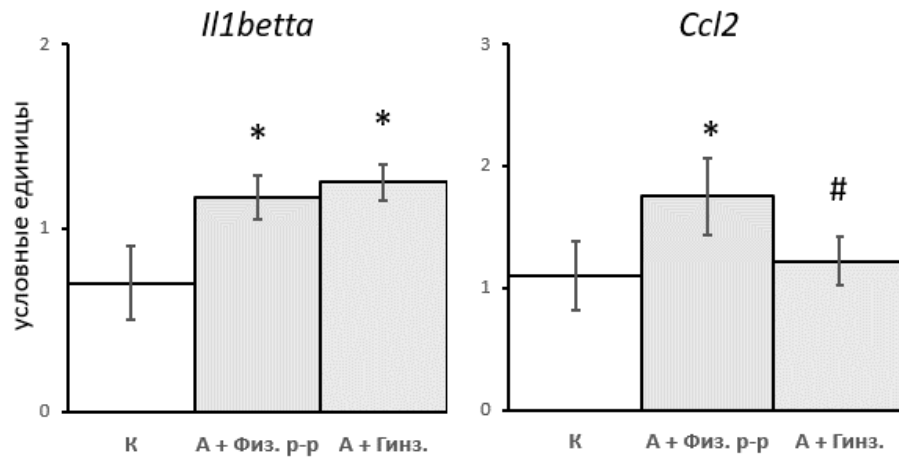


Рисунок 27 – Уровень мРНК цитокинов в Nas

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

В НІР уровень экспрессии гена *Il1 β* не изменился ни в одной из экспериментальных групп животных, при этом уровень экспрессии гена другого провоспалительного цитокина здесь был повышен как в контрольной группе отмены этанола, так и в группе животных с выполненными суммами гинзенозидов (Рисунок 28).

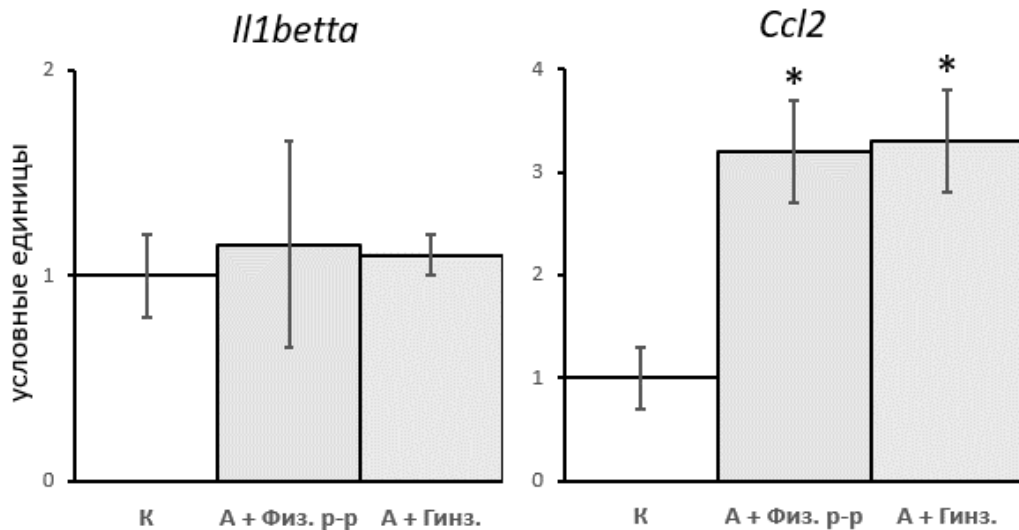


Рисунок 28 – Уровень мРНК цитокинов в НІР

(* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

3.4.5 Влияние суммы гинзенозидов на уровень экспрессии гена *Hmgb1* в прилежащем ядре и гиппокампе головного мозга крыс в период отмены этанола

Результаты эксперимента показали повышенный уровень экспрессии гена *Hmgb1* в Nac (Рисунок 29) и НРР (Рисунок 30) мозга крыс в группе отмены длительного воздействия этанола на 7-е сутки. как в Nac (Рисунок 29), так и НРР мозга крыс (Рисунок 30).

В группе животных с выполненными инъекциями суммы гинзенозидов уровень экспрессии гена *Hmgb1* нормализовался до уровня значений в группе контроля.

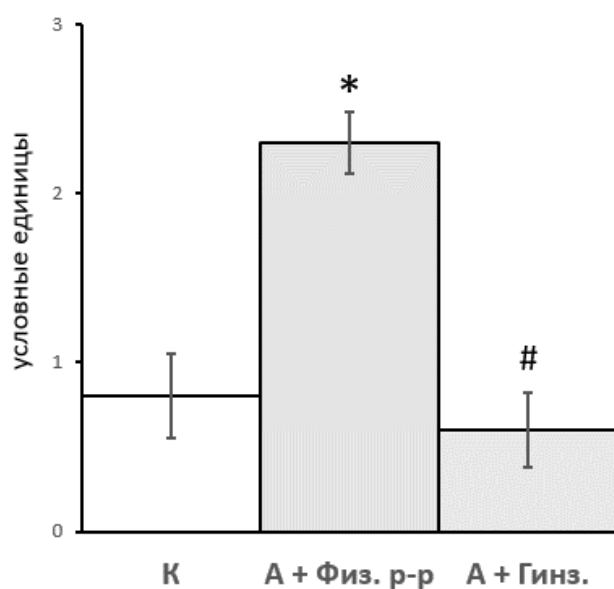


Рисунок 29 – Уровень мРНК *Hmgb1* в Nac (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

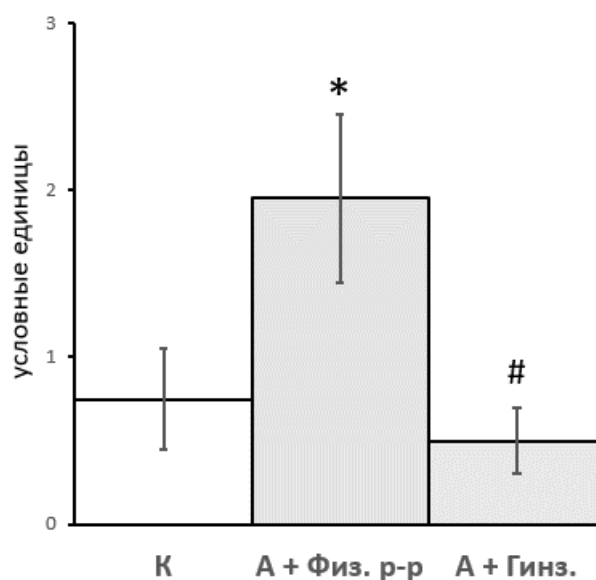


Рисунок 30 – Уровень мРНК *Hmgb1* в НРР (* $p < 0.05$ по отношению к группе контроля, # $p < 0.05$ по отношению к группе алкоголизации)

3.5 Содержание микро-РНК в прилежащем ядре головного мозга крыс при длительном воздействии этанола

Моделирование длительного воздействия этанола и состояния отмены выполнено по протоколу 4 (см. главу «Материалы и методы»).

Длительная воздействие этанола в течение 1 мес. привела к снижению уровня miR-let7b в 1,71 раза в Nac головного мозга крыс, уровень miR-96 снизился в 3,87 раза, уровень miR-182 снизился в 2,29 раза. Напротив, содержание miR-155 повысилось в 1,41 раза (Рисунок 31).

Результаты нашего эксперимента показали, что уровень мРНК TLR7 также был понижен в Nac в результате длительной алкоголизации (Рисунок 32), как и miR-let7b. В. Нами получены данные о повышении содержания мРНК TLR4 (Рисунок 32), при этом уровень miR-155 также повышен.

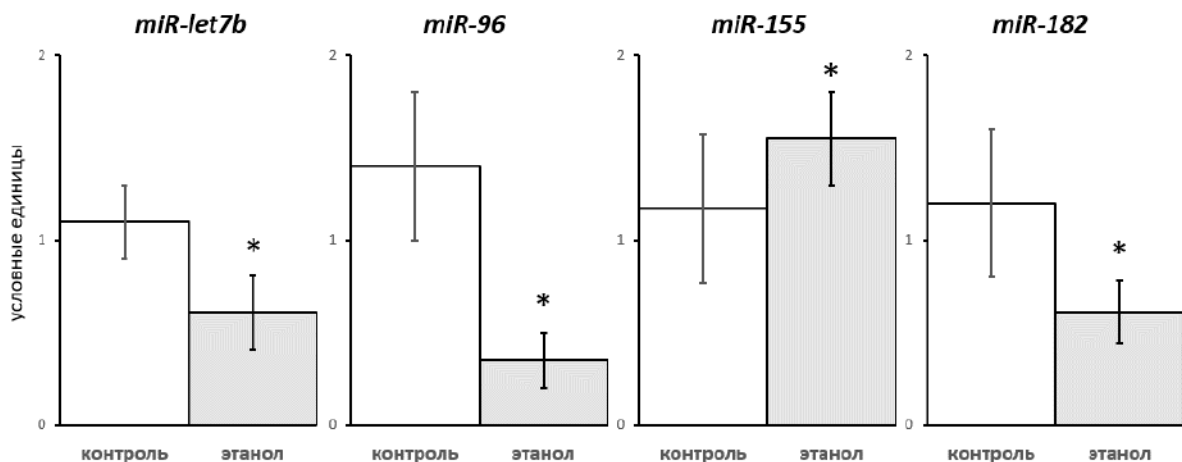


Рисунок 31 – Уровень miR в Nac
(* $p \leq 0.05$ по отношению к контролю)

Механизм взаимодействия кластера микро-РНК miR-183C (в него входят miR-96 и miR-182) с TLR4 не до конца изучен, однако есть работы, в которых на примере miR-182-5p сообщается о наличии возможных таких взаимосвязей (Ureña-Peralta J.R., 2018, 2020). В нашем эксперименте при повышенном содержании мРНК TLR4 в Nac мы наблюдаем пониженный уровень экспрессии miR-96 и miR-182.

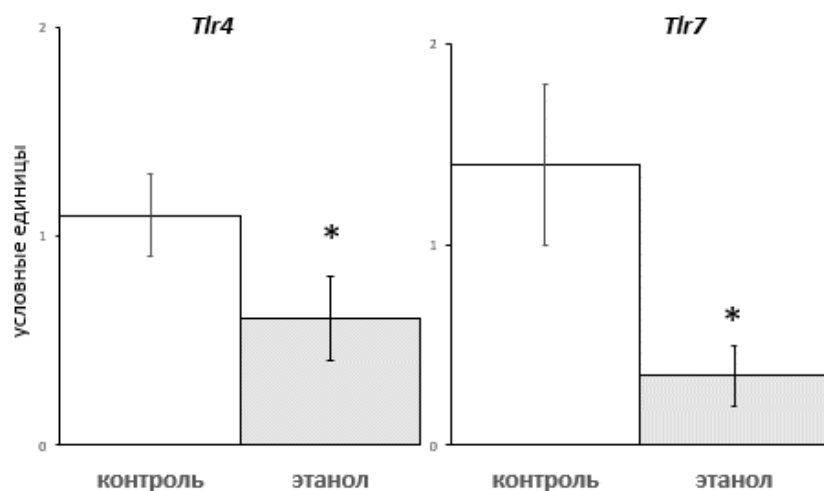


Рисунок 32 – Уровень мРНК TLR в Nac
 (* $p \leq 0.05$ по отношению к контролю)

Кроме того, имеются наблюдения, что этанол вызывает образование комплексов HMGB1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством активации TLR7 в нейронах (Coleman L.G., et al., 2017). Результаты нашего эксперимента выявили повышенный уровень мРНК Hmgb1 в Nac (Рисунок 33), тогда как miR-let7b и мРНК TLR7 были понижены. Такие данные, по всей видимости, указывают на отсутствие функционально значимой взаимосвязи между Hmgb1 и системой miR-let7b-TLR7 в Nac, так как получены разнонаправленные ответы в отношении уровня экспрессии Hmgb1 и miR-let7b в данной структуре мозга.

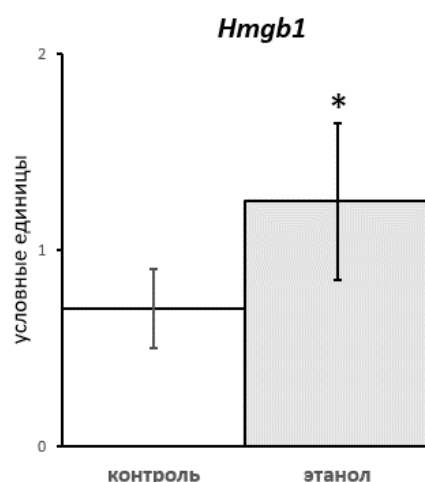


Рисунок 33 – Уровень мРНК Hmgb1 в Nac
 (* $p \leq 0.05$ по отношению к контролю)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Экспрессия генов TLR и провоспалительных цитокинов в условиях длительного воздействия этанола и при отмене этанола в головном мозге крыс

Уровень мРНК TLR3 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя. В экспериментах на мышах показано, что TLR3-сигнализация вовлечена в развитие провоспалительного ответа при употреблении алкоголя, а также опосредует механизмы патологического влечения к алкоголю и, следовательно, повышению уровня его потребления (Warden A.S., et al., 2018). Однако данных совсем немного, чтобы можно было сделать полноценные выводы о вкладе TLR3 в патогенез алкоголизма. Совсем нет работ, которые бы показывали, что происходит с экспрессией гена TLR3 в лимбических структурах мозга, таких как гиппокамп, миндалевидное тело и стриатум. Отсутствуют данные и об изменении экспрессии гена TLR3 в головном мозге в период отмены алкоголя на разных сроках после длительной алкоголизации. Исходя из этого, целью данного эксперимента послужило оценить уровень экспрессии гена TLR3 в различных структурах головного мозга крыс в период длительной алкоголизации (1 мес.), а также на разных сроках отмены алкоголя (1-е, 7-е, 14-е сут.).

