

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА С1473G В ГЕНЕ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 В ЭФФЕКТАХ ОСТРОГО ВВЕДЕНИЯ ЭТАНОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *c-fos* И МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ

© 2023 Д.В. Базовкина*, Д.В. Фурсенко, В.С. Науменко, А.В. Куликов

Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: daryabazovkina@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2022

После доработки 26.12.2022

Принята к публикации 29.12.2022

Триптофангидроксилаза-2 является ключевым ферментом синтеза нейромедиатора серотонина, играющего важную роль в механизмах регуляции широкого спектра физиологических функций и форм поведения. В данной работе было изучено влияние острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм серотонина и катехоламинов в структурах мозга мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой С1473G в гене *Tph2* и функциональной активностью фермента. Острая алкоголизация приводила к существенному росту экспрессии гена *c-fos* во фронтальной коре и стриатуме мышей В6-1473G и гиппокампе мышей В6-1473С. Введение этанола вызвало снижение индекса метаболизма серотонина в прилежащих ядрах у мышей линии В6-1473С, а также в гиппокампе и стриатуме мышей линии В6-1473G. Также этанол привел к снижению уровня норадреналина в гипоталамусе у мышей линии В6-1473С. Таким образом, полиморфизм С1473G в гене *Tph2* оказывает существенное влияние на вызванные острым введением этанола изменения паттерна экспрессии гена *c-fos* и метаболизма биогенных аминов в мозге.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: этанол, С1473G полиморфизм, триптофангидроксилаза-2, ген раннего ответа *c-fos*, серотонин, дофамин, норадреналин, мышья.

DOI: 10.31857/S0320972523030016, EDN: QVYUTF

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями показано, что дисфункция серотониновой (5-НТ) системы головного мозга вовлечена в патофизиологию широкого спектра нервно-психических заболеваний, в том числе алкогольных расстройств [1–2]. Согласно литературным данным, полиморфизмы в генах, кодирующих ключевые элементы серотониновой системы мозга, такие как рецепторы 5-НТ1В [3], 5-НТ6 [4] и 5-НТ2А [5], транспортер 5-НТ [6], моноаминоксидаза А [7], могут обуславливать нарушения поведения, связанные с потреблением алкоголя.

Триптофангидроксилаза-2 (ТРН2) является ключевым ферментом синтеза 5-НТ в головном

мозге, некоторые полиморфизмы в гене *TRH2* человека ассоциированы с развитием нервно-психических заболеваний, включая депрессию и биполярное аффективное расстройство [8, 9]. Однако участие этого фермента в патогенезе расстройств, связанных с употреблением алкоголя, остается малоизученным. Было показано, что у страдающих алкоголизмом больных повышены уровни мРНК *TRH2* и количества белка ТПГ2 в дорзальных и медиальных ядрах шва среднего мозга [10]. Однако ряд работ, направленных на выявление ассоциаций между различными полиморфизмами в гене *TRH2* и расстройствами поведения, связанными с алкоголизмом, не показали однозначных результатов [11–14]. Таким образом, создание полноценных животных моделей для изучения

Принятые сокращения: ТПГ2 – триптофангидроксилаза-2; DA – дофамин; DOPAC – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 5-Н1АА – 5-гидроксииндолуксусная кислота; 5-НТ – серотонин, НВА – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин; полиморфизм С1473G – замена цитозина на гуанин в положении 1473 гена *Tph2*.

* Адресат для корреспонденции.

роли гена *TRH2* в регуляции эффектов алкоголя на поведение и нервную систему является актуальной задачей.

Полиморфизм С1473G (rs33849125) в гене *Tph2* мыши представляет собой функциональную мутацию, результатом которой является замена аминокислот в белке TRH2 (Pro⁴⁴⁷ на Arg⁴⁴⁷), что, в свою очередь, приводит к двукратному снижению активности фермента и изменениям в поведении [15, 16]. В нашей лаборатории были созданы конгенные линии мышей В6-1473С и В6-1473G, различающиеся только этой однонуклеотидной заменой в гене *Tph2* [16]. Было показано, что полиморфизм С1473G в гене *Tph2* вовлечен в эффекты неблагоприятных факторов среды (острый стресс, содержание при коротком фотопериоде) на нервную систему [17–18]. Кроме этого, нами было обнаружено, что при остром введении этанол по-разному влияет на двигательную активность и тревожное поведение мышей линий В6-1473С и В6-1473G [19], однако, как при этом такое введение алкоголя влияет на центральную нервную систему у животных этих линий, оставалось неизученным. Известно, что однократная инъекция этанола может приводить к изменению метаболизма биогенных моноаминов [20], а также к активации экспрессии генов раннего ответа (например, гена *c-fos*) в мозге [21], при этом было показано влияние генотипа на эти эффекты.

Целью работы было исследование эффектов острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos*, а также содержания серотонина, норадреналина (NA), дофамина (DA) и их метаболитов в структурах мозга мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой С1473G в гене триптофангидроксилазы-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводили на взрослых (10–12 недель) самцах мышей конгенных линий В6-1473С (С/С) и В6-1473G (G/G), полученных в результате 9 возвратных скрещиваний самцов мышей F1[CC57BR(G/G) x C57BL/6(C/C)] с самками линии C57BL/6. Конгенные линии В6-1473С и В6-1473G, полученные на основе линии C57BL/6, различались только однонуклеотидной заменой С1473G в гене *Tph2* [16]. Вес животных составлял $25 \pm 0,7$ г, мышей содержали в пластиковых клетках размером $40 \times 30 \times 15$ см в стандартных условиях (температура 20–22 °С,

относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (14 ч света и 10 ч темноты)) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Генотипы животных, использованных в эксперименте, были дополнительно подтверждены, согласно протоколу генотипирования, описанному ранее [16]. Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023).

Введение этанола и выведение животных из эксперимента. За 2 дня до эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки. Введение раствора этанола (1,6 г/кг; 20%) осуществляли внутривентриально [22], мыши контрольных групп получали инъекцию физраствора; через 40 мин после введения этанола животных декапитировали. Выбор дозы алкоголя и времени его действия проводили по литературным данным, поскольку на грызунах было показано, с одной стороны, увеличение уровня мРНК гена *c-fos* в течение часа при введении этанола в дозах 0,25–4 г/кг [21, 23]. С другой стороны, алкоголь может влиять на метаболизм биогенных аминов при таких параметрах введения [24].

На лду выделяли гипоталамус, фронтальную кору, область