

Сравнительное исследование нейротоксического действия горькой алкогольной настойки Action Bitters и чистого алкоголя на префронтальную кору головного мозга крыс

Ч.А. Ойинбо¹, А.М. Эгой², Г. Морума¹

¹Университет дельты Нигера, Колледж медицинских наук, факультет базовой медицины, кафедра анатомии человека, штат Байэлса, Нигерия

²Медицинский университет Байэлсы, штат Байэлса, Нигерия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Action Bitters (AB) – горькая алкогольная настойка на травах, активно употребляемая в Нигерии из-за своего выраженного общетонизирующего эффекта. Несмотря на ее широкое употребление, в литературе крайне мало сведений о ее влиянии на префронтальную кору головного мозга и когнитивные функции.

Ц е л ь . Изучить влияние AB и чистого алкоголя (ЧА) на префронтальную кору (ПФК) головного мозга молодых крыс-самцов на модели 4-дневного введения алкоголя в высоких дозах.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Эксперимент проводили на 15 крысах, которые случайным образом были разделены на три группы по пять крыс в каждой. Контрольная группа получала 5 г/кг разведенного диетически полноценного корма (ДПК) (50 об. %), вторая группа – 5 г/кг AB в ДПК и третья группа – 5 г/кг ЧА в ДПК. Для оценки влияния AB и ЧА на когнитивные функции были использованы тест распознавания новых объектов и тест для оценки спонтанного чередования (в установке Т-образный лабиринт для крыс). Также было проведено гистологическое исследование срезов, полученных из тканей префронтальной коры головного мозга крыс.

Р е з у л ь т а т ы . В группах животных, получавших AB и ЧА, были выявлены более низкие показатели времени распознавания новых объектов, процента чередований и индекса дискриминации в тесте распознавания новых объектов. Гистологическое исследование показало наличие дегенеративных изменений в тканях префронтальной коры у крыс указанных групп.

З а к л ю ч е н и е . Обе субстанции вызывали существенное нарушение когнитивных функций и нейродегенеративные изменения в ПФК, более выраженные при введении ЧА. Полученные результаты свидетельствуют о том, что чрезмерное употребление алкогольных напитков на травах также может наносить серьезный вред организму.

Ключевые слова: алкогольные напитки, нейродегенеративные изменения, префронтальная кора.

Образец цитирования: Ойинбо Ч.А., Эгой А.М., Морума Г. Сравнительное исследование нейротоксического действия горькой алкогольной настойки Action Bitters и чистого алкоголя на префронтальную кору головного мозга крыс // Journal of Siberian Medical Sciences. 2025;9(1):41-51. DOI: 10.31549/2542-1174-2025-9-1-41-51

A comparative study of the neurotoxic effects of Action Bitters (an alcoholic beverage) and neutral-flavoured alcohol on the rat prefrontal cortex

C.A. Oyinbo¹, A.M. Eghoi², G. Moruma¹

¹Niger Delta University, Department of Human Anatomy, Faculty of Basic Medical Sciences, College of Health Sciences, Bayelsa State, Nigeria

²Bayelsa Medical University, Bayelsa State, Nigeria

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Action Bitters (AB) is an alcoholic polyherbal preparation widely consumed in Nigeria because of the belief that it purportedly boosts energy and overall well-being. Despite its usage, there is little information on its effect on the prefrontal cortex (PFC) and cognitive functions.

Поступила в редакцию 08.01.2025
Прошла рецензирование 21.01.2025
Принята к публикации 24.01.2025

Автор, ответственный за переписку

Ойинбо Чарльз Айдемайз: Университет дельты Нигера, Колледж медицинских наук, штат Байэлса, о-в Вилберфорс, Нигерия.
E-mail: charles.oyinbo@ndu.edu.ng

Received 08.01.2025
Revised 21.01.2025
Accepted 24.01.2025

Corresponding author

Charles A. Oyinbo: Niger Delta University, College of Health Sciences, Bayelsa State, Wilberforce Island, Nigeria.
E-mail: charles.oyinbo@ndu.edu.ng

A i m . To examine the effects of AB and neutral-flavoured alcohol (NFA) on the PFC young adult male rats in a four-day binge alcohol exposure model.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . In this study, 15 rats were randomly divided into three groups of five rats each. The 1st group, control rats, were administered 5 g/kg of a diluted nutritionally complete meal (NCM, 50% v/v); the 2nd group of rats received 5 g/kg of AB in NCM, and the last, 3^d group – 5 g/kg of NFA in NCM. The novel object recognition and T-maze tests were employed to investigate the effect of both substances on cognitive functions. To assess potential neurodegenerative alterations, histological examinations were performed on PFC samples.

R e s u l t s . A lower exploration time for novel objects, percentage alternation, novel object discrimination indexes were revealed. The histological findings showed neurodegeneration in the PFC of AB and NFA feed rats.

C o n c l u s i o n . Our study indicated that both substances induced substantial cognitive impairment and neurodegeneration, with alcohol exhibiting a more pronounced effect. However, the findings suggested that the dangers of binge drinking may be also present in this herbal alcoholic product consumption.

Keywords: alcoholic beverages, neurodegeneration, prefrontal cortex.

Citation example: Oyinbo C.A., Eghoi A.M., Moruma G. A comparative study of the neurotoxic effects of Action Bitters (an alcoholic beverage) and neutral-flavoured alcohol on the rat prefrontal cortex. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2025;9(1):41-51. DOI: 10.31549/2542-1174-2025-9-1-41-51

ВВЕДЕНИЕ

Чрезмерное потребление алкоголя является чрезвычайно серьезной проблемой мирового здравоохранения, поскольку им страдают лица любого возраста и пола [1]. Известно, что неумеренное потребление алкоголя вызывает неврологические и психические расстройства, такие как органическое поражение головного мозга, амнезия, расстройства сна, психозы (с судорожными припадками и без них) [2]. Негативные эффекты, вызываемые употреблением алкоголя, многочисленны, поэтому понимание природы нарушений мозговой деятельности, вызываемых алкоголем, и концентраций, при которых эти нарушения возникают, представляется крайне важной задачей.