Мы получили, что уровень мРНК TLR3 в условиях алкоголизации изменяется только в гиппокампе мозга крыс, однако в период отмены алкоголя наблюдаются изменения в экспрессии гена TLR3 на уровне мРНК во всех исследуемых нами структурах головного мозга (Айрапетов и др., 2020). К 14-му дню отмены уровень мРНК ниже уровня контрольных значений в миндалевидном теле (в 4,6 раз), выше уровня контрольных значений в гиппокампе (в 15,5 раз) и в стриатуме (в 2,1 раз), менее значительные изменения в медиальной энторинальной коре (выше уровня контроля в 1,9 раз).

Из литературных данных известно, что TLR3-зависимая сигнализация может оказывать влияние на уровень добровольного потребления алкоголя в эксперименте на грызунах (Warden A.S., et al., 2018). Так, однократное введение

внутрибрюшинно агониста TLR3 (поли (I:C)) мышам приводит к увеличению уровня добровольного потребления алкоголя в двухпоилочном тесте (Warden A.S., et al., 2018). Исследуя последствия применения поли (I:C) на экспрессию генов в прилежащем ядре мозга крыс, было показано, что активация TLR3 приводит к увеличению уровней мРНК TLR3, COX2 (cyclooxygenase 2, циклооксигеназа 2), а также и генов глутаматергической системы (mGluR2 – metabotropic glutamate receptor 2, метаботропный рецептор глутамата 2; mGluR3; GLT1 – glutamate transporter 1, глутаматный транспортер 1) и гена BDNF (βrain-derived neurotrophic factor, нейротрофический мозговой фактор) в прилежащем ядре мозга (Nacc, nucleus accumbens). Кроме того, увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением уровня мРНК TLR3. Данные результаты свидетельствуют о том, что работа глутаматергической системы подвергается изменению при активации TLR3 (Randall P.A., et al., 2018).

Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что полученные изменения TLR3 на уровне мРНК в лимбических структурах головного мозга в период отмены алкоголя могут быть связаны не только с вовлеченностью TLR3 в активацию экспрессии провоспалительных генов, но и в развитие механизмов, направленных по повышению уровня патологического влечения к алкоголю в период отмены алкоголя. Так что вполне возможно, что в изучаемых нами структурах роль TLR3 может связана с опосредованной их вовлеченностью в дисрегуляцию нейромедиаторных систем, что может и приводить, например, к мотивации употребить алкоголь в период его отмены. Для подтверждения полученных предположений необходимо в дальнейшем проведение дополнительных исследований.

Уровень мРНК TLR4 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя. Наибольшее количество работ было направлено на изучение вовлеченности TLR4 в механизмы активации провоспалительного сигналинга в результате потребления этанола, однако большинство таких работ выполнено на культурах клеток и на коре головного мозга мышей (Blednov Y.A., et al., 2017, 2012; Warden A.S., et al., 2018). Мы же сосредоточили свое внимание на изучении уровня

экспрессии гена TLR4 на уровне мРНК в таких структурах мозга крыс, как миндалевидное тело, медиальная энторильная кора (mEC), стриатум и гиппокамп.

Результаты нашего эксперимента не показали существенных изменений в структурах длительно алкоголизированного мозга спустя 1 мес. алкоголизации (Айрапетов и др., 2020). Однако в период отмены алкоголя уровень мРНК изменяется во всех исследуемых нами структурах головного мозга крыс. Так, к 14-му дню отмены уровень мРНК TLR4 снижается в миндалевидном теле (в 2,4 раза) и медиальной энторинальной коре (в 1,6 раз) ниже уровня контрольных значений, в стриатуме возвращается до уровня контрольных значений, в гиппокампе значение уровня мРНК TLR4 превышает в 13,5 раз уровень контрольного значения.

Большое количество выполненных исследований на крысах и мышах с применением генетических и фармакологических манипуляций (нокаут TLR4 и применение антагонистов), показали, что активность TLR4 не регулируют уровень потребления этанола, но, тем не менее, наблюдаются изменения в TLR4-опосредованном сигналинге после употребления алкоголя (Blednov Y.A., et al., 2017, 2012; Warden A.S., et al., 2018). Однако несмотря на то, что TLR4 непосредственно не вовлечен в формирование патологического влечения к алкоголю, он участвует в процессах активации провоспалительных генов, результатом чего служит развитие нейровоспалительного процесса в ЦНС. Также имеются предположения о том, что TLR4-MyD88-зависимый сигналинг может изменять активность ГАМК-ергической трансмиссии в ЦНС (Blednov Y.A., et al., 2017), что указывает и на иные физиологические роли TLR4, отличающиеся от активации генов врожденной иммунной системы. Имеются данные и о том, что TLR4 образует гетеродимеры с рецептором кортиколиберина второго типа (CRFR2) в ЦНС (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017). Введение внутривенно LPS (lipopolysaccharide, липополисахарида), экзогенного лиганда TLR4, ускоряет развитие тревожного поведения у животных, впоследствии подвергающихся воздействию этанола. Мыши, лишённые TLR4 или MyD88 становились менее чувствительными к седативным и опьяняющим эффектам от этанола, тогда как мыши, лишённые TLR2, не отличались от контрольных мышей в этих тестах

(Blednov Y.A., et al., 2017). Все это указывает на то, что TLR4 может опосредованно изменять активность нейромедиаторных систем, что может также вносить свой вклад в патогенез алкоголизма.

Уровень мРНК TLR7 в мозге крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя. Помимо уже описанных TLR3 и TLR4 небольшое количество исследований было направлено на изучение вклада TLR7 в патогенез алкоголизма (Coleman L.G., et al., 2017). При этом уровень экспрессии гена TLR7 в различных структурах мозга ранее не изучался.

В нашем эксперименте получили, что уровень мРНК TLR7 в длительно алкоголизированном мозге не изменяется ни в одной из исследуемых структур головного мозга (Айрапетов и др., 2020). В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК TLR7 был понижен в миндалевидном теле (в 3,2 раза) и стриатуме (в 3,5 раз), повышен в гиппокампе (в 8,5 раз), в медиальной энторинальной коре изменений на уровне мРНК не выявлено.

Относительно полученных изменений на уровне мРНК сложно сделать какие-либо существенные выводы, так как работ, уделяющих внимание TLR7-зависимой сигнализации в головном мозге не так много.

Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в условиях алкоголизации и при отмене алкоголя. В нашем эксперименте, используя модель полупринудительной алкоголизации крыс в течение 1-го мес. 20%-ым этанолом, были получены данные об уровнях мРНК IL-1 β и CCL2 с целью выявления наличия повышенной экспрессии провоспалительных генов врожденного иммунного ответа в условиях алкоголизации, а также в условиях отмены этанола. Высокий уровень мРНК провоспалительных цитокинов может свидетельствовать о наличие нейровоспалительного процесса в головном мозге крыс (Coleman L.G., et al., 2018, 2017, 2017).

В нашем эксперименте уровень мРНК IL-1 β повышен в миндалевидном теле (в 2,5 раза) и в mEC (в 2,2 раза), в гиппокампе отмечается небольшое снижение (в 1,6 раз). В период отмены алкоголя к 14-дню отмены уровень мРНК IL-1 β приходит к норме, достигнув уровня контрольных значений, в миндалевидном теле и в mEC,

однако в гиппокампе уровень мРНК IL-1 β к 14-дню отмены превышает уровень контроля в 13,6 раз.

Уровень мРНК CCL2 незначительно изменяется в условиях алкоголизации, к 14-му дню отмены этанола во всех исследуемых структурах мозга уровень мРНК находится на уровне контрольных значений. Однако стоит отметить то, что в гиппокампе на 7-е сут. отмены уровень мРНК CCL2 превышает уровень контроля в 9,1 раз. Хорошо известно, что цитокин CCL2 является важнейшим хемокином, который отвечает за миграцию моноцитов к очагу воспаления (Лебедев К.А., Понякина И.Д. 2017; Crews F.T., et al., 2016). Следовательно, такая повышенная экспрессия гена CCL2 на 7-е сут. отмены алкоголя свидетельствует о наличие нейровоспалительного процесса в гиппокампе, при этом уровень мРНК провоспалительного гена IL-1 β в гиппокампе также повышен в 4,3 раза на 7-е сут. отмены и 13,6 раз к 14-му дню отмены. Все эти данные свидетельствуют о наличие длительного нейровоспалительного процесса в гиппокампе мозга крыс в период отмены алкоголя.

Корреляционный анализ. Хорошо известно, что активация TLR-зависимой сигнализации при участии разных подтипов TLR приводит к активации различных провоспалительных генов, в том числе IL-1 β и CCL2 (Coleman L.G., et al., 2017, 2018; Crews F.T., et al., 2017). Исходя из полученных нами данных мы предположили, что активации провоспалительных генов может быть и в нашем случае, в условиях длительной полупринудительной алкоголизация крыс этанолом и в условиях отмены этанола, вызвана активацией TLR-зависимой сигнализации, которая реализуется при участие толл-подобных рецепторов. Именно поэтому наша дальнейшая задача заключалась в попытке выяснить вклад разных подтипов TLR в активацию выбранных нами генов врожденной иммунной системы (IL-1 β и CCL2) в разных структурах головного мозга. С этой целью нами был выполнен корреляционный анализ, который показал взаимосвязь между динамикой изменчивости уровней мРНК провоспалительных цитокинов и TLRs в исследуемых нами структурах головного мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене алкоголя.

Так, были получены данные о том, что уровень мРНК TLR3 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс. Полученная корреляция может указать на вовлеченность TLR3-зависимой сигнализации в повышении экспрессии гена провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе мозга крыс. В других же структурах мозга (стриатум, миндалевидное тело, mEC) уровень мРНК TLR3 не коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β , что может указывать нам на то, что активация TLR3-зависимой сигнализации в других структурах мозга может приводить к развитию иных событий на уровне внутриклеточной сигнализации. К примеру, известно, что TLR3-зависимая сигнализация наряду с TLR4-зависимой сигнализацией может приводить к активации транскрипционных факторов интерферонов (IRF3), что в дальнейшем приводит уже к повышенной экспрессии генов интерферонов (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017).

Далее, корреляционный анализ показал нам, что уровень мРНК TLR4 коррелирует с уровнем мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе и в mEC. На основе данной корреляции также можем сделать вывод что TLR4-зависимая сигнализация, вероятно, также вовлечена в активацию экспрессии провоспалительного гена IL-1 β в mEC и гиппокампе. Ранее исследователями было показано, что активация TLR4 приводит к повышению активности уровня не только IL-1 β , но CCL2 (Crews F.T., et al., 2014, 2016, 2017). Однако в нашем эксперименте уровень мРНК TLR4 не коррелирует ни в одной из структур мозга с уровнем цитокина CCL2. Полученный результат может объясняться выбранной нами иной методикой алкоголизации или отобранными экспериментальными группами для исследования уровня мРНК. Возможно, на других сроках алкоголизации и сроках отмены алкоголя мы могли бы наблюдать иные результаты. Также возможно, что в исследуемых нами структурах мозга активация TLR4 не приводит к активации гена провоспалительного цитокина CCL2, но приводит в других, как это было показано ранее, например, в префронтальной коре мозга в эксперименте на мышах (Crews F.T., et al., 2014, 2016, 2017). Наблюдаемые изменения активности гена TLR4 на уровне мРНК в других структурах мозга, где уровень мРНК не коррелирует с IL-1 β может объясняться тем, что TLR4-зависимая

сигнализация в миндалевидном теле и стриатуме, возможно, приводит к активации иных провоспалительных генов. Известно, что TLR4, как и TLR3 способен активировать транскрипционные факторы интерферонов (IRF3), что приводит к повышению экспрессии генов интерферонов (Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2017).

Далее были получены данные о том, что уровень мРНК TLR7 коррелирует с уровнем мРНК IL-1 β в гиппокампе мозга крыс, что может также указывать на вовлеченность TLR7-зависимой сигнализации в активации провоспалительных генов в данной структуре мозга. В других же структурах мозга уровень мРНК TLR7 не наблюдается такой корреляции, что указывает на то, что TLR7-зависимая сигнализация в других структурах мозга может играть иную роль.

4.2 Экспрессия гена *Hmgb1* в условиях длительного воздействия этанола и при отмене этанола в головном мозге крыс

В нашем исследовании уровень экспрессии гена *Hmgb1* в условиях длительной алкоголизации повышен в стриатуме мозга крыс, тогда как в амигдале и гиппокампе остается без изменений. Отмена алкоголя приводит к изменениям содержания мРНК *Hmgb1* в стриатуме и амигдале мозга крыс, тогда как в гиппокампе не наблюдается подобных изменений. В стриатуме отмечается повышенное содержание мРНК на 1-е и 14-е сут. отмены алкоголя, при этом на 7-е сут. значение содержания мРНК было таким же в группе контроля. В амигдале уровень мРНК был повышен на 1-е сут. отмены алкоголя, на 7-е и 14-е сут. показатель не отличался от уровня контрольных значений.

При этом отсутствует какая-либо корреляция между содержанием мРНК провоспалительного цитокина IL-1 β и мРНК *Hmgb1* в исследуемых нами структурах головного мозга. В группе длительной алкоголизации уровень мРНК IL-1 β повышен в стриатуме мозга крыс, тогда как в амигдале и гиппокампе этого не наблюдается. В период отмены алкоголя в стриатуме уровень мРНК IL-1 β повышен на 1-е сут. отмены, при этом в амигдале и гиппокампе на 1-е сут. отмены алкоголя нет изменений. В амигдале наблюдается повышение уровня мРНК IL-1 β

лишь на 14-е сут. отмены. В гиппокампе нет изменений в содержании мРНК в сравнение с группой контроля в период отмены алкоголя на исследуемых нами сроках.

В экспериментах Vetreno R.P. и Crews F.T. (Vetreno R.P., et al., 2012) на модели подростковой алкоголизации (англ. adolescent binge drinking) грызунов было показано, что этанол увеличивает содержание мРНК и белка HMGB1 в коре головного мозга крыс-подростков, которая сохраняется в последствии у взрослых крыс. Было сделано предположение, что подростковая алкоголизация приводит к постоянному усилению активности врожденной иммунной системы, которая сохраняется на повышенном уровне в мозге крыс, что коррелировало в исследовании и с нейрокогнитивными дисфункциями у взрослых крыс (Vetreno R.P., et al., 2012). Позже была выдвинута гипотеза, согласно которой белок HMGB1 может быть вовлечен в повышенную активацию системы врожденной иммунной системы, ввиду того что является эндогенным агонистом многих рецепторов врожденной иммунной системы.

В 2013 Whitman V.A. в своей работе (Whitman V.A., et al., 2013), используя антагонист к белку HMGB1, подтверждает гипотезу о том, что повышение количества белка HMGB1 приводит к повышению уровня мРНК провоспалительных цитокинов в префронтальной коре мозга у длительно алкоголизированных мышей, однако допускает возможность иных результатов, которые можно будет получить в других структурах головного мозга.

В мозжечке длительно алкоголизированных мышей показано небольшое повышение содержания мРНК HMGB1 по отношению к группе контроля. Кроме того, в мозжечке наблюдался повышенный уровень мРНК рецепторов к HMGB1 (TLR2, TLR4, TLR9 и RAGE) и уровень мРНК провоспалительных цитокинов (про-IL-1 β , TNF α , MCP-1) (Lippai D., et al., 2013). Воздействие этанола в подростковом возрасте крыс увеличивает экспрессию рецепторов TLR4 и белка HMGB1 в префронтальной коре мозга, которая сохраняется на повышенном уровне в мозге взрослых крыс (Vetreno R.P., et al., 2012). 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-го дня отмены алкоголя, однако понизился в группе 28-го дня отмены этанола; кроме того, содержание ни одного из исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов не было изменено на 28-е сут. отмены алкоголя в лобной коре мозга крыс (Sanchez-Alavez M., et al., 2019).

4.3 Анализ экспрессии генов системы TLR-сигналикации при использовании рифампицина

Воздействие этанола способствует повышению уровня мРНК и белка некоторых подтипов TLR (TLR3, TLR4, TLR7) в коре и гиппокампе головного мозга с последующим повышением уровня ряда провоспалительных сигнальных молекул, а применение антагонистов к TLR-сигнальным каскадам реакций или нокаут по генам этих рецепторов приводит к снижению уровня провоспалительных факторов в мозге (Айрапетов М.И., et al., 2020, 2024; Lewohl J.M., et al., 2000; Crews F.T., et al., 2011; Coleman L.G. Jr., et al., 2020). Повышенный уровень мРНК TLR3 был отмечен и в посмертных образцах орбифронтальной коры головного мозга людей, страдающих алкоголизмом (Crews F.T., et al., 2011). Алкоголизация мышей в течение 10 дней приводит к увеличению уровня мРНК TLR3 в головном мозге мышей, а также к увеличению уровня белка TLR3 в орбифронтальной и энторинальной коре (Crews F.T., et al., 2011). В работе на культурах клеток было показано, что добавление этанола вызывает активацию TLR3 и это способствовало высвобождению $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ нейронами и астроцитами, а блокирование гена TRAIL, адаптерного белка к TLR3, приводило к снижению уровней $IFN\beta$ и $IFN\gamma$ как в астроцитах, так и в нейронах (Lawrimore C.J., et al., 2019). В этой же работе совместное действие этанола и агониста TLR3 показало увеличение уровней мРНК $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$, а также увеличение уровней белков p38 и IRF3 в культурах клеток микроглии и нейронов (Lawrimore C.J., et al., 2019). Кроме того, имеются данные, которые указывают на то, что изменения в функционировании TLR3-сигналикации оказывает влияние на уровень добровольного потребления этанола в

экспериментах на грызунах (Warden A.S., et al., 2019), что наводит на предположение о взаимосвязи внутриклеточных путей от TLR3 с нейромедиаторными путями. Имеется наблюдение, что при активации TLR3 специфическим агонистом повышается экспрессия генов глутаматергической системы: *mGluR2* (metabotropic glutamate receptor 2), *mGluR3*, *Glt1* (glutamate transporter 1). При этом увеличение мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением мРНК TLR3 (Randall P.A., et al., 2019). Имеется лишь одно исследование, где изучалось содержание мРНК TLR3 в Нас у крыс и было отмечено небольшое повышение мРНК на 1-е сут. отмены этанола, тогда как на более поздних сроках содержание мРНК не исследовалось (McCarthy G.M., et al., 2017).

Ранее исследователи показали, что употребление этанола мышами в течение 2 нед. Привело к активации TLR4-зависимых провоспалительных сигнальных каскадов в коре головного мозга, что выражалось активацией MAP-киназ и NF-κB с последующим выделением COX-2 (англ. Cyclooxygenase 2), iNOS (англ. Inducible nitric oxide synthase), HMGB1 (англ. High-mobility group protein B1). При этом наблюдалось развитие нейровоспалительного процесса на фоне повышенной активности этих провоспалительных факторов, что служило причиной демиелинизации аксонов и приводило к структурным синаптическим изменениям в результате повреждения белков миелина и синаптических белков. Эти события в последующем сказывались на ухудшении когнитивных параметров в тестах распознавания объектов, пассивного избегания и обонятельного поведения у мышей (Montesinos J., et al., 2015). Применение генетических и фармакологических манипуляций (нокаут TLR4 и применение антагонистов) показало, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола (Harris R.A., et al., 2017), однако нокдаун гена TLR4 ингибирует продукцию провоспалительных медиаторов, блокируя активацию MAP-киназ и NF-κB путей в астроцитах (Alfonso-Loeches S., et al., 2010). На нокаутных мышях по гену *TLR4*, было показано, что такие мыши защищены от вызванного этанолом в течение 5 мес. повышения уровня концентрации цитокинов и хемокинов в мозге, тогда как в группе животных дикого типа (в присутствии гена *TLR4*) употребление этанола TLR4 приводит к

увеличению концентрации цитокинов (IL-1 β , IL-17, TNF- α) и хемокинов (CCL2, MIP-1 α , CX3CL1) в крови и в стриатуме мозга животных (Айрапетов М.И., et al., 2020; Pascual M., et al., 2015).

Результаты нашего эксперимента показали, что помимо повышенного уровня мРНК TLR4 отмечается также повышение уровня цитокина CCL2, а также небольшое повышение цитокина IL1 β . Кроме того, интересным наблюдением в нашем эксперименте для нас оказалось то, что одновременно с этим мы обнаружили пониженное содержание мРНК противовоспалительных цитокинов IL10 и IL11. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о развитии длительного провоспалительного состояния в Nac, вызванного длительным употреблением этанола, и вполне возможно, что TLR4-зависимые сигнальные внутриклеточные пути здесь могут выполнять свою ключевую роль.

Кроме того, мы выявили повышение уровня мРНК Hmgb1 в Nac. Установлено, что белок Hmgb1 служит эндогенным агонистом TLR4. Содержание белка повышается в головном мозге при различных патологических состояниях, в том числе и при алкоголизме. Предполагается, что повышение его содержания может инициировать TLR4-зависимую сигнализацию, запуская нейровоспалительный процесс. Кроме того, имеются наблюдения, что этанол вызывает образование комплексов Hmgb1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством активации TLR7 (Coleman L.G., et al., 2017). В нашем эксперименте уровень мРНК TLR7 к 10-му дню отмены не имел достоверных изменений относительно группы контроля. Исходя из этого, можем предположить, что повышенное содержание мРНК Hmgb1 в Nac может опосредовать длительное повышение провоспалительных TLR4-сигнальных каскадов реакций, но не оказывает существенного влияния на TLR7-сигнализацию по причине отсутствия выраженного повышения экспрессии гена *Tlr7* в период отмены алкоголя. Отметим, что содержание мРНК TLR7 в Nac нами было оценено впервые при отмене длительной алкоголизации, и сравнивать полученные нами данные с аналогичными работами исследователей ранее не представляется возможным.

Ранее нами было показано, что длительная алкоголизация (1мес.) изменяет также содержание мРНК *Hmgb1* в стриатуме и амигдале мозга крыс, что свидетельствует, по всей видимости, о наличии механизмов, регулирующих местную экспрессию гена *Hmgb1* в различных структурах головного мозга при длительной алкоголизации и отмене этанола (Айрапетов М.И., и др., 2021).

Для понимания того, какой вклад вносят адаптерные белки Myd88 и Trif (он же Ticam) в проведение внутриклеточного TLR4-зависимого сигналинга нами было оценено относительное содержание уровня их мРНК. Myd88 и Trif, как известно, передают сигнал от TLR4 на каскад внутриклеточных киназ, запуская активацию транскрипционных факторов, ответственных за регуляцию провоспалительных генов (Айрапетов М.И. и др., 2020; Crews F.T., et al., 2011; Coleman L.G. Jr., et al., 2020). Мы не обнаружили достоверных изменений в содержании мРНК Myd88 и Trif. Кроме того, нами не было обнаружено достоверных изменений в содержании мРНК транскрипционных факторов NfκB, IRF3 и IRF1.

Содержание мРНК адаптерных белков изучалось ранее в Нас мозга крыс в момент длительной алкоголизации и при отмене на 1-е сут, исследователи также не обнаружили изменений в содержаниях мРНК Myd88 и Trif (McCarthy G.M., et al., 2017). Таким образом, экспрессия этих генов не подвергается изменениям в данной структуре мозга, однако это не исключает возможности усиления скорости передачи сигналов на провоспалительные гены посредством имеющегося конститутивного содержания белков транскрипционных факторов. Возможно, для этого достаточно лишь повышенной экспрессии TLR4, который инициирует сигнальный каскад реакций при поступлении этанола в организм. Кроме того, существует необходимость в поиске возможных неизвестных новых путей проведения сигнала от TLR. Так, например, существуют предположения, что TLR4 может опосредованно модулировать работу нейромедиаторных и нейропептидных систем, регулируя уровень потребления этанола, а также и другие процессы высшей нервной деятельности (Liu J., et al., 2011; June H.L., et al., 2015; Garcia Bueno B., et al., 2016; Figueroa-Hall L.K., et al., 2020; Aurelian L., et al., 2019).

Рифампицин (Rif) – антибиотик широкого спектра действия из группы ансамицинов, который используется при лечении туберкулёза, а также других инфекций: стафилококковой, менингококковой, лепры (Ebenezer G.J., et al., 2021; Cao Y., et al., 2022). Rif может быть как в связанной форме – с белками плазмы крови, так и в несвязанной, и в этом случае облегчается его прохождение через барьеры организма, в том числе и через гематоэнцефалический (Ebenezer G.J., et al., 2021; Cao Y., et al., 2022). Способность Rif к проникновению через ГЭБ представляет интерес для его применения с целью фармакологической коррекции патологических процессов головного мозга. Эпидемиологические исследования показали, что у пациентов с лепрой, получавших Rif, была замечена более низкая заболеваемость нейродегенеративными патологиями (Bi W., et al., 2021). Экспериментально было показано на различных моделях нейровоспаления, что Rif способен снижать уровень провоспалительных цитокинов, содержание β -амилоида в модели болезни Альцгеймера, α -синуклеина в модели болезни Паркинсона. Есть исследования, показывающее улучшение процесса аутофагии у мышей в гиппокампе при воздействии Rif (30 мг/кг). На модели демиелинизации мозолистого тела было показано, что при введении мышам Rif (40 мг/кг) регистрируется снижение экспрессии Вах и повышение экспрессии Bcl2, а также снижение активности каспазы 3 и каспазы 12 (Zahednasab H., et al., 2019), что свидетельствует о снижении апоптотической активности, а предварительное введение рифампицина (20 мг/кг) подавляло индуцированную литий-пилокарпином нейродегенерацию гиппокампа, снижая уровень цитохрома С в гиппокампе (Ali A.E., et al., 2018). Этих сведений достаточно, чтобы заключить, что Rif обладает нейропротекторными свойствами, однако точный механизм действия остаётся неизвестным. В одном из исследований, выполненном на культуре микроглиальных клеток, имеются сведения о конкуренции Rif и липополисахарида за связывание с белком MD2. Белок MD2 необходим для связывания лиганда TLR4 с последующим проведением сигнала. Rif, связываясь с данным белком, способствовал угнетению сигналинга LPS-CD14-MD2-TLR4-NF κ B в эксперименте, и, как следствие, отмечалось снижение активации NF- κ B и

содержания провоспалительных факторов (NO, IL-1 β , TNF α). Таким образом, Rif, конкурентно связываясь с MD2, может блокировать TLR4-зависимую сигнализацию (Wang X., et al., 2013).