В Нигерии алкогольные настойки на травах, известные как *bitters*, или биттеры, достаточно популярны, поскольку считается, что они обладают лечебными свойствами [3]. Это напитки обычно темного цвета с горьким, кисловатым или горько-сладким вкусом [3]. Чаще всего они употребляются в качестве общетонизирующего средства или аперитива до или после еды; считается, что они стимулируют пищеварение, повышают аппетит и устраняют тяжесть в желудке. Алкогольные настойки на травах также обладают свойствами детоксикантов и иногда используются для облегчения похмельного синдрома [4]. В Нигерии представлены несколько популярных марок алкогольных настоек на травах, например: Action Bitters (AB), Alomo Bitters, Orijin Bitters и Yoyo Bitters [3]. Эти

INTRODUCTION

Chronic alcohol consumption has been reported to be a serious public health concern, as it impacts the health of individuals of varying age and sex [1]. Chronic use of alcohol and alcoholic beverages has been widely acknowledged to cause neurological and mental disorders, such as organic brain damage, memory loss, somnopathy, and psychosis, with or without seizures [2]. The deleterious effects of alcohol are numerous, thus, understanding the structural damages caused by alcohol on the brain and the concentrations at which alcohol induces such damages are very important.

In Nigeria, alcoholic polyherbal preparations known as bitters are commonly consumed due to the common belief in their purported multiple medicinal properties [3]. They are usually characterized by a dark colour as well as bitter, sour, or bittersweet taste [3]. Bitters are used as tonics or aperitifs before or after meals; and are believed to stimulate digestion, improve appetite, and relieve stomach discomfort. Bitters are also thought to have detoxifying properties, and are sometimes used as a remedy for hangover [4]. There are several popular brands of bitters in Nigeria, such as Action Bitters (AB), Alomo Bitters, Orijin Bitters, and Yoyo Bitters, among others [3]. These brands often market their products as herbal supplements that can boost energy, enhance vitality, and improve overall well-being. These brands contain varying quantity of alcohol, hence, their excessive consumption may have negative health effects [3]. These bitters contain 30 to 45% alcohol – large enough for progres-

марки зачастую позиционируются как фитодобавки, повышающие энергию, жизненный тонус и в целом способствующие улучшению состояния здоровья. Перечисленные настойки на травах имеют достаточно высокое содержание алкоголя (30–45 %), поэтому их чрезмерное употребление может вызывать негативные эффекты и приводить при систематическом неумеренном употреблении к развитию алкогольной зависимости [3, 4].

АВ выпускается компанией Intercontinental Distillers Limited (штат Огун, Нигерия). Это травяной экстракт с высоким содержанием алкоголя, насыщенно темного цвета, с горьковато-сладким вкусом и приятным ароматом. Обычно употребляется в качестве общетонизирующего средства или афродизиака [3, 4]. В состав АВ входят: *Symphonia globulifera*, *Garcinia kola*, *Tetrapleura tetraptera*, *Lannea welwitschii*, деминерализованная вода, этиловый спирт и ароматизатор со вкусом брэнди, а также такие соединения растительного происхождения, как алкалоиды, флавоноиды, танины, фенолы, карденолиды, флобатанины и хиноны [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние АВ и чистого алкоголя (ЧА) на префронтальную кору (ПФК) головного мозга и когнитивные функции молодых крыс-самцов стока Sprague Dawley.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Пятнадцать молодых крыс-самцов стока Sprague Dawley массой 150–180 г были доставлены и содержались в клетках в лаборатории кафедры анатомии человека факультета базовых медицинских наук (ФБМН) Университета дельты Нигера (УДН). Крысы проходили акклиматизацию в течение 2 нед при неограниченном доступе к сухому гранулированному корму, кроме периода непосредственного эксперимента, когда животным вводили алкоголь (в соответствии с моделью запойного алкоголизма). Сухой корм убирали на 4 дня введения алкоголя в высоких дозах, но вода оставалась в доступе. Животные содержались в помещении с комнатной температурой при 12-часовом цикле дня и ночи. Все манипуляции проводились в соответствии с требованиями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и были одобрены этическим комитетом ФБМН УДН [6].

Дизайн исследования. Пятнадцать крыс были случайным образом распределены в

состояние алкогольного расстройства (AUD) у привычных или хронических пользователей [4].

АВ является продуктом Intercontinental Distillers Limited, Огун-штат, Нигерия. Это винно-окрашенный травяной экстракт, крепкий напиток с легким bitter-sweet и аппетитным ароматом. Он употребляется в основном из-за его восстанавливающего и афродизиакального эффекта [3, 4]. Ингредиенты в АВ: *Symphonia globulifera*, *Garcinia kola*, *Tetrapleura tetraptera*, *Lannea welwitschii*, деминерализованная вода, этиловый спирт, и бренди-аромат. Документированные фитохимические компоненты АВ — алкалоиды, флавоноиды, танины, фенолы, карденолиды, флобатанины и хиноны [5].

AIM OF THE RESEARCH

To examine the effects of AB and neutral-flavoured alcohol (NFA) on histology and cognition in young adult male Sprague Dawley rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Fifteen young adult male Sprague Dawley (SD) rats weighing 150–180 g were procured and housed in cages at the Department of Human Anatomy Research Lab, Faculty of Basic Medical Sciences (FBMS), Niger Delta University (NDU). They were acclimated for two weeks and allowed unlimited access to pelleted chow and water, except during ethanol exposure (to induce the binge-alcohol exposure model of AUD). Food was withheld during the four-day exposure to alcohol, but water remained readily available. They were maintained at ambient temperature of 12-hour light/dark cycle. All techniques utilised in this investigation were consistent with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the FBMS Research Ethics Committee, NDU [6].

Experimental design. In this study, 15 rats were randomly divided into three groups of five rats each. The control group received a nutritionally complete meal (NCM) consisting of 5 g/kg of Vita Milk (Ghana), diluted to 50% v/v. This diet was administered via an oro-gastric gavage tube, following a known protocol [7]. In contrast, the rats in AB and NFA groups received a modified NCM, supplemented with either AB (25% w/v) or neutral-flavoured ethanol (25% w/v), respectively. The treatments were administered at a dose of 5 g/kg, diluted to 50% v/v in the NCM [7]. Treatment administration was standardised across all groups. Each rat received three treatments per day, spaced evenly apart at 6 am, 2 pm, and 10 pm. This treatment regimen was maintained for four days. Cognitive assessments of the rats were conducted on the fourth day.

3 группы по 5 животных в каждой. Контрольная группа получала 5 г/кг диетически полноценного корма (ДПК) (Vita Milk (Ghana)), разведенного до уровня 50 об. %, который вводили через желудочный зонд по протоколу, описанному в [7]. Животные других двух групп получали модифицированный ДПК – с добавлением АВ (соотношение масса/объем 25 %) или ЧА (соотношение масса/объем 25 %) соответственно в дозе 5 г/кг, разведенного до уровня 50 об. % [7]. Введение ДПК и модифицированного ДПК было стандартным во всех группах: каждому животному вводили субстанцию ежедневно в 6:00, 14:00 и 22:00 в течение 4 сут. Оценка когнитивных функций проводилась на 4-е сутки.

Тест распознавания новых объектов (ТРНО). ТРНО проводили по методике, описанной в [1, 8], в установке из поливинилхлорида размерами 60×60×45 см. После трехдневного периода адаптации крысам предъявляли 2 одинаковых объекта в течение 5 мин (тренировка). Через 24 ч (тест) 1 объект заменяли новым, отличающимся от ранее предъявленного объекта размером, формой и цветом. Время различения (ВР) для каждого объекта регистрировалось в течение 3 мин. Для оценки опознающей памяти рассчитывали индекс дискриминации (ИД) [(ВР нового объекта – ВР известного объекта / Общее время различения)]. Положительные значения индекса свидетельствовали о возможности различения новых объектов. Установку для тестирования и предъявляемые объекты обрабатывали 70% этиловым спиртом в ходе эксперимента.

Тест «Т-лабиринт». Поведение спонтанного чередования оценивали в установке «Т-образный лабиринт» (стартовый рукав 60×10 см, боковые рукава 40×10 см) [9]. Каждую крысу трижды помещали в лабиринт. Первые два захода считали одним, установочным. В каждый заход в лабиринт животное помещали у входа в стартовый рукав и позволяли исследовать в течение 3 мин боковые рукава. Как только крыса заходила в боковой рукав (всеми 4 лапами), вход в противоположный боковой рукав закрывался в течение 30 с. Затем крысу вновь помещали в исходное положение – у входа в стартовый рукав. Правильным считался выбор альтернативного бокового рукава при повторном помещении крысы в лабиринт. Затем рассчитывали индекс (процент чередований), характеризующий пространственную рабочую память, как число правильных чередований, поделенное на количество заходов в лабиринт, умноженное на 100 %. Установку для тестирования обрабаты-

Novel object recognition (NOR) test. The NOR test was conducted as previously described [1, 8]. Briefly, testing was conducted using a 60×60×45 cm open-field polyvinyl chloride vessel. After a 3-day habituation period, rats were exposed to two identical objects for 5 min (training). Twenty-four hours later (testing), an object known to the rats was replaced with an unfamiliar object, differing in size, shape, and colour. Exploration time for each object was recorded over 3 min. A discrimination index [(novel object exploration time – familiar object exploration time)/total exploration time] was calculated to assess recognition memory; positive values indicating predilection for the novel object. The vessel and all objects were cleaned with 70% ethanol between trials.

T-maze (TM) test. Spontaneous alternation (SA) behaviour was assessed using a T-maze (60×10 cm start arm, 40×10 cm goal arms) [9]. Each rat completed three runs; the first two runs constituted a single trial (set). In each run, the rat was introduced at the start arm and allowed three minutes to explore the goal arms. Once the rat entered a goal arm (all four paws inside), the opposite goal arm was blocked for 30 seconds before the rat was re-introduced to the start arm for the next run within that set. A correct response was scored if the rat selected a different goal arm on the second run. The alternation percentage, an index of spatial working memory, was estimated as the number of correct alternations divided by the total number of sets, multiplied by 100%. The maze was cleaned with 70% ethanol before the rats entered the maze.

Animal sacrifice and brain collection. After the experimental period of 4 days, the rats were sacrificed humanely by cervical dislocation [10]. Afterwards, their brains were dissected out and fixed with 10% phosphate-buffered formalin for 2 days, thereafter processed for histopathological examination.

Histopathological study. Randomly selected tissue sections from each group were stained with hematoxylin-eosin and evaluated. The representative sections ($n = 5$ per group) were examined, and degenerating neurons (DN) were identified in the manner previously described [11]. DNs were counted, and histopathologic changes in the grey matter (GM) of the prefrontal cortex (PFC) were scored on a six-point semiquantitative scale. No lesion in the GM = 0, 1–5 DN = 1, 5–10 DN = 2, more than 10 DN = 3; modest vacuolation plus 5–10 DN = 4; mild vacuolation plus 5–10 = 5, and significant vacuolation plus more than 10 DN = 6. The final score,

вали 70% этиловым спиртом перед каждой новой серией эксперимента.

Выведение животных из эксперимента и получение материала для гистопатологического исследования. После 4 сут, в течение которых проводилась описанная стадия исследования, животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации [10]. Затем иссекали мозг и помещали его в 10% нейтральный буферный раствор формалина на 2 сут для дальнейшего проведения гистопатологического исследования.

Гистопатологическое исследование. В случайном порядке выбранные из каждой группы срезы ткани головного мозга окрашивали гематоксилином и эозином и изучали. В выбранных срезах (5 из каждой группы) определяли наличие нейронов, подвергшихся дегенеративным изменениям (ДН), по описанной в [11] методике. Подсчитывали количество ДН и оценивали гистопатологические изменения в сером веществе ПФК по 6-балльной полуколичественной шкале: 0 баллов – отсутствие изменений в сером веществе; 1 балл – 1–5 ДН; 2 балла – 5–10 ДН; 3 балла – больше 10 ДН; 4 балла – незначительная вакуолизация и 5–10 ДН; 5 баллов – вакуолизация средней степени и 5–10 ДН; 6 баллов – выраженная вакуолизация и более 10 ДН. Затем для каждой группы рассчитывали индекс нейродегенерации (ИДг) как среднюю оценку по группе. Исследование проводили при увеличении $\times 400$.

Статистический анализ. Полученные результаты были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и *post-hoc* теста Тьюки для множественных сравнений. Результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Для анализа использовали программу GraphPad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поведение спонтанного чередования. Результаты оценки поведения спонтанного чередования для контрольной группы и групп АВ и ЧА представлены на рис. 1. Наиболее высокие значения этого показателя отмечались в контрольной группе, затем в группе АВ, самые низкие значения – в группе ЧА. Процент спонтанных чередований в группах АВ и ЧА ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) был значимо ниже в сравнении с контрольной группой.

Индекс дискриминации новых объектов. На рис. 2 представлена диаграмма распре-

the neurodegenerative index (NDI) for each group were calculated by averaging the scores of all parts in that group. The evaluation was performed at magnification $\times 400$.