В нашем исследовании Rif (100 мг/кг) не оказал влияния на содержание мРНК TLR3 и TLR7, тогда как содержание TLR4 было снижено до уровня контрольных значений на 10-е сут. отмены алкоголя (Рис. 1). Уровень мРНК Hmgb1 под действием препарата вернулся к исходному уровню (Рис. 2). Оценив содержание мРНК провоспалительных цитокинов, мы обнаружили снижение мРНК провоспалительных цитокинов IL1 β и IL6 в Nac мозга крыс, при этом интересным наблюдением для нас оказалось повышение содержания мРНК противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-11 под действием инъекций Rif (100 мг/кг). Полученные нами данные свидетельствуют о возможной коррекции данным препаратом нейровоспалительных состояний, однако механизм его действия, возможно, имеет более сложный характер, связанный не только с конкуренцией Rif с лигандами TLR4 за связывание с белком MD2.

4.4 Анализ экспрессии генов системы TLR-сигнализации при использовании суммы гинзенозидов

Результаты исследований подтверждают тот факт, что длительное употребление алкоголя приводит к активации нейровоспалительных путей с последующей нейродегенерацией в ряде структур головного мозга, отвечающих за эмоциональный и когнитивный контроль (Ramos A., et al., 2022; Coleman L.G.J., et al., 2021; Airapetov M., et al., 2021, 2022; Becker H.C., et al., 2014; Gano A., et al., 2022; Griffin W.C., et al., 2022). К таким структурам, в частности, относятся выбранные нами для исследования структуры – гиппокамп (англ. hippocampus, HIP) и прилежащее ядро (англ. nucleus accumbens, Nac) (Becker H.C., et al., 2014).

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 (Koob G.F., 2014; Sobstyl M., et al., 2021; Айрапетов М.И., и др., 2022). Данные нейровизуализации свидетельствуют о развитии выраженного нейродегенеративного процесса в НАс при длительном употреблении алкоголя (Edith V.S., et al., 2005), однако ключевые механизмы, опосредующие этот процесс остаются неизвестными. ННР – область головного мозга, которая отвечает прежде всего за формирование памяти, но являясь частью лимбической системы, связана также с регуляцией эмоциональных ответов. Хроническое потребление алкоголя приводит к активации путей нейровоспаления и нейродегенерации в гиппокампе, включая снижение белого вещества, потерю олигодендроцитов и других глиальных клеток, подавляет процесс нейрогенеза (Becker H.C., et al., 2014; Griffin W.C., et al., 2022; McClintick J.N., et al., 2013; Shabani Z., et al., 2020).

Отмечено действие экстракта женьшеня, содержащего различные соединения, а также применение отдельных гинзенозидов на способность снижать развитие нейровоспалительного процесса (He Y., et al., 2018; González-Burgos E., et al., 2015; Wang X., et al., 2015; Xu X., et al., 2020; Li J., et al., 2021; Cai L., et al., 2021; Sun Y., et al., 2022; Gong L., et al., 2022; Zheng Z., et al., 2022; Xu X., et al., 2022; Pannacci M., et al., 2006; Rhule A., et al., 2008; Beamer C.A., et al., 2012; Kim T.W., et al., 2012; Zhao B.S., et al., 2014). Результаты исследований показывают влияние гинзенозидов на систему TLR при ряде патологических состояний нервной системы (Pannacci M., et al., 2006; Rhule A., et al., 2008; Beamer C.A et al., 2012; Kim T.W., et al., 2012; Zhao B.S., et al., 2014), однако на модели длительной алкоголизации, влияние гинзенозидов на систему TLR среди различных структур головного мозга ранее не исследовали. В 2008 г. в работе Rhule A. И соавт. сообщается, что экстракт *Panax notoginseng* ингибирует секрецию провоспалительных молекул и активацию врожденной иммунной системы, индуцированную активацией TLR4 (Rhule A., et al., 2008). В работе Beamer C.A. и соавт. Сообщается, что дальнейшие исследования экстракта *Panax notoginseng* могут иметь терапевтическую пользу для коррекции нейродегенеративных заболеваний. Применение экстракта в эксперименте вызывало подавление

активации микроглии, измеряемую снижением экспрессии молекул CD40 и CD86, уменьшением синтеза медиаторов воспаления IL-6 и TNF α и уровня оксида азота (NO) (Beamer C.A., et al., 2012). Исследуя эффект отдельных гинзенозидов, было показано, что гинзенозид Rg5 ингибировал экспрессию iNOS (англ. Inducible nitric oxide synthase) и COX (англ. cyclooxygenases), а также уровень активных форм NF- κ B (англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) при ЛПС (липополисахарид)-стимулированном воспалении легких у мышей. Ингибирующее действие Rg5 (10 мг/кг) было сопоставимо с действием дексаметазона (5 мг/кг). Авторы предположили, что эффект опосредуется путем ингибирования связывания ЛПС с TLR4 на макрофагах (Kim T.W., et al., 2012). Гинзенозид Rg1 обладает активностью в отношении подавления сигнальных путей от TLR3 и TLR4, уменьшая синтез факторов нейровоспаления, индуцированных 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- β и iNOS в лизатах клеточного супернатанта (Zhao B.S., et al., 2014). В другой работе гинзенозид Rg1 уменьшал воспаление, вызванное алкоголем, подавляя путь TLR4/NF- κ B в печени мышей, тем самым оказывая гепатопротекторный эффект (Xia T., et al., 2022). 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 уровни NO в тканях почек мышей. Добавление Rg4 к HMGB1-активированной культуре эндотелиальных клеток пупочных вен человека понизило экспрессию TLR4 и TNF- α (Kim G.O., et al., 2022). Оценивалось влияние гинзенозида Rg2 в крысиной модели черепно-мозговой травмы с внутримозговым кровоизлиянием. Введение Rg2 снизило уровни IL-1 β и TNF- α в пораженном полушарии, лечение гинзенозидом Rg2 ингибировало увеличение экспрессии TLR4, MyD88, p-I κ B α и p-NF κ B, уменьшало снижение экспрессии окклюдина и клаудина-5 в пораженном полушарии (Cai L., et al., 2021). Гинзенозид Rb1 напрямую снижает уровень активных форм кислорода, ингибирует митохондриальный апоптотический путь, защищая кардиомиоциты

новорожденных крыс от ишемического повреждения, уменьшает высвобождение цитохрома С и уровень повреждения нервной ткани, вызванное митохондриальным стрессом в модели церебральной ишемии (Zhou P., et al., 2019).

Имеется 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 сут. отмены длительной алкоголизации в Nac у крыс, на более поздних сроках содержание мРНК ранее не исследовалось (McCarthy G.M., et al., 2017). В другой работе активация TLR3 агонистом поли(I:C) привела к повышению уровней мРНК нейроиммунных генов (TLR3, COX2), глутаматергических генов (mGluR2, mGluR3, GLT1) и нейротрофического фактора BDNF в Nac, а увеличение содержания мРНК каждого из этих генов коррелировало с увеличением 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 мРНК TLR3 в нейрональных клетках (Randall P.A., et al., 2019). В работе с нокаутными мышами по Tlr4 было показано, что TLR4 выполняет значимую роль в функционировании Nac (Kashima D.T., et al., 2017). Соответственно, изменения в системе TLR4 будут также отражаться на функционировании Nac. Однако есть результаты исследования, в котором нокаун Tlr4 в Nac у мышей не уменьшал уровень добровольного потребления алкоголя в тестах непрерывного или прерывистого доступа к алкоголю (Harris R.A., et al., 2017). 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-е сут. отмены длительной алкоголизации (Айрапетов М.И., et al., 2022), 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 TLR4 и применение антагонистов), которые показали, что активность TLR4 не регулирует уровень потребления этанола, но наблюдаются изменения TLR4-опосредованного сигналинга впоследствии употребляемого алкоголя (Harris R.A., et al., 2017; Vlednov Y.A., 2017). Исследование на мышах показало, что потребление этанола мышами в течение 2 недель привело к активации TLR4-зависимых провоспалительных процессов, которые характеризовались активацией MAP-киназ и NF-κB с последующим выделением COX-2 (Cyclooxygenase 2), iNOS (Inducible nitric oxide synthase), HMGB1 (high-mobility group protein B1). 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 (Montesinos J., et al., 2015). Нокаут гена TLR4 сопровождался торможением продукции провоспалительных медиаторов, блокадой активации MAP-киназ и NF-κB путей в астроцитах (Alfonso-Loeches S., et al., 2010). Таким образом, не исключено, что наблюдаемые нейродегенеративные изменения в условиях длительного потребления алкоголя в гиппокампе также могут реализовываться посредством повышенной активности TLR4-сигнализации. Данные об изменении уровня экспрессии TLR3 и TLR7 в гиппокампе в условиях длительной алкоголизации также имеются, хотя физиологический смысл этих изменений все еще до конца не определен. Влияние этанола на TLR7 и микро-РНК let-7b было исследовано на культуре ткани гиппокампа-энторинальной коры крыс (Coleman L.G., et al., 2017): ткань алкоголизованного гиппокампа характеризовалась повышенным содержанием TLR7 (Coleman L.G., et al., 2017). 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 (Coleman L.G., et al., 2017). Этанол вызывает увеличение содержания белка TLR7 и высвобождение let-7b и HMGB1 из микроглии. Ингибирование HMGB1 глицирризином предотвращало развитие нейротоксичности (Coleman L.G., et al., 2017).

Повышенный уровень мРНК всех исследуемых нами TLR в гиппокампе еще раз указывает на происходящие здесь изменения в системе TLR в условиях длительной алкоголизации. Интересным в данной работе было то, что используемая нами сумма гинзенозидов (50 мг/кг) понизила уровень мРНК TLR4 в Нас, а также нормализовала уровень 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. Существует представление о том, что белок Hmgb1 может быть вовлечён в повышенную активацию системы врождённой иммунной системы в условиях длительной алкоголизации. В работе Whitman. И соавт. (Whitman B.A., et al., 2013) повышение количества белка HMGB1, коррелировало с повышением уровня мРНК провоспалительных цитокинов в префронтальной коре мозга у длительно алкоголизованных мышей. В другой же работе с длительной алкоголизацией крыс было показано, что уровень белка HMGB1 в лобной коре мозга крыс не изменился в группах длительной алкоголизации и 1-го дня отмены алкоголя, однако понизился в группе 28-го дня отмены этанола; кроме того, содержание ни одного из исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов не было изменено на 28 сутки отмены алкоголя в лобной коре мозга крыс (Sanchez-Alavez M., et al., 2019). В мозжечке длительно алкоголизованных 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-1 β , TNF- α , CCL2 (Lippai D., et al., 2013). Результаты нашего более раннего исследования также продемонстрировали, что в стриатум, амигдале и гиппокампе мозга длительно алкоголизованных крыс в период отмены алкоголя на разных сроках происходят разнонаправленные изменения в экспрессии генов Hmgb1 и IL-1 β (Айрапетов М.И., et al., 2021). В текущем работе важным результатом оказалось то, что выполненные нами инъекции суммы гинзенозидов (50 мг/кг) восстановили патологически повышенный уровень мРНК Hmgb1 до уровня контрольных значений, как в гиппокампе, так и в Nac головного мозга длительно алкоголизованных крыс.

О влиянии гинзенозидов на IRF3 и IRF1 известно совсем немного. Однако отметим, что исследование с применением гинзенозида Rb3 также показало уменьшение количества фосфорилированных форм IRF3 в тканях поврежденной кожи, причем это изменение было наиболее очевидно в микрососудистых эндотелиальных клетках (Li Y., et al., 2022). При этом другой гинзенозид Rg3 в ином эксперименте уже индуцировал фосфорилирование IRF3 и его транслокацию в ядро (Choi Y.J., et al., 2014). Гинзенозид Rg1 способствовал ангиогенезу в процессе заживления диабетической раны посредством передачи сигналов от miR-23a и снижения уровня IRF1 (Cai H.A., et al., 2019). 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-е сут. 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 IL1 β в гиппокампе, вероятно, может объясняться тем, что к 7-му дню отмены длительной алкоголизации уровень экспрессии гена IL1 β мог нормализоваться в данной структуре мозга, вероятно, за счет активации компенсаторных

противовоспалительных и регенеративных путей внутриклеточной сигнализации. При этом мРНК провоспалительного цитокина CCL2 сохраняется к 7-му дню отмены алкоголизации на повышенном уровне в обеих исследованных нами структурах головного мозга. Сходные результаты нами были выявлены в наших более ранних работах (Айрапетов М.И., et al., 2022; Айрапетов М.И., et al., 2021). Инъекции гинзенозидов откорректировали данное состояние лишь в прилежащем ядре головного мозга, что еще раз подтверждает разнонаправленный характер действия суммы гинзенозидов в отношении различных структур головного мозга.