Statistical analysis. The data were analysed using one-way ANOVA, with Tukey's *post-hoc* test for multiple comparisons. The results were expressed as mean $\pm$ SD. A p value $< 0,05$ was deemed significant. GraphPad Prism 5 was utilised for the analysis.

RESULTS

Spontaneous alternation. SA evaluation showed the mean alternation score for control, AB and NFA groups (Fig. 1). The control group had the highest mean SA percentage, followed by the AB group, and finally the NFA group. SA percentage in AB and NFA groups was significantly lower (at $p < 0,05$ and $p < 0,01$, respectively) as compared to the control group.

Novel object discrimination index (NODI). The boxplot represents the distribution of NODI values for rats in control, AB, and NFA groups during the NOR test (Fig. 2). The discrimination index values were lower for AB group and NFA group when compared with control rats ($p < 0,05$ and $p < 0,01$, respectively). Results showed that both control and AB animals exhibited a positive discrimination index (i.e. index above zero line), however, rats, treated with AB, spent lesser time with the novel objects and had a lower discrimination index ($p < 0,05$) than control animals. There was also a significant difference in discrimination indexes between AB and NFA groups ($p < 0,05$).

Qualitative behavioural findings. Rats, treated with AB, showed reduced motor activity and anxiety compared to the NFA group (Table 1). The rats, treated with NFA, however, were agitated, hence displayed both increased anxiety and locomotor activity compared to AB rats. This may be attributed to the phytochemicals in AB.

Histopathological findings. Histopathological findings in the PFC of rats of the control, AB, and NFA groups are shown in Fig. 3. Sections of the control group (panel A) revealed normal architecture with numerous apparently healthy cells. The sections of rats, exposed to AB (panel B), however, showed many DN with nuclear condensation (white arrows) and necrotic neurons (black arrows). Cortex of the NFA feed rats (panel C) showed numerous DN, like those seen in the AB animals. Statistically significant differences for NDI ($p < 0,05$) between the control group and the AB and NFA groups were revealed (panel D). However, AB vs NFA showed no statistically significant differences.

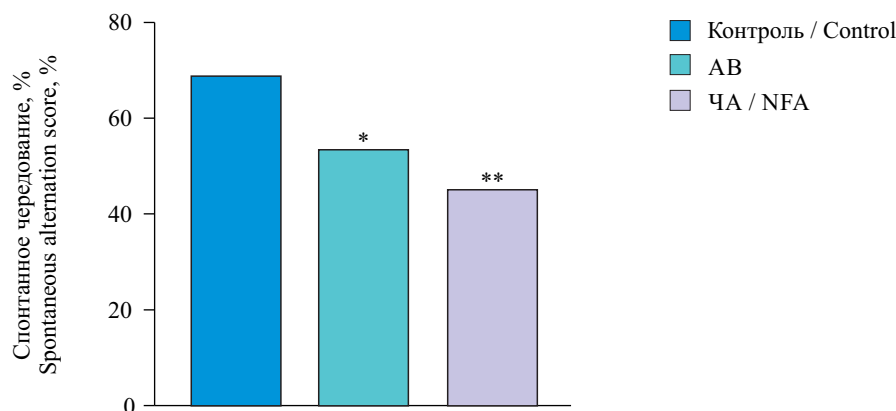


Рис. 1. Процент спонтанного чередования в тесте «Т-лабиринт» в группах исследования. В группах АВ и ЧА значимое отличие от контрольной группы – $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**) соответственно (АВ – Action Bitters; ЧА – чистый алкоголь)

Fig. 1. Percentage of spontaneous alternation in the T-maze test for control, AN and NFA groups. AB was significantly different from control at $p < 0,05$ (*), while NFA was significant at $p < 0,01$ (**) (AB – Action Bitters; NFA – neutral-flavoured alcohol)

деления значений ИД для контрольной группы и групп АВ и ЧА. Значения ИД были ниже в группах АВ и ЧА ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Результаты показывают, что животные как контрольной, так и группы АВ имели положительные значения ИД (выше нулевого уровня), однако животные, получавшие АВ, меньше времени тратили на исследование новых объектов, а ИД в их группе был ниже в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$). Значимые различия ИД были выявлены между группами АВ и ЧА ($p < 0,05$).

Поведение животных. Крысы, получавшие АВ, демонстрировали меньшую двигательную активность и тревожность в сравнении с груп-

DISCUSSION

The present study investigated the behavioural and neurodegenerative effects of AB and NFA on SD rats using a four-day binge substance exposure model. Our findings provided insights on the influence of these substances on cognitive function, behavioural performance, and brain tissue. The NOR and T-maze analyses demonstrated significant cognitive impairment in rats, exposed to both AB and NFA. Both NOR and T-maze test revealed significant decrease in the exploration time of the novel object in both substance-exposed groups versus control rats. Our study also revealed that the decrease was more remarkable in the NFA-treated group compared with AB-exposed rats

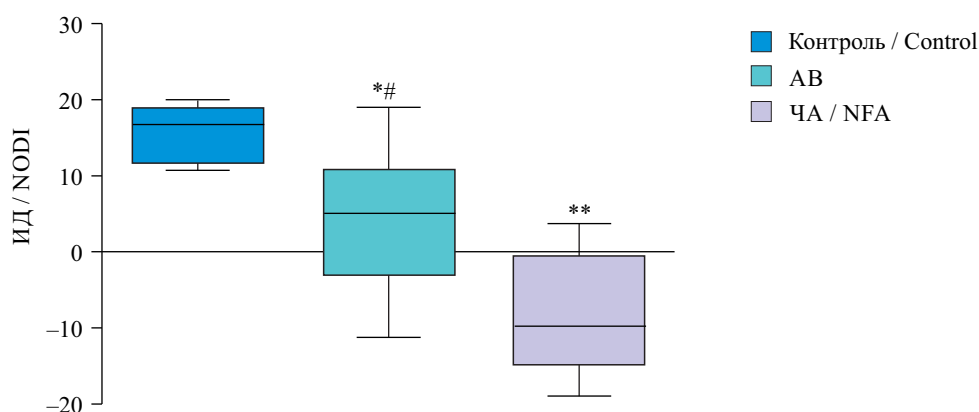


Рис. 2. Сравнительный анализ ИД новых объектов в группах исследования по результатам теста распознавания новых объектов. ИД в группах АВ и ЧА значимо отличается от контрольной: * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ соответственно. Значимые различия между группами АВ и ЧА (* $p < 0,05$)

(ИД – индекс дискриминации; АВ – Action Bitters; ЧА – чистый алкоголь)
Fig. 2. Comparative analysis of the novel object discrimination index (NODI) in groups during the novel object recognition test. AB and NFA animals showed significant differences from control ones: * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$, respectively. And also, there was a significant difference between AB and NFA (* $p < 0,05$) (AB – Action Bitters; NFA – neutral-flavoured alcohol)

Таблица 1. Поведение животных групп АВ и ЧА**Table 1.** Qualitative behavioural parameters observed in AB- and NFA-exposed rats

Показатель / Parameter	АВ	ЧА / NFA
Двигательная активность / Locomotor activity	Снижена / Decreased	Повышена / Increased
Настроение / Mood	Спокойное / Calmed	Возбужденное / Agitated

Примечание. АВ – Action Bitters; ЧА – чистый алкоголь.

Note. AB – Action Bitters; NFA – neutral-flavoured alcohol.

пой ЧА (табл. 1). Крысы группы ЧА были более возбужденными, что свидетельствует о повышенном уровне тревожности и двигательной активности в сравнении с группой АВ – это может быть связано с наличием в АВ биологически активных веществ растительного происхождения.

(Fig. 1 and 2). Studies have shown, that a decrease in exploration time in both tests indicated impaired recognition memory, since normal rats have a natural tendency for exploration [9, 12].

Our study also revealed that a decreased exploration time in both AB and NFA groups was also asso-

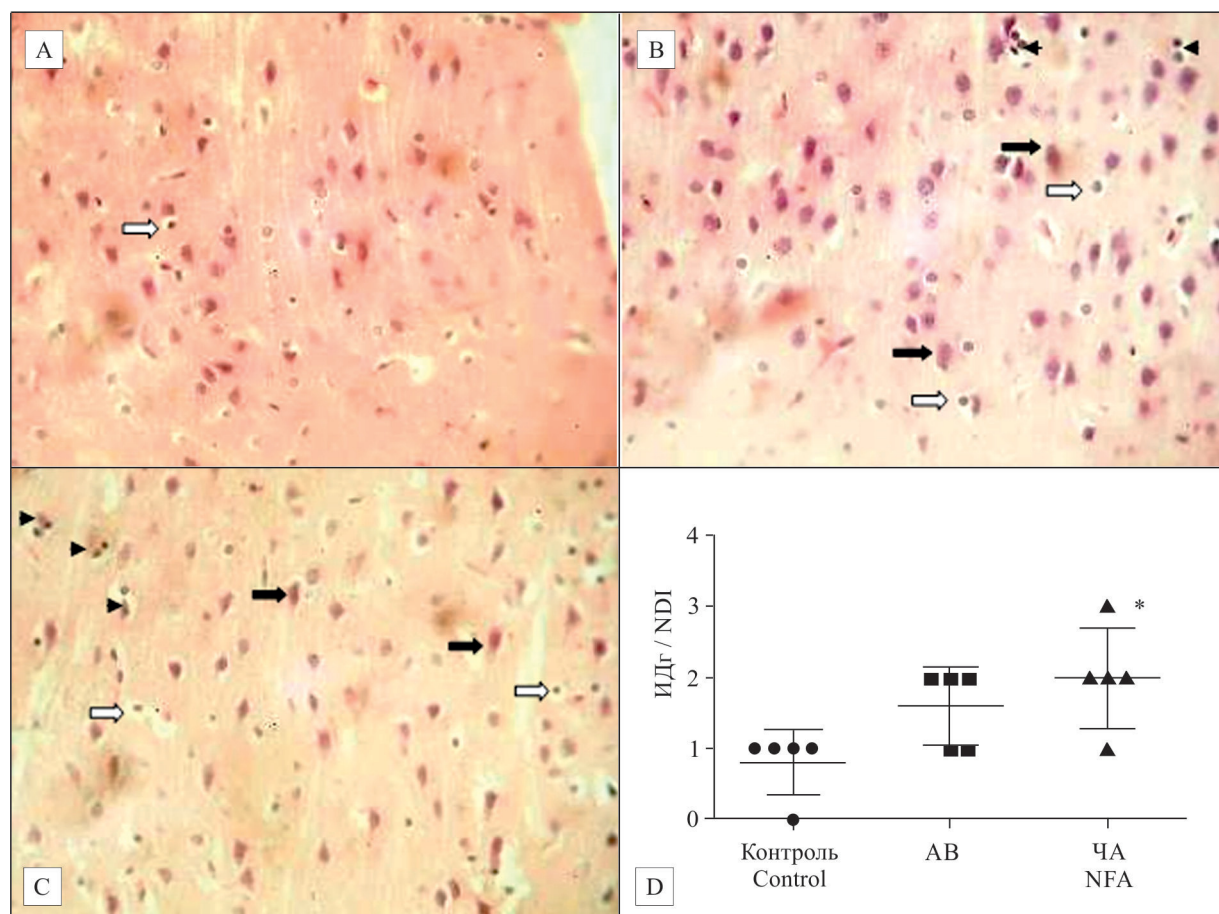


Рис. 3. Образцы контрольной группы (А), группы АВ (В) и группы ЧА (С). Клетки с признаками дегенеративных изменений и некроза (черные стрелки), конденсации ядер (белые стрелки), вероятными признаками нейронального апоптоза и некроза (черные стрелки) и фрагментации ядра (черные наконечники). Значимые различия ИД между контрольной группой и группами АВ и ЧА ($p < 0,05$), но не между АВ и ЧА (ИДг – индекс дегенерации; АВ – Action Bitters; ЧА – чистый алкоголь)

Fig. 3. Representative sections of control (A), AB (B), and NFA (C) groups, showing degenerating and necrotising cells (black arrows), nuclear condensation (white arrows), probably apoptotic neurons, necrotised neurons (black arrows), and nuclear fragmentation (black arrowheads). NDI (D) for the NFA group was significant ($*p < 0.05$) compared to control. But there was no significant difference between the NDIs of AB and NFA groups (AB – Action Bitters; NFA – neutral-flavoured alcohol; NDI – neurodegenerative index). Magnification $\times 400$. Stained with hematoxylin and eosin

Гистопатологическое исследование.