4.5 Содержание микроРНК в условиях длительного воздействия этанола в головном мозге крыс

Из литературных данных известно, что исследуемые нами miR могут иметь функциональную взаимосвязь с сигнальными путями toll-подобных рецепторов (TLR7 и TLR4), которые участвуют в инициации нейровоспалительных событий, развивающихся при хронической алкоголизации (Lim Y., et al., 2021; Lehmann S.M., et al., 2012; Lippai D., et al., 2013; Coleman L.G., et al., 2017; Ureña-Peralta J.R., et al., 2018, 2020). Известно, что miR-let7b является эндогенным агонистом TLR7 (Lehmann S.M., et al., 2012; Айрапетов М.И., et al., 2020). Изменение экспрессии miR-let7b может иметь функциональную взаимосвязь с TLR7-сигнальным каскадом реакций (Lehmann S.M., et al., 2012; Айрапетов М.И., et al., 2020; Coleman L.G., et al., 2017). Описано, что при активации TLR4 наблюдается повышение miR-155 в микроглии головного мозга мышей, тогда как у нокаутных по гену *Tlr4* (TLR4-KO) этого не наблюдается (Lippai D., et al., 2013). У мышей TLR4-KO не изменяется содержание miR-96 коре головного мозга, тогда как длительная алкоголизация у мышей дикого типа снижала в уровень miR-96 (Ureña-Peralta J.R., 2018, 2020).

В нашем эксперименте длительная алкоголизация крыс в течение 1 мес. привела к снижению уровня miR-let7b в 1,71 раза в в Nac головного мозга, уровень

miR-96 снизился в 3,87 раза, уровень miR-182 снизился в 2,29 раза. Напротив, содержание miR-155 повысилось в 1,41 раза.

Механизм взаимодействия кластера микро-РНК miR-183С (в него входят miR-96 и miR-182) с TLR4 не до конца изучен, однако есть работы, в которых на примере miR-182-5p сообщается о наличии возможных таких взаимосвязей (Ureña-Peralta J.R., 2018, 2020). В нашем эксперименте при повышенном содержании мРНК TLR4 в Нас мы наблюдаем пониженный уровень экспрессии miR-96 и miR-182.

Кроме того, имеются наблюдения, что этанол вызывает образование комплексов HMGB1-miR-let-7 в микровезикулах, которые вызывают развитие нейротоксического эффекта посредством активации TLR7 в нейронах (Coleman L.G., et al., 2017). Результаты нашего эксперимента выявили повышенный уровень мРНК Hmgb1 в Нас, тогда как miR-let7b и мРНК TLR7 были понижены. Такие данные, по всей видимости, указывают на отсутствие функционально значимой взаимосвязи между Hmgb1 и системой miR-let7b-TLR7 в Нас, так как получены разнонаправленные ответы в отношении уровня экспрессии Hmgb1 и miR-let7b в данной структуре мозга.

Заключение

Результаты выполненной диссертационной работы позволили получить сведения о состоянии экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга у длительно алкоголизированных крыс, а также на разных сроках отмены длительного воздействия этанола. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии гена *Tlr3* не был подвержен изменениям в большинстве исследованных структур мозга (стриатум, прилежащее ядро, миндалевидное тело, энторинальная кора), за исключением небольшого снижения в гиппокампе, экспрессия генов *Tlr4* и *Tlr7* не была изменена ни в одной из исследованных структур головного мозга. Однако были получены новые сведения о наличии выраженных разнонаправленных изменений в экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4* и *Tlr7* в условиях отмене длительного воздействия этанола на разных сроках в динамике. Необходимо отметить то, что характер этих изменений зависел не только от срока отмены этанола, но и от региона головного мозга, а также и от моделирования воздействия этанола, т.е. от продолжительности и, по всей видимости, и от способа введения этанола. Таким образом, разные способы моделирования длительной алкоголизации, весьма вероятно, оказывают различный эффект на выраженность ответа нейровоспалительной реакции. Исходя из этого нужно отметить тот факт, что при анализе литературы, посвященной этому вопросу, крайне важно обращать внимание на особенности моделирования длительного воздействия этанола (продолжительность, концентрация, объем, способ введения этанола).

Результаты работы выявили и то, что не только уровень экспрессии генов *Tlr* подвержен выраженным изменениям при отмене длительного воздействия этанола, но вся система генов toll-подобных рецепторов (гены адаптерных белков, транскрипционных факторов, про- и противовоспалительных цитокинов) изменена в той или иной мере в анализируемых структурах головного мозга у экспериментальных животных. Полученные данные являются новыми как для отечественной, так и для мировой литературы, так как анализ экспрессии серии

генов из системы toll-подобных рецепторов в исследованных структурах головного мозга ранее не выполнялся при отмене длительного воздействия этанола.

Выполненная коррекция изменённых молекулярных механизмов длительным воздействием этанола в таких структурах головного мозга как гиппокамп и прилежащее ядро с помощью потенциальных противонейровоспалительных соединений рифампицина и гинзеноидов позволила получить оригинальные результаты. Использование данных соединений в экскременте позволило скорректировать ряд молекулярных механизмов в гиппокампе и прилежащем ядре головного мозга крыс, которые были изменены длительным воздействием этанола с последующей его отменой. Выбранные соединения в работе зарекомендовали себя, по данным литературы, как потенциальные нейропротекторы, которые способны устранять признаки нейровоспалительного ответа при различных патологических состояниях центральной нервной системы, а также модулировать уровень экспрессии исследуемых генов и их продуктов трансляции. Выбранные структуры головного мозга для анализа экспрессии генов являются наиболее подверженными различным изменениям при длительном воздействии этанола. Существуют предположения, что изменения в данных структурах могут быть ключевыми при формировании алкогольной зависимости. Таким образом, полученные сведения о восстановлении ряда изменённых молекулярных механизмов с помощью выбранных фармакологических соединений являются весьма интересными и открывают перспективу новому направлению в этой области исследований для дальнейших работ.

Список сокращений

- TLR (Toll-like receptor) – toll -подобный рецептор
- PRR (pattern recognition receptors) - образ-распознающие рецепторы
- mEC (medial entorhinal cortex) - медиальная энторинальная кора
- mPFC (medial prefrontal cortex) - медиальная префронтальная кора
- STR (Striatum) - стриатум
- HIP (Hippocampus) - гиппокамп
- AMY (amygdala) - амигдала
- MCP1/CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein 1/C-C motif ligand 2) - моноцитарный хемотаксический фактор-1
- NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - ядерный фактор «каппа-би»
- MAPK (mitogen-activated protein kinase) - митоген-активируемая протеинкиназа
- AP-1 (activator protein 1) - фактор, активирующий протеин-1
- IRF3 (Interferon regulatory factor 3) - регуляторный фактор интерферона 3
- IL (Interleukin) - интерлейкин
- IFN (Interferon) - интерферон
- TNF α (Tumor necrosis factor alpha) - фактор некроза опухоли альфа
- TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) - фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей
- NOX2 (NADPH oxidase 2) - NADPH-оксидаза 2
- COX2 (Cyclooxygenase 2) - циклооксигеназа 2
- S100 β (S100 calcium-binding protein B) - белок S100
- iNOS (NOS2, Nitric oxide synthase) - синтаза оксида азота
- TACE/ADAM17 (Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme) - TNF α -конвертирующий фермент
- MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) - белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа
- TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) -

HMGB1 (High-mobility group protein B1) - негистоновый хромосомный белок
HMGB1

NLRP/NALP (Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing) - Nod-подобный рецептор семейства NALP

JNK (c-Jun N-terminal kinases) - JNK-киназа

TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) - киназа, активирующая трансформирующий фактор роста β

TAB (TAK1-Binding Protein) - TAB -TAK1 связывающий белок

LPS (Lipopolysaccharide) - липолисахарид

miR (MicroRNA) - микроРНК

Благодарности

Автор работы выражает признательность за всестороннюю помощь в проведении исследований и анализе полученных результатов своим научным руководителям доц., к.м.н. Айрапетову Марату Игоревичу и д.м.н. Бычкову Евгению Рудольфовичу, а также консультантам проф., д.м.н. Петру Дмитриевичу Шабанову; проф., д.б.н. Андрею Андреевичу Лебедеву; к.б.н. Эдгару Артуровичу Сексте. Благодарность выражается доценту, к.м.н. Кочкину Дмитрию Владимировичу (кафедра физиологии растений МГУ им. М.В. Ломоносова) за оказанную помощь в получении очищенной суммы гинзенозидов из культуры клеток женьшеня японского.

Список литературы

1. Айрапетов, М.И. Влияние алкоголизации матерей на активность грелиновой системы в пренатальный и ранний постнатальный периоды развития у потомства крыс / М.И. Айрапетов, П.П. Хохлов, Е.Р. Бычков, Э.А. Сексте, Н.Д. Якушина, А.А. Лебедев, Н.В. Лавров, П.Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2015. – Т.13, №2. – С.10-13.
2. Айрапетов, М.И. Хроническая алкоголизация приводит к изменению уровня мРНК рецептора орексина первого типа (OX1R) в эмоциогенных структурах мозга крыс / М.И. Айрапетов, Э.А. Сексте, С.О. Ереско, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // *Биомедицинская химия.* – 2018. – Т.64, №5. – С.451-454.
3. Айрапетов, М.И. Употребление алкоголя приводит к активации нейроиммунной системы посредством белка HMGB1 / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Э.А. Сексте, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов // *Наркология.* – 2019. – Т.18, №5. – С.96-102.
4. Айрапетов, М.И. Роль toll-подобных рецепторов в нейроиммунологии алкоголизма / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, А.А. Лебедев, Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов // *Биомедицинская химия.* – 2020а. – Т. 66, №3. – С. 208-215.
5. Айрапетов, М.И. Уровень экспрессии toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // *Медицинская иммунология.* – 2020б. – Т. 22, №1. – С. 77-86.
6. Айрапетов, М.И. Экспрессия гена *Hmgb1* изменяется в стриатуме и амигдале мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // *Биомедицинская химия.* 2021. – Т. 67, №1. – С. 95-99.
7. Айрапетов, М.И. Гинзенозиды влияют на систему toll-подобных рецепторов в структурах головного мозга крыс в условиях отмены длительной алкоголизации / М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, Д.В. Кочкин, Е.Р. Бычков, А.А. Лебедев, П.Д. Шабанов // *Биомедицинская химия.* – 2022. – Т. 68, № 6. – С. 459-469.

8. Алексеева, О.С. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции / О. С. Алексеева, О. В. Кирик, Е. Г. Гилерович, Д. Э. Коржевский // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 231-241.
9. Буров Ю.В., Ведерникова Н.Н. (1985) Нейрохимия и фармакология алкоголизма, Медицина, М. 240 с.
10. Ветлугина, Т.П. Биологические основы адьювантной терапии алкоголизма / Т.П. Ветлугина, В.Д. Прокопьева, Н.А. Бохан. — Томск: Издательство Томского государственного университета, 2023. — 208 с.
11. Газатова, Н.Д. Алкоголь и иммунитет / Н.Д. Газатова, К.А. Юрова, Д.В. Гаврилов, Л.С. Литвинова // Гены и Клетки. – 2018. – Т. 13, № 1. – С. 47-55.
12. Дробленков, А.В. Изменения нейроглиальных комплексов мезокортиколимбической дофаминергической системы мозга при длительной алкоголизации и после ее отмены у крыс. / Дробленков А.В., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. // Наркология. – 2008. – Т. 7, № 8. – С. 55-58.
13. Дробленков, А.В. Нейроглиальное взаимодействие в дофаминергических структурах мозга лиц, умерших от алкогольной интоксикации. / Дробленков А.В., Шабанов П.Д. // Наркология. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 43-50
14. Ерышев О.Ф., Рыбакова Т.Г., Шабанов П.Д. (2002) Алкогольная зависимость: формирование, течение, противорецидивная терапия, Элби-СПб, СПб, 192 с.
15. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - СПб. : Фолиант, 2008. - 552 с.
16. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. Санкт-Петербург: Наука, 2006. 264 с.
17. Лебедев К.А., Понякина И.Д. (2017) Иммунология образраспознающих рецепторов, Ленанд, М., 256 с.
18. Лелевич, В.В. Метаболические механизмы алкогольной абстиненции (экспериментальные аспекты) / В.В. Лелевич, А.Г. Веницкая, С.В. Лелевич // Наркология. – 2017. – Т. 16, № 11(191). – С. 92-106.