Результаты гистопатологического исследования образцов контрольной группы и групп АВ и ЧА представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, А, клеточная структура образцов контрольной группы без изменений, наблюдается значительное число неизмененных клеток. В образцах группы АВ (рис. 3, В), напротив, выявляется значительное количество ДН с признаками конденсации ядер (белые стрелки) и некроз нейронов (черные стрелки). Кора крыс группы ЧА (рис. 3, С) включает значительное количество ДН, что характерно и для группы АВ. Выявлены статистически значимые различия ИДг ($p < 0,05$) между контрольной группой и группами АВ и ЧА, тогда как между группами АВ и ЧА статистически значимых различий не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование выявило влияние АВ и ЧА на когнитивные функции и префронтальную кору крыс стока Sprague Dawley при 4-дневном моделировании запойного потребления алкоголя. Полученные результаты дополняют представления о характере влияния изучаемых субстанций на когнитивные функции, поведение и кору головного мозга. ТРНО и тест «Т-лабиринт» продемонстрировали значительное когнитивное снижение у крыс групп АВ и ЧА. В ходе обоих тестов выявлено значительное уменьшение времени различения нового объекта в группах АВ и ЧА. Наше исследование показало, что снижение данного показателя было более выраженным в группе ЧА по сравнению с группой АВ (см. рис. 1 и 2). Известно, что уменьшение времени различения нового объекта, выявляемое в ТРНО и тесте «Т-лабиринт», свидетельствует о нарушениях опознающей памяти, поскольку исследовательское поведение является инстинктивным для крыс [9, 12].

Наше исследование показало, что уменьшение времени различения нового объекта в группах АВ и ЧА также ассоциировано со снижением процента спонтанного чередования (см. рис. 1 и 2). Снижение этого показателя, наблюдаемое как в группе АВ, так и ЧА, можно рассматривать как нарушение в поведении выбора рукавов, что свидетельствует о нарушении механизмов пространственной памяти [13]. Полученные результаты согласуются с данными, свидетельствующими о том, что высокие значения спонтанного чередования говорят о нормальном функционировании механизмов пространственной памяти [9, 14–16]. Наше исследование показало, что ИД

связано с более низким процентом СА (Fig. 1 and 2). The reduced SA percentage observed in both rat groups could be interpreted as a decrease in tendency of rat to alternate between arms, which is indicative of spatial memory impairment [13]. The result is in line with the previous studies which showed that high percentage of SA was indicative of good spatial memory [9, 14–16]. Our study showed that the NODI was significantly lower for both substance-exposed rats compared to the control animals. Although the NODI was lower for both groups, AB-induced rats exhibited a higher NODI compared with NFA-treated rats. Higher indexes for AB rats meant that these rats spent significantly more time with the novel objects compared to NFA-treated animals. This is indicative of lesser cognitive impairment in the AB group compared to the NFA group. These findings are consistent with earlier researches that found cognitive deficits after alcohol intake [17–19]. The cognitive deficits observed in the present study may be attributed to the neurotoxic effects of AB and NFA on brain regions, involved in memory and cognition, such as the hippocampus and prefrontal cortex [17, 20]. Furthermore, histological examination of brain tissues revealed significant neuronal damage in the PFCs (Fig. 3) of rats, exposed to both substances. The PFC is a crucial region for executive function, decision-making, and cognitive control [21]. The detected alteration or damage (Fig. 3) in this region may explain the cognitive impairments seen in the behavioural tests.

The present study found that the severity of cognitive impairments and neurodegeneration was more pronounced in the NFA-feed rats compared to the AB-feed ones. This suggests that, although AB may have some negative effects, it may be less neurotoxic than NFA, presumably due to its herbal constituents [3, 4]. Our result is in line with other research that documented the neuroprotective benefits of some botanical remedies [22, 23]. The present study also observed significant changes in behaviour of animals in both experimental groups. The locomotor activity was decreased in the AB group, while it was increased in the NFA group (Table 1). This suggests that AB may have a calming or euphorising effect, while NFA retained its stimulatory effect. However, both substances modified the behavioural patterns which indicates, perhaps arguably, a serious impact on emotional well-being, supported indirectly by the significant neurodegeneration caused by both substances (Fig. 3). The findings of this study have significant implications for human brain health and substance use disorders. Alcohol is a widely used substance that can have detrimental effects on brain

был статистически значимо ниже в группах АВ и ЧА в сравнении с контрольной группой, но в группе АВ он был выше, чем в группе ЧА. Более высокие значения ИД в группе АВ показывают, что животные этой группы больше времени тратят на исследование новых объектов по сравнению с животными группы ЧА. Это свидетельствует о меньшем нарушении когнитивных функций у животных группы АВ по сравнению с группой ЧА и согласуется с полученными ранее данными о развитии когнитивного дефицита после употребления алкоголя [17–19]. Когнитивный дефицит, выявленный у крыс в нашем эксперименте, может быть ассоциирован с нейротоксическим влиянием АВ и ЧА на регионы мозга, ответственные за память и распознавание, такие как гиппокамп и префронтальная кора [17–19]. Более того, гистологическое исследование образцов ткани мозга выявило значительное повреждение нейронов в префронтальной коре (см. рис. 3) крыс, получавших АВ и ЧА. Префронтальная кора является крайне значимым регионом, ответственным за целенаправленную деятельность, принятие решений и управление когнитивными процессами [21]. Выявленные в ходе гистологического исследования изменения в этом регионе могут объяснять когнитивные нарушения, которые наблюдались в поведенческих тестах.

Настоящее исследование показало, что когнитивные и нейродегенеративные нарушения были более выражены в группе ЧА по сравнению с АВ. Это свидетельствует о том, что АВ оказывает негативное влияние на организм крыс, но это влияние менее выражено, вероятно, из-за наличия ряда фитокомпонентов [3, 4]. Наши результаты согласуются с данными других исследований о нейропротективном эффекте ряда лекарственных препаратов растительного происхождения. Проведенное нами исследование также показало значительные изменения в поведении крыс, получавших АВ и ЧА. Двигательная активность была снижена в группе АВ и, напротив, увеличена в группе ЧА (см. табл. 1), что может свидетельствовать о наличии у АВ релаксирующего или эйфоризирующего эффекта, а у ЧА – стимулирующего. Однако обе субстанции изменяют модели поведения, что так или иначе указывает на их негативное воздействие на эмоциональную сферу и косвенно подтверждается наличием значимых нейродегенеративных изменений, вызванных АВ и ЧА (см. рис. 3). Полученные нами данные дополняют наши представления о нормальном функционировании мозга человека

health, particularly in cases of chronic and excessive consumption [17].

CONCLUSION

The present study suggests that binge consumption of АВ, an herbal alcoholic beverage, may have some negative effects on cognitive function and brain tissue, although it may be less neurotoxic than NFA of the same strength.

Authors' contributions

C.A. Oyinbo: conceptualization, methodology, investigation, result analysis and writing.