19. Ноздрачев, А.Д. Организация подкрепляющих систем мозга. / Ноздрачев А.Д., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2000. – № 4. – С. 62-76.
20. Перегуд, Д.И. Уровень BDNF, miR-30a-5p и miR-122 в сыворотке крови в динамике синдрома отмены алкоголя / Д.И. Перегуд, А.И. Корольков, В.Ю. Баронец, А.С. Лобачева, М.Л. Аркус, С.А. Игумнов, С.В. Пирожков, Н.Н. Теребилина // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68, №3. – С. 218-227.
21. Трухечёва Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – 384 с.
22. Цыган, В.Н. Иммунные дисфункции у наркозависимых и способы их коррекции. / Цыган В.Н., Акперов Э.К., Востриков В.В., Шабанов П.Д. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2007. – Т. 5, № 4. – С. 2-81.
23. Шабанов П.Д. Калишевич С.Ю. (1998) Биология алкоголизма, Лань, СПб, 272с.
24. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. (2008). Гормональные механизмы подкрепления, Элби-СПб, СПб, 272 с.
25. Шабанов, П.Д. Участие прилежащего ядра в механизмах условного подкрепления у крыс / П.Д. Шабанов, А.А. Лебедев, М.В. Шевелева, Е.Г. Шумилов, Р.О. Роик // Наркология. – 2014. – Т. 13, №7. – С. 52-59.
26. Шабанов П.Д. Основы наркологии. Серия: Мир медицины. - СПб.: Лань, 2002 г. - 560 страниц.
27. Шабанов, П. Д. Наркология: руководство для врачей / Шабанов П. Д. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 832 с.
28. Шабанов, П.Д. Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрохимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов. / Шабанов П.Д., Лебедев А.А. // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Vol. 1, № 1. – С. 13-26.

29. Шабанов, П.Д. Структурно-функциональная организация системы расширенной миндалины и ее роль в подкреплении. / Шабанов П.Д., Лебедев А.А. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 2-16.
30. Шевелева, М.В. Нейробиологические механизмы систем награды и наказания в головном мозге при активации прилежащего ядра / М.В. Шевелева, А.А. Лебедев, Р.О. Роик, П.Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – 2013. – Т. 11, №3. – С. 3-19.
31. Airapetov, M. The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism / M. Airapetov, S. Eresko, A. Lebedev, E. Bychkov, P. Shabanov // *Biosci Trends.* – 2021. – Vol. 15, №2. – P. 74-82.
32. Airapetov, M.I. HMGB1 gene expression changes in the striatum and amigdal of the rat's brain under alcoholization and ethanol withdrawal / M.I. Airapetov, S.O. Eresko, E.R. Bychkov, A.A. Lebedev, P.D. Shabanov // *Biomeditsinskaya khimiya.* – 2021. – Vol. 67, №1. – P. 95-99.
33. Airapetov, M. Effect of rifampicin on TLR4-signaling pathways in the nucleus accumbens of the rat brain during abstinence of long-term alcohol treatment / M. Airapetov, S. Eresko, P. Ignatova, A. Lebedev, E. Bychkov, P. Shabanov // *Alcohol Alcohol.* – 2024. – Vol. 59, №3. P. agae016.
34. Akira, S. Toll-like receptor signalling / S. Akira, K. Takeda // *Nat Rev Immunol.* – 2004. – Vol. 4, №7. – P. 499-511.
35. Alfonso-Loeches, S. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain / S. Alfonso-Loeches, C. Guerri // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 2011. – Vol. 48, №1. – P. 19-47.
36. Alfonso-Loeches, S. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage / S. Alfonso-Loeches, M. Pascual-Lucas, A.M. Blanco, I. Sanchez-Vera, C. Guerri // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30, №24. – P. 8285-8295.
37. Ali, A.E. Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and

apoptotic machineries / A.E. Ali, H.M. Mahdy, D.M. Elsherbiny, S.S. Azab // *Biochem Pharmacol.* – 2018. – Vol. 156. – P. 431-443.

38. An, H. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production / H. An, W. Zhao, J. Hou, Y. Zhang, Y. Xie, Y. Zheng, H. Xu, C. Qian, J. Zhou, Y. Yu, S. Liu, G. Feng, X. Cao // *Immunity.* – 2006. – Vol. 25, №6. – P. 919-928.

39. Aurelian, L. GABAAR α 2-activated neuroimmune signal controls binge drinking and impulsivity through regulation of the CCL2/CX3CL1 balance / L. Aurelian, I. Balan // *Psychopharmacology (Berl).* – 2019. Vol. 236, №10. – P. 3023-3043.

40. Balan, I. Innately activated TLR4 signal in the nucleus accumbens is sustained by CRF amplification loop and regulates impulsivity / I. Balan, K.T. Warnock, A. Puche, M.C. Gondre-Lewis, L. Aurelian // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2018. – Vol. 69. – P. 139–153.

41. Bayassi-Jakowicka, M. More than Addiction - The Nucleus Accumbens Contribution to Development of Mental Disorders and Neurodegenerative Diseases / M. Bayassi-Jakowicka, G. Lietzau, E. Czuba, C. Patrone, P. Kowianski // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, №5. P. 2618.

42. Bayraktar, R. The Interaction Between Two Worlds: MicroRNAs and Toll-Like Receptors / R. Bayraktar, M.T.S. Bertilaccio, G.A. Calin // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1053.

43. Beamer, C.A. Inhibition of TLR ligand- and interferon gamma-induced murine microglial activation by *Panax notoginseng* / C.A. Beamer, D.M. Shepherd // *J Neuroimmune Pharmacol.* – 2012. – Vol. 7, №2. – P. 465-476.

44. Becker, H.C. Neurochemical mechanisms of alcohol withdrawal / H.C. Becker, P.J. Mulholland // *Handb Clin Neurol.* – 2014. – Vol. 125. – P. 133-156.

45. Bi, W. Rifampicin ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive and motor impairments via inhibition of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in mice / W. Bi, X. Cheng, Z. Zeng, R. Zhou, R. Luo, J. Zhang, L. Zhu // *Neurol. Res.* – 2021. – Vol. 43, №5. P. 358-371.

46. Bi, W. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway / W. Bi, L. Zhu, X. Jing, Z. Zeng // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 10, №4. – P. 1793-1799.
47. Blednov, Y.A. Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice / Y.A. Blednov, J.M. Benavidez, C. Geil, S. Perra, H. Morikawa, R.A. Harris // *Brain Behav Immun.* – 2011. – Vol. 25, Suppl 1. – P. 92-105.
48. Blednov, Y.A. Sedative and Motor Incoordination Effects of Ethanol in Mice Lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88 / Y.A. Blednov, M. Black, J.M. Benavidez, A. Da Costa, J. Mayfield, R.A. Harris // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2017. – Vol. 41, №3. – P. 531-540.
49. Breese, G.R. Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior / G.R. Breese, D.J. Knapp, D.H. Overstreet, M. Navarro, T.A. Wills, R.A. Angel // *Neuropsychopharmacology.* – 2008. – Vol. 33, №4. – P. 867-876.
50. Cai, H.A. Ginsenoside (Rg-1) promoted the wound closure of diabetic foot ulcer through iNOS elevation via miR-23a/IRF-1 axis / H.A. Cai, L. Huang, L.J. Zheng, K. Fu, J. Wang, F.D. Hu, R.Y. Liao // *Life Sci.* – 2019. – 233. – P. 116525.
51. Cai, L. Ginsenoside Rg2 Ameliorates Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage in a Rat Model of Preeclampsia / L. Cai, F. Hu, W. Fu, X. Yu, W. Zhong, F. Liu, T. Wang, D. Sui // *Reprod Sci.* – 2021. – Vol. 28, №12. – P. 3431-3439.
52. Cao, Y. High-dose rifampicin for the treatment of tuberculous meningitis: a meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Cao, T. Wang, K. He, J. Xue, X. Wang, J. Liang // *J. Clin. Pharm. Ther.* – 2022. – Vol. 47, №4. – P. 445-454.
53. Choi, Y.J. Stimulation of DDX3 expression by ginsenoside Rg3 through the Akt/p53 pathway activates the innate immune response via TBK1/IKK ϵ /IRF3 signalling / Y.J. Choi, L.J. Kang, S.G. Lee // *Curr Med Chem.* – 2014. – Vol. 21, №8. – P. 1050-1060.

54. Coleman, L.G. HMGB1/IL-1 β complexes regulate neuroimmune responses in alcoholism / L.G. Coleman, J. Zou, L. Qin, F.T. Crews // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2018. – Vol. 72. – P. 61–77.
55. Coleman, L.G. Innate Immune Signaling and Alcohol Use Disorders / L.G. Coleman, F.T. Crews // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 248. – P. 369-396.
56. Coleman, L.G. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling / L.G. Coleman, J. Jr Zou, F.T. Crews // *Journal of neuroinflammation*. – 2020. – Vol. 17, №1. – P. 27.
57. Coleman, L.G. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7 / L.G. Coleman, J. Zou, F.T. Crews // *Journal of Neuroinflammation*. – 2017. – Vol. 14, №1. P. 1-15.
58. Coleman, L.G.J. The persistent impact of adolescent binge alcohol on adult brain structural, cellular, and behavioral pathology: A role for the neuroimmune system and epigenetics / L.G.J. Coleman, F.T. Crews, R.P. Vetreno // *Int Rev Neurobiol*. – 2021. – Vol. 60. – P. 1-44.
59. Crews, F.T. Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats / F.T. Crews, C.J. Braun, B. Hoplight, R.C. Switzer, D.J. Knapp // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2000. – Vol. 24, №11. – P. 1712-1723.
60. Crews, F.T. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction / F.T. Crews, J. Zou, L. Qin // *Brain Behav Immun*. – 2011. – Vol. 25, Suppl 1. – P. 4-12.
61. Crews, F.T. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence / F.T. Crews, L. D. Qin, Sheedy, R.P. Vetreno, J. Zou // *Biol Psychiatry*. – 2013. – Vol. 73, №7. – P. 602-612.
62. Crews, F.T. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage / F.T. Crews, R.P. Vetreno // *Int Rev Neurobiol*. – 2014. – Vol. 118. – P. 315–357.
63. Crews, F.T. Mechanisms of neuroimmune gene induction I alcoholism / F.T. Crews, R.P. Vetreno // *Psychopharmacology*. – 2016. – Vol. 233. – P. 1543–1557.

64. Crews, F.T. Toll-like receptor signaling and stages of addiction / F.T. Crews, T.J. Walter, L.G.J. Coleman, R.P. Vetreno // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2017. – 234, №9-10. – P. 1483-1498.
65. Cui, L. Microbial conversion of major ginsenosides in ginseng total saponins by endophytes / L. Cui, S.Q. Wu, C.A. Zhao, C.R. Yin // *J. Ginseng Res.* – 2016. – Vol. 40, №4. – P. 366-374.
66. Dahchour, A. Changes in Brain Dopamine Extracellular Concentration after Ethanol Administration; Rat Microdialysis Studies / A. Dahchour, R.J. Ward // *Alcohol Alcohol.* – 2022. – Vol. 57, №2. – P. 165-175.
67. Ebenezer, G.J. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy / G.J. Ebenezer, D.M. Scollard // *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* – 2021. – 18(4). – P. 2337–2350.
68. Edith, V.S. Striatal and forebrain nuclei volumes: Contribution to motor function and working memory deficits in alcoholism / V.S. Edith, D. Anjali, R. Eve, J.R. Margaret, P. Adolf // *Biol Psychiatry.* – 2005. – Vol. 57, №7. – P. 768–776.
69. Esen, N. Toll-like receptors in brain abscess / N. Esen, T. Kielian // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2009. – Vol. 336. – P. 41-61.
70. Fan, S. Panax ginseng clinical trials: Current status and future perspectives / S. Fan, Z. Zhang, H. Su, P. Xu, H. Qi, D. Zhao, X. Li // *Biomed Pharmacother.* – 2020. – Vol. 132. – P. 110832.
71. Femenia, T. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation / T. Femenia, Y. Qian, T. Arentsen, H. Forssberg, R. Diaz Heijtz // *Brain Behav Immun.* – 2018. – Vol. 69. – P. 273-282.
72. Fernandez-Lizarbe, S. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol / S. Fernandez-Lizarbe, M. Pascual, C. Guerri // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183, №7. – P. 4733-4744.
73. Figueroa-Hall, L.K. Toll-Like Receptor Signaling in Depression. / L.K. Figueroa-Hall, M.P. Paulus, J. Savitz // *Psychoneuroendocrinology.* – 2020. – Vol. 121. – P. 1-35.
74. Fitzgerald, K.A. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF / K.A. Fitzgerald, D.C. Rowe, B.J. Barnes, D.R. Caffrey, A.

- Visintin, E. Latz, B. Monks, P.M. Pitha, D.T. Golenbock // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 198, №7. – P. 1043-1055.
75. Francis, T.C. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression / T.C. Francis, M.K. Lobo // *Biol. Psychiatry.* – 2017. – Vol. 81, №8. – P. 645-653.
76. Gano, A. TLR3 activation with poly I:C exacerbates escalated alcohol consumption in dependent male C57BL/6J mice / A. Gano, C.L. Lebonville, H.C. Becker // *Am J Drug Alcohol Abuse.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1-12.
77. García Bueno, B., Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases / B. García Bueno, J.R. Caso, J.L. Madrigal, J.C. Leza // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2016. – Vol. 64. – P. 134-147.
78. Gong, L. Neuroprotective Mechanisms of Ginsenoside Rb1 in Central Nervous System Diseases / L. Gong, J. Yin, Y. Zhang, R. Huang, Y. Lou, H. Jiang, L. Sun, J. Jia, X. Zeng // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 914352.
79. González-Burgos, E. Potential neuroprotective activity of Ginseng in Parkinson's disease: a review / E. González-Burgos, C. Fernandez-Moriano, M.P. Gómez-Serranillos // *J Neuroimmune Pharmacol.* – 2015. – Vol. 10, №1. – P. 14-29.
80. Goodwin, G.H. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids / G.H. Goodwin, C. Sanders, E.W. Johns // *Eur J Biochem.* – 1973. – Vol. 38, №1. – P. 14-19.
81. Graeber, M.B. Role of microglia in CNS inflammation / M.B. Graeber, W. Li, M.L. Rodriguez // *FEBS Lett.* – 2011. – Vol. 585, №23. – P. 3798-3805.
82. Griffin, W.C. Alcohol Dependence and the Ventral Hippocampal Influence on Alcohol Drinking in Male Mice / W.C. Griffin, M.F. Lopez, J.J. Woodward, H.C. Becker // *Alcohol.* – 2022. – Vol. 8329, №22. – P. 00113-6.
83. Guerri, C. Impact of neuroimmune activation induced by alcohol or drug abuse on adolescent brain development / C. Guerri, M. Pascual // *Int J Dev Neurosci.* – 2019. – Vol. 77. – P. 89-98.

84. Hanke, M.L. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential / M.L. Hanke, T. Kielian // *Clin Sci (Lond)*. – 2011. – Vol. 121, №9. – P. 367-387.
85. Harris, R.A. Genetic and Pharmacologic Manipulation of TLR4 Has Minimal Impact on Ethanol Consumption in Rodents / R.A. Harris, M. Bajo, R.L. Bell, Y.A. Blednov // *J. Neurosci*. – 2017. – Vol. 37, №5. – P. 1139-1155.
86. Harris, R.A. Genetic and Pharmacologic Manipulation of TLR4 Has Minimal Impact on Ethanol Consumption in Rodents / R.A. Harris, M. Bajo, R.L. Bell, Y.A. Blednov, F.P. Varodayan, J.M. Truitt, G. Guglielmo, A.W. Lasek, M.L. Logrip, L.F. Vendruscolo, A.J. Roberts, E. Roberts, O. George, J. Mayfield, T.R. Billiar, D.J. Hackam, R.D. Mayfield, G.F. Koob, M. Roberto, G.E. Homanics // *J Neurosci*. – 2017. – Vol. 37, №5. – P. 1139-1155.
87. He, J. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain / J. He, F.T. Crews // *Exp Neurol*. – 2008. – Vol. 210, №2. – P. 349-358.
88. He, Y. A review of ginseng clinical trials registered in the WHO international clinical trials registry platform / Y. He, J. Yang, Y. Lv, J. Chen, F. Yin, J. Huang, Q. Zheng // *Biomed Res. Int*. – 2018. – P. e1843142.
89. Hutchinson, M.R. Why is neuroimmunopharmacology crucial for the future of addiction research? / M.R. Hutchinson, L.R. Watkins // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 76. – P. 218-227.
90. Jang, T.H. In Vitro Reconstitution of the Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) Domain Complex Between TLR5/6 and Myd88 / T.H. Jang, K.B. Narayanan, H.H. Park // *Protein Pept Lett*. – 2016. – Vol. 23, №1. – P. 55-62.
91. June, H.L. CRF-amplified neuronal TLR4/MCP-1 signaling regulates alcohol self-administration / H.L. June, J. Liu, K.T. Warnock, K.A. Bell, I. Balan, D. Bollino, A. Puche, L. Aurelian // *Neuropsychopharmacology*. – 2015. – 40, №6. – P. 1549-1559.
92. Kashima, D.T. Toll-like receptor 4 deficiency alters nucleus accumbens synaptic physiology and drug reward behavior / D.T. Kashima, B.A. Grueter // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2017. – Vol. 114, №33. – P. 8865-8870.

93. Kenneth Murphy, Casey Weaver (2017) *Janeway's Immunobiology* (Ninth Edition), Garland Science (Taylor & Francis Group), New York, 927 p.
94. Kim, G.O. Inhibitory Activities of Rare Ginsenoside Rg4 on Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis / G.O. Kim, N. Kim, G.Y. Song, J.S. Bae // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, №18. – P. 10836.
95. Kim, T.W. Ginsenoside Rg5 ameliorates lung inflammation in mice by inhibiting the binding of LPS to toll-like receptor-4 on macrophages / T.W. Kim, E.H. Joh, B. Kim, D.H. Kim // *Int Immunopharmacol.* – 2012. – Vol. 12, №1. – P. 110-116.
96. Koob, G.F. Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models / G.F. Koob // *Handb. Clin. Neurol.* – 2014. – Vol. 125. – P. 33-54.
97. Lawrimore, C.J. Ethanol induces interferon expression in neurons via TRAIL: role of astrocyte-to-neuron signaling / C.J. Lawrimore, L.G. Coleman, F.T. Crews // *Psychopharmacology (Berl).* – 2019. – Vol. 236, №10. – P. 2881-2897.
98. Lawrimore, C.J. Ethanol, TLR3, and TLR4 Agonists Have Unique Innate Immune Responses in Neuron-Like SH-SY5Y and Microglia-Like BV2 / C.J. Lawrimore, F.T. Crews // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2017. – Vol. 41, №5. – P. 939-954.
99. Lee, M.S. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk / M.S. Lee, Y.J. Kim // *Annu Rev Biochem.* – 2007. – Vol. 76. – P. 447-480.
100. Lehmann, S.M. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration / S.M. Lehmann, C. Krüger, B. Park, K. Derkow, K. Rosenberger, J. Baumgart, T. Trimbuch, G. Eom, M. Hinz, D. Kaul, P. Habel, R. Kälin, E. Franzoni, A. Rybak, D. Nguyen, R. Veh, O. Ninnemann, O. Peters, R. Nitsch, F.L. Heppner, D. Golenbock, E. Schott, H.L. Ploegh, F.G. Wulczyn, S. Lehnardt // *Nat Neurosci.* – 2012. – Vol. 15, №6. – P. 827-835.
101. Leifer, C.A. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling / C.A. Leifer, A.E. Medvedev // *J Leukoc Biol.* – 2016. – Vol. 100, №5. – P. 927-941.
102. Lewohl, J.M. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex / J.M. Lewohl, L. Wang, M.F. Miles, L. Zhang, P.R. Dodd, R.A. Harris // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2000. – Vol. 24, №12. – P. 1873-1882.

103. Li, J. Neuroprotective Potentials of Panax Ginseng Against Alzheimer's Disease: A Review of Preclinical and Clinical Evidences / J. Li, Q. Huang, J. Chen, H. Qi, J. Liu, Z. Chen, D. Zhao, Z. Wang, X. Li // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 688490.
104. Li, Y. Ginsenoside Rb3 attenuates skin flap ischemia-reperfusion damage by inhibiting STING-IRF3 signaling / Y. Li, H. Liu, Z. Zeng, H. Lin, X. Chen, X. Yuan, J. Qiu, F. Fu, Z. Chen, J. Kuang // *J Mol Histol.* – 2022. – Vol. 53, №4. – P. 763-772.
105. Lim, Y. Exploration of alcohol use disorder-associated brain miRNA-mRNA regulatory networks / Y. Lim, J.E. Beane-Ebel, Y. Tanaka // *Transl Psychiatry.* – 2021. – Vol. 11, №1. – P. 504.
106. Lippai, D. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation / D. Lippai, S. Bala, J. Petrasek, T. Csak, I. Levin, E.A. Kurt-Jones, G. Szabo // *J Leukoc Biol.* – 2013. – Vol. 94, №1. – P. 171-182.
107. Lippai, D. Chronic Alcohol-Induced microRNA-155 Contributes to Neuroinflammation in a TLR4-Dependent Manner in Mice / D. Lippai, S. Bala, T. Csak, E.A. Kurt-Jones, G. Szabo // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8, №8. P. e70945.
108. Liu, J. Binge alcohol drinking is associated with GABAA alpha2-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala / J. Liu, A.R. Yang, T. Kelly, A. Puche // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2011. – Vol. 108, №11. – P. 4465–4470.
109. Mahady, G.B. Ginsengs: A Review of Safety and Efficacy / G.B. Mahady, C. Gyllenhaal, H.H.S. Fong, N.R. Farnsworth // *Nutrition in Clinical Care.* – 2000. – Vol. 3. – P. 90-101.
110. Melbourne, J.K. Its complicated: The relationship between alcohol and microglia in the search for novel pharmacotherapeutic targets for alcohol use disorders / J.K. Melbourne, K.R. Thompson, H. Peng, K. Nixon // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2019. – Vol. 167. – P. 179-221.
111. McCarthy, G.M. Chronic ethanol consumption: role of TLR3/TRIF-dependent signaling / G.M. McCarthy, A.S. Warden, C.R. Bridges, Y.A. Blednov, R.A. Harris // *Addiction Biology.* – 2017. – Vol. 23, №3. – P. 889–903.

112. McClintick, J.N. Stress-response pathways are altered in the hippocampus of chronic alcoholics. / J.N. McClintick, X. Xuei, J.A. Tischfield, A. Goate, T. Foroud, L. Wetherill, M.A. Ehringer, H.J. Edenberg // *Alcohol*. – 2013. – Vol. 47, №7. – P. 505-515.
113. Montesinos, J. Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System / J. Montesinos, S. Alfonso-Loeches, C. Guerri // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2016. – Vol. 40, №11. – P. 2260-2270.
114. Montesinos, J. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment / J. Montesinos, M. Pascual, A. Pla, C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, J. Miñarro, C. Guerri // *Brain Behav Immun*. – 2015. – Vol. 45. – P. 233-344.
115. Montesinos, J. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment / J. Montesinos, M. Pascual, A. Pla, C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, J. Miñarro, C. Guerri // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2015. – Vol. 45. – P. 233–244.
116. Murashige, T. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F.A. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497
117. Napolitani, G. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells / G. Napolitani, A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, A. Lanzavecchia // *Nat Immunol*. – 2005. – Vol. 6, №8. – P. 769-776.
118. Nestler, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? / E.J. Nestler // *Nature Neuroscience*. – 2005. – Vol. 8, №11. – P. 1445–1449.
119. Nguyen, N.H. Pharmacological effects of ginseng on infectious diseases. / N.H. Nguyen, C.T. Nguyen // *Inflammopharmacology*. – 2019. – Vol. 27, №5. – P. 871-883.
120. Nie, L. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals / L. Nie, S.Y. Cai, J.Z. Shao, J. Chen // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1523.
121. Nilsen, N. Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88 / N. Nilsen, U. Nonstad, N.

- Khan, C.F. Knetter, S. Akira, A. Sundan, T. Espevik, E. Lien // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279, №38. – P. 39727-39735.
122. Nosov, A.M. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactorsю / A.M. Nosov, E.V. Popova, D.V. Kochkin // *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology.* Springer Netherlands. – 2014. – P. 563–623.
123. Okun, E. Toll-like receptors in neurodegeneration / E. Okun, K.J. Griffioen, J.D. Lathia, S.C. Tang, M.P. Mattson, T.V. Arumugam // *Brain Res Rev.* – 2009. – Vol. 59, №2. – P. 278-92.
124. Oord, E.J.C.G. A single-nucleus transcriptomics study of alcohol use disorder in the nucleus accumbens / E.J.C.G. Oord, L.Y. Xie, M. Zhao, K.A. Aberg, S.L. Clark // *Addict Biol.* – 2023. – Vol. 28, №1. – P. e13250.
125. Pannacci, M. 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 / M. Pannacci, V. Lucini, F. Colleoni, C. Martucci, S. Grosso, P. Sacerdote, F. Scaglione // *Brain Behav Immun.* – 2006. – Vol. 20, №6. – P. 546-551.
126. Pascual, M. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage / M. Pascual, P. Baliño, S. Alfonso-Loeches, C.M. Aragón, C. Guerri // *Brain Behav Immun.* – 2011. – Vol. 25, Suppl 1. – P. 80-91.
127. Pascual, M. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2 / M. Pascual, P. Baliño, C.M. Aragón, C. Guerri // *Neuropharmacology.* – 2015. – Vol. 89. – P. 352-359.
128. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact.* Sydney: Academic Press, 2017, 388 p.
129. Pla, A. TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain / A. Pla, M. Pascual, J. Renau-Piqueras, C. Guerri // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5, №2. – P. e1066.