A.M. Eghoi: methodology, validation, result analysis and writing.

G. Moruma: conceptualization, methodology, investigation and result analysis.

All authors contributed to writing the final manuscript.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

и расстройств, вызванных употреблением психоактивных веществ, прежде всего алкоголя (вследствие его широкой распространенности), который оказывает крайне негативное влияние на работу мозга, особенно при неумеренном употреблении [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование подтверждает, что неумеренное потребление АВ, горькой алкогольной настойки на травах, может оказывать негативное влияние на когнитивные функции и головной мозг, хотя это влияние и менее выражено по сравнению с алкоголем той же крепости, но без растительных компонентов.

Вклад авторов

Ч.А. Ойинбо: концепция, методология, проведение исследования, анализ результатов и написание статьи.

А.М. Эгой: методология, валидация, анализ результатов и написание статьи.

Г. Морума: концепция, методология, проведение исследования и анализ результатов.

Все авторы принимали участие в написании окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jani B.D., McQueenie R., Nicholl B.I. et al. Association between patterns of alcohol consumption (beverage type, frequency and consumption with food) and risk of adverse health outcomes: a prospective cohort study // *BMC Med.* 2021;19(1):8. DOI: 10.1186/s12916-020-01878-2.
2. Nutt D., Hayes A., Fonville L. et al. Alcohol and the brain // *Nutrients.* 2021;13(11):3938. DOI: 10.3390/nu13113938.
3. Onugwu S.O., Ezugwu C.O., Odoh U.E., Onugwu A.L. Phytochemical, biochemical and biological evaluation of five herbal bitters sold in pharmacy shops in Eastern Nigeria // *J. Adv. Med. Pharmaceut. Sci.* 2021;23(9):1-11. DOI: 10.9734/jamps/2021/v23i930255.
4. Johnson J.T., Okafor E.O. Effects of various alcoholic bitters on the hepatological indices of albino Wistar rats // *Eur. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.* 2021;8(8):293-298.
5. Waribo H.A., Edamisan E., Elekima I., Bartimaesus E.A.S. Effect of oral consumption of action bitters on renal indices of apparently healthy subjects in Port Harcourt Metropolis // *Asian J. Biochem. Gen. Mol. Biol.* 2021;9(3):14-19. DOI: 10.9734/ajbgmb/2021/v9i330217.
6. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. 2011. URL: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf> (accessed 22/01/2025).
7. West R.K., Rodgers S.P., Leasure J.L. Neural perturbations associated with recurrent binge alcohol in male and female rats // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2021;45(2):365-374. DOI: 10.1111/acer.14529.
8. Fedosova E.A., Shatskova A.B., Sarkisova K.Yu. Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2021;51(4):501-512. DOI: 10.1007/s11055-021-01097-z.
9. Tournier B.B., Barca C., Fall A.B. et al. Spatial reference learning deficits in absence of dysfunctional working memory in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease // *Genes, Brain and Behavior.* 2021;20(5):e12712. DOI: 10.1111/gbb.12712.
10. Aguwa U.S., Eze C.E., Obinwa B.N. et al. Comparing the effect of methods of rat euthanasia on the brain of Wistar rats: Cervical dislocation, chloroform inhalation, diethyl ether inhalation and formalin inhalation // *J. Adv. Med. Medic. Res.* 2020;32(17):8-16. DOI: 10.9734/jammr/2020/v32i1730636.
11. Elmore S.A., Dixon D., Hailey J.R. et al. Recommendations from the INHAND apoptosis/necrosis working group // *Toxicol. Pathol.* 2016;44(2):173-188. DOI: 10.1177/0192623315625859.
12. d'Isa R., Comi G., Leocani L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze // *Sci. Rep.* 2021;11(1):21177.
13. Kim J., Kang H., Lee Y.B. et al. A quantitative analysis of spontaneous alternation behaviors on a Y-maze reveals adverse effects of acute social isolation on spatial working memory // *Sci. Rep.* 2023;13(1):14722.

REFERENCES

1. Jani B.D., McQueenie R., Nicholl B.I. et al. Association between patterns of alcohol consumption (beverage type, frequency and consumption with food) and risk of adverse health outcomes: a prospective cohort study. *BMC Med.* 2021;19(1):8. DOI: 10.1186/s12916-020-01878-2.
2. Nutt D., Hayes A., Fonville L. et al. Alcohol and the brain. *Nutrients.* 2021;13(11):3938. DOI: 10.3390/nu13113938.
3. Onugwu S.O., Ezugwu C.O., Odoh U.E., Onugwu A.L. Phytochemical, biochemical and biological evaluation of five herbal bitters sold in pharmacy shops in Eastern Nigeria. *J. Adv. Med. Pharmaceut. Sci.* 2021;23(9):1-11. DOI: 10.9734/jamps/2021/v23i930255.
4. Johnson J.T., Okafor E.O. Effects of various alcoholic bitters on the hepatological indices of albino Wistar rats. *Eur. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.* 2021;8(8):293-298.
5. Waribo H.A., Edamisan E., Elekima I., Bartimaesus E.A.S. Effect of oral consumption of action bitters on renal indices of apparently healthy subjects in Port Harcourt Metropolis. *Asian J. Biochem. Gen. Mol. Biol.* 2021;9(3):14-19. DOI: 10.9734/ajbgmb/2021/v9i330217.
6. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. 2011. URL: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf> (дата обращения 22.01.2025).
7. West R.K., Rodgers S.P., Leasure J.L. Neural perturbations associated with recurrent binge alcohol in male and female rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2021;45(2):365-374. DOI: 10.1111/acer.14529.
8. Fedosova E.A., Shatskova A.B., Sarkisova K.Yu. Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2021;51(4):501-512. DOI: 10.1007/s11055-021-01097-z.
9. Tournier B.B., Barca C., Fall A.B. et al. Spatial reference learning deficits in absence of dysfunctional working memory in the TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior.* 2021;20(5):e12712. DOI: 10.1111/gbb.12712.
10. Aguwa U.S., Eze C.E., Obinwa B.N. et al. Comparing the effect of methods of rat euthanasia on the brain of Wistar rats: Cervical dislocation, chloroform inhalation, diethyl ether inhalation and formalin inhalation. *J. Adv. Med. Medic. Res.* 2020;32(17):8-16. DOI: 10.9734/jammr/2020/v32i1730636.
11. Elmore S.A., Dixon D., Hailey J.R. et al. Recommendations from the INHAND apoptosis/necrosis working group. *Toxicol. Pathol.* 2016;44(2):173-188. DOI: 10.1177/0192623315625859.
12. d'Isa R., Comi G., Leocani L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21177.
13. Kim J., Kang H., Lee Y.B. et al. A quantitative analysis of spontaneous alternation behaviors on a Y-maze reveals adverse effects of acute social isolation on spatial working memory. *Sci. Rep.* 2023;13(1):14722.