130. Qin, L. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration / L. Qin, F.T. Crews // *J Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 18, №9. – P. 130.
131. Qin, L. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment / L. Qin, J. He, R.N. Hanes, O. Pluzarev, J.S. Hong, F.T. Crews // *J Neuroinflammation*. – 2008. – Vol. 18, №5. – P. 10.
132. Qin, L. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration / L. Qin, Y. Liu, J.S. Hong, F.T. Crews // *Glia*. – 2013. – Vol. 61, №6. – P. 855-868.
133. Qin, L. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration / L. Qin, X. Wu, M.L. Block, Y. Liu, G.R. Breese, J.S. Hong, D.J. Knapp, F.T. Crews // *Glia*. – 2007. – Vol. 55, №5. – P. 453-462.
134. Ramos, A. Innate immune activation: Parallels in alcohol use disorder and Alzheimer's disease / A. Ramos, R.S. Joshi, G. Szabo // *Front Mol Neurosci*. – 2022. – Vol. 15. – P. 910298.
135. Randall, P.A. 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 / P.A. Randall, R.P. Vetreno, V.H. Makhijani, F.T. Crews, J. Besheer // *Alcoholism, clinical and experimental research*. – 2019. – Vol. 43, №1. – P. 48–60.
136. Martinotti, S. Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer / S. Martinotti, M. Patrone, E. Ranzato // *Immunotargets Ther*. – 2015. – Vol. 4. – P. 101-109.
137. McMahan, R.H. A novel murine model of multi-day moderate ethanol exposure reveals increased intestinal dysfunction and liver inflammation with age / R.H. McMahan, K.M. Najarro, J.E. Mullen, M.T. Paul, D.J. Orlicky, H.J. Hulsebus, E.J. Kovacs // *Immun Ageing*. 2021. – Vol. 18. – №1. – P. 37.
138. Rhule, A. Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by Panax notoginseng / A. Rhule, B. Rase, J.R. Smith, D.M. Shepherd // *J Ethnopharmacol*. – 2008. – Vol. 116, №1. – P. 179-186.

139. Sanchez-Alavez, M. Time course of microglia activation and brain and blood cytokine/chemokine levels following chronic ethanol exposure and protracted withdrawal in rats / M. Sanchez-Alavez, W. Nguyen, S. Mori, D.N. Wills, D. Otero, C.L. Ehlers, B. Conti // *Alcohol*. – 2019. – Vol. 76. – P. 37-45.
140. Scheibner, K.A. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2 / K.A. Scheibner, M.A. Lutz, S. Boodoo, M.J. Fenton, J.D. Powell, M.R. Horton // *J Immunol*. – 2006. – Vol. 177, №2. – P. 1272-1281.
141. Shabani, Z. Effects and Potential Mechanisms of Alcohol Use Disorder on the Fate Determination of Newly Born Neurons in the Hippocampus / Z. Shabani, M. Jafarzadeh Gharehziaaddin // *Alcohol Alcohol*. – 2020. – Vol. 55, №6. – P. 598-602.
142. Shabanov, P.D. Serum unacylated ghrelin concentrations and expression of GHSR mRNA in the rat brain structures after chronic alcoholization and ethanol withdrawal / P.D. Shabanov, M.I. Airapetov, E.A. Sekste, P.P. Khokhlov, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov, P.M. Vinogradov, R.O. Roik, V.P. Pavlenko // *European Neuropsychopharmacology*. – 2014. – Vol. 24, S2. – P. 653.
143. Shi, R. Poly(T) adaptor RT-PCR / R. Shi, Y.H. Sun, X.H. Zhang, V.L. Chiang // *Methods Mol Biol*. – 2012. – Vol. 822. – P. 53-66.
144. Shirayama, Y. 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 / Y. Shirayama, M. Iwata, Y. Fujita, Y. Oda, K. Hashimoto // *Behav Brain Res*. – 2022. – Vol. 423. – P. 113769.
145. Singh-Jasuja, H. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system / H. Singh-Jasuja, N. Hilf, D. Arnold-Schild, H. Schild // *Biol Chem*. – 2001. – Vol. 382, №4. – P. 629-636.
146. Smith, K.M. Oral tolerance / K.M. Smith, A.D. Eaton, L.M. Finlayson, P. Garside // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2000. – Vol. 162, №4. – P. 175-178.
147. Smolenskaya, I.N. Ginsenoside production, growth and cytogenetic characteristics of sustained *Panax japonicus* var. *repens* cell suspension culture / Smolenskaya I.N., O.V. Reshetnyak, A.V. Nosov, S.E. Zorinants, A.L. Chaiko, Y.N. Smirnova, A.M. Nosov // *Biologia Plantarum*. – 2007. – Vol. 51. – P. 235-241

148. Sobstyl, M. Nucleus accumbens as a stereotactic target for the treatment of addictions in humans: a literature review / M. Sobstyl, A. Kupryjaniuk, P. Mierzejewski // *Neurol. Neurochir. Pol.* – 2021. – Vol. 55(5). – P. 440-449.
149. Sun, Y. New Therapeutic Approaches to and Mechanisms of Ginsenoside Rg1 against Neurological Diseases / Y. Sun, Y. Yang, S. Liu, S. Yang, C. Chen, M. Lin, Q. Zeng, J. Long, J. Yao, F. Yi, L. Meng, Q. Ai, N. Chen // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, №16. – P. 2529.
150. Takagi, M. Danger of frustrated sensors: Role of Toll-like receptors and NOD-like receptors in aseptic and septic inflammations around total hip replacements / M. Takagi, Y. Takakubo, J. Pajarinen, Y. Naganuma, H. Oki, M. Maruyama, S.B. Goodman // *J Orthop Translat.* – 2017. – Vol. 10. – P. 68-85.
151. Tam, D.N.H. Ginsenoside Rh1: a systematic review of its pharmacological properties / D.N.H. Tam, D.H. Truong, T.T.H. Nguyen, L.N. Quynh, L. Tran, H.D. Nguyen, B.E. Shamandy, T.M.H. Le, D.K. Tran, D. Sayed, V.V. Vu, S. Mizukami, K. Hirayama, N.T. Huy // *Planta Med.* – 2018. – Vol. 84, №3. – P. 139-152.
152. Tucke, A.E. Chronic Ethanol Causes Persistent Increases in Alzheimer's Tau Pathology in Female 3xTg-AD Mice: A Potential Role for Lysosomal Impairment / A.E. Tucker, C.D.M. Alicea Pauneto, A.M. Barnett, L.G.J. Coleman // *Front Behav Neurosci.* – 2022. – Vol. 16. – P. 886634.
153. Tripathi, A.S. 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 / A.S. Tripathi, P. Bansod, K.P. Swathi // *J Pharm Pharmacol.* – 2021. – Vol. 73, №12. – P. 1592-1598.
154. Ureña-Peralta, J.R. Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex / J.R. Ureña-Peralta, S. Alfonso-Loeches, C.M. Cuesta-Diaz, F. García-García, C. Guerri // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, №1. – P. 15913.
155. Ureña-Peralta, J.R. Lack of TLR4 modifies the miRNAs profile and attenuates inflammatory signaling pathways / J.R. Ureña-Peralta, R. Pérez-Moraga, F. García-García, C. Guerri // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, №8. – P. e0237066.

156. Vabulas, R.M. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors / Vabulas RM, Wagner H, Schild H. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2002. – Vol. 270. – P. 169-184.
157. Vallés, S.L. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes / S.L. Vallés, A.M. Blanco, M. Pascual, C. Guerri // *Brain Pathol.* – 2004. – Vol. 14, №4. – P. 365-371.
158. Vetreno, R.P. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and Toll-like receptors in the adult prefrontal cortex / R.P. Vetreno, F.T. Crews // *Neuroscience.* – 2012. – Vol. 226. – P. 475-88.
159. Vetreno, R.P. Current hypotheses on the mechanisms of alcoholism / R.P. Vetreno, F.T. Crews // *Handb Clin Neurol.* – 2014. – Vol. 125. – P. 477-497.
160. Walter, T.J. Alcohol and Stress Activation of Microglia and Neurons: Brain Regional Effects / T.J. Walter, R.P. Vetreno, F.T. Crews // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2017. – Vol. 41, №12. – P. 2066-2081.
161. Wang, J. The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9 / J. Wang, Y. Shao, T.A. Bennett, R.A. Shankar, P.D. Wightman, L.G. Reddy // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281, №49. – P. 37427-37434.
162. Wang, X. Neuroprotective Effect of Xueshuantong for Injection (Lyophilized) in Transient and Permanent Rat Cerebral Ischemia Model / X. Wang, S. Wang, J. Wang, H. Guo, Z. Dong, L. Chai, L. Hu, Y. Zhang, H. Wang, L. Chen // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2015. – P. e134685.
163. Wang, X. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain / X. Wang, P.M. Grace, M.N. Pham, K. Cheng, K.A. Strand, C. Smith, J. Li, L.R. Watkins, H. Yin // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27, №7. – P. 2713-2722.
164. Warden, A.S. Toll-like receptor 3 dynamics in female C57BL/6J mice: Regulation of alcohol intake. / A.S. Warden, M. Azzam, A. DaCosta, S. Mason, Y.A. Blednov, R.O. Messing, R.D. Mayfield, R.A. Haris // *Brain, behavior, and immunity.* – 2019. – Vol. 77. – P. 66–76.
165. Whitman, B.A. The cytokine mRNA increase induced by withdrawal from chronic ethanol in the sterile environment of brain is mediated by CRF and HMGB1 release /

B.A. Whitman, D.J. Knapp, D.F. Werner, F.T. Crews, G.R. Breese // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2013. – Vol. 37, №12. – P. 2086-2097.

166. Xia, T. Hepatoprotective Mechanism of Ginsenoside Rg1 against Alcoholic Liver Damage Based on Gut Microbiota and Network Pharmacology / T. Xia, B. Fang, C. Kang, Y. Zhao, X. Qiang, X. Zhang, Y. Wang, T. Zhong, J. Xiao, M. Wang // *Oxid Med Cell Longev.* – 2022. – 5025237.

167. Xu, X. Ginsenoside Rh2 attenuates microglial activation against toxoplasmic encephalitis via TLR4/NF- κ B signaling pathway / X. Xu, L. Jin, T. Jiang, Y. Lu, F. Aosai, H.N. Piao, G.H. Xu, C.H. Jin, X.J. Jin, J. Ma, L.X. Piao // *J Ginseng Res.* – 2020. – Vol. 44, №5. – P. 704-716.

168. Xu, X. Ginsenoside Rh2 reduces depression in offspring of mice with maternal toxoplasma infection during pregnancy by inhibiting microglial activation via the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway / X. Xu, Y.N. Lu, J.H. Cheng, H.W. Lan, J.M. Lu, G.N. Jin, G.H. Xu, C.H. Jin, J. Ma, H.N. Piao, X. Jin, L.X. Piao // *J Ginseng Res.* – 2022. – Vol. 46, №1. – P. 62-70.

169. Yamamoto, M. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. / M. Yamamoto, S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169, №12. – P. 6668-6672.

170. Zahednasab, H. The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. / H. Zahednasab, M. Firouzi, S. Kaboudanian-Ardestani, Z. Mojallal-Tabatabaei, S. Karampour, H. Keyvani // *Cytokine.* – 2019. – Vol. 113. – P. 417-426.

171. Zhao, B.S. 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. / B.S. Zhao, Y. Liu, X.Y. Gao, H.Q. Zhai, J.Y. Guo, X.Y. Wang // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19, №10. – P. 16925-16936.

172. Zheng, Z. Clinical Observation of Salvianolic Acid Combined with Panax Notoginseng Saponins Combined with Basic Nursing Intervention on Cerebral Ischemia-

- Reperfusion Injury in Rats. / Z. Zheng, S. Liang, S. Sun, P. Liu, L. Yu // *J Healthc Eng.* – 2022. – Vol. 30. – P. 8706730.
173. Zhou, P. Ginsenoside Rb1 and mitochondria: A short review of the literature. / P. Zhou, W. Xie, Y. Sun, Z. Dai, G. Li, G. Sun, X. Sun // *Molecular and Cellular Probes.* – 2019. – Vol. 43. – P. 1-5.
174. Zou J, Crews FT. Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis. / J. Zou, F.T. Crews // *Front Neurosci.* – 2012. – Vol. 30, №6. – P. 77.
175. Zou, J. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF- κ B and proinflammatory cytokines. / J. Zou, F. Crews // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2010. – Vol. 34, №5. – P. 777-789.
176. Blednov, Y.A. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. / Y.A. Blednov, I. Ponomarev, C. Geil, S. Bergeson, G.F. Koob, R.A. Harris // *Addict. Biol.* – 2012. – Vol. 17. – P. 108–120.
177. Whitman, B.A. The cytokine mRNA increase induced by withdrawal from chronic ethanol in the sterile environment of brain is mediated by CRF and HMGB1 release. / B.A. Whitman, D.J. Knapp, D.F. Werner, F.T. Crews, G.R. Breese // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2013. – Vol. 37, №12. – P. 2086-97.
178. Yanai, H. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. / H. Yanai, T. Ban, Z. Wang, M.K. Choi, T. Kawamura, H. Negishi, M. Nakasato, Y. Lu, S. Hangai, R. Koshiba, D. Savitsky, L. Ronfani, S. Akira, M.E. Bianchi, K. Honda, T. Tamura, T. Kodama, T. Taniguchi // *Nature.* – 2009. – Vol. 462, №7269. – P. 99-103.