14. Jordan J.T., Tong Y., Pytte C.L. Transection of the ventral hippocampal commissure impairs spatial reference but not contextual or spatial working memory // *Learn. Mem.* 2022;29(1):29-37. DOI: 10.1101/lm.053483.121.
15. Zhou Z., Kim K., Ramsey J.J., Rutkowski J.M. Ketogenic diets initiated in late mid-life improved measures of spatial memory in male mice // *Geroscience.* 2023;45(4):2481-2494. DOI: 10.1007/s11357-023-00769-7.
16. Memudu A.E., Adewumi A.E. Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the cerebello-hippocampal cortex // *Metab. Brain Dis.* 2021;36(7):1729-1745. DOI: 10.1007/s11011-021-00720-9.
17. Crews F.T., Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism // *Alcohol Alcohol.* 2009;44(2):115-127. DOI: 10.1093/alcac/agn079.
18. Lao Y., Hou L., Li J. et al. Association between alcohol intake, mild cognitive impairment and progression to dementia: a dose-response meta-analysis // *Aging Clin. Exp. Res.* 2021;33(5):1175-1185. DOI: 10.1007/s40520-020-01605-0.
19. García-Baos A., Puig-Reyne X., García-Algar Ó., Valverde O. Cannabidiol attenuates cognitive deficits and neuroinflammation induced by early alcohol exposure in a mice model // *Biomed. Pharmacother.* 2021;141:111813. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111813.
20. Hedayati-Moghadam M., Razazpour F., Pourfridoni M. et al. Ethanol's impact on the brain: a neurobiological perspective on the mechanisms of memory impairment // *Mol. Biol. Rep.* 2024;51(1):782. DOI: 10.1007/s11033-024-09748-3.
21. Friedman N.P., Robbins T.W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function // *Neuropsychopharmacology.* 2022;47(1):72-89.
22. Dev P., Pathak A. Neuroprotective activities of medicinal plants and natural bioactive compounds // *Biopharmacological Activities of Medicinal Plants and Bioactive Compounds* / Dr. Ajeet Singh, Dr. Navneet (eds.). Nova Science Pub Inc, 2021. P. 49.
23. Kabra S., Priya T., Basu T. et al. A review study on herbal nutraceuticals: A leading edge in the treatment of neurological disorders with the help of medicinal plants // *J. Nat. Remed.* 2024;24(5):995-1004. DOI: 10.18311/jnr/2024/36026.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ойинбо Чарльз Айдемайз – PhD, доцент, Университет дельты Нигера, Колледж медицинских наук, факультет базовой медицины, кафедра анатомии человека, штат Байэлса, Нигерия. ORCID: 0000-0001-7911-1392.

Эгой Азибадия Милтон – PhD, доцент, Медицинский университет Байэлсы, штат Байэлса, Нигерия. ORCID: 0000-0003-0975-6173.

Морума Гезсеман – бакалавр, младший научный сотрудник, Университет дельты Нигера, Колледж медицинских наук, факультет базовой медицины, кафедра анатомии человека, штат Байэлса, Нигерия.

14. Jordan J.T., Tong Y., Pytte C.L. Transection of the ventral hippocampal commissure impairs spatial reference but not contextual or spatial working memory. *Learn. Mem.* 2022;29(1):29-37. DOI: 10.1101/lm.053483.121.
15. Zhou Z., Kim K., Ramsey J.J., Rutkowski J.M. Ketogenic diets initiated in late mid-life improved measures of spatial memory in male mice. *Geroscience.* 2023;45(4):2481-2494. DOI: 10.1007/s11357-023-00769-7.
16. Memudu A.E., Adewumi A.E. Alpha lipoic acid ameliorates scopolamine induced memory deficit and neurodegeneration in the cerebello-hippocampal cortex. *Metab. Brain Dis.* 2021;36(7):1729-1745. DOI: 10.1007/s11011-021-00720-9.
17. Crews F.T., Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2009;44(2):115-127. DOI: 10.1093/alcac/agn079.
18. Lao Y., Hou L., Li J. et al. Association between alcohol intake, mild cognitive impairment and progression to dementia: a dose-response meta-analysis. *Aging Clin. Exp. Res.* 2021;33(5):1175-1185. DOI: 10.1007/s40520-020-01605-0.
19. García-Baos A., Puig-Reyne X., García-Algar Ó., Valverde O. Cannabidiol attenuates cognitive deficits and neuroinflammation induced by early alcohol exposure in a mice model. *Biomed. Pharmacother.* 2021;141:111813. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111813.
20. Hedayati-Moghadam M., Razazpour F., Pourfridoni M. et al. Ethanol's impact on the brain: a neurobiological perspective on the mechanisms of memory impairment. *Mol. Biol. Rep.* 2024;51(1):782. DOI: 10.1007/s11033-024-09748-3.
21. Friedman N.P., Robbins T.W. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology.* 2022;47(1):72-89.
22. Dev P., Pathak A. Neuroprotective activities of medicinal plants and natural bioactive compounds. In Dr. Ajeet Singh, Dr. Navneet (eds.) *Biopharmacological Activities of Medicinal Plants and Bioactive Compounds*. Nova Science Pub Inc, 2021. P. 49.
23. Kabra S., Priya T., Basu T. et al. A review study on herbal nutraceuticals: a leading edge in the treatment of neurological disorders with the help of medicinal plants. *J. Nat. Remed.* 2024;24(5):995-1004. DOI: 10.18311/jnr/2024/36026.

ABOUT THE AUTHORS

Charles Aidemise Oyinbo – PhD, Associate Professor, Niger Delta University, Department of Human Anatomy, Faculty of Basic Medical Sciences, College of Health Sciences, Bayelsa State, Nigeria. ORCID: 0000-0001-7911-1392.

Azibaediya Milton Eghoi – PhD, Assistant Professor, Bayelsa Medical University, Bayelsa State, Nigeria. ORCID: 0000-0003-0975-6173.

Gethsemene Moruma – Bachelor of Science, Research Assistant, Niger Delta University, Department of Human Anatomy, Faculty of Basic Medical Sciences, College of Health Sciences, Bayelsa State, Nigeria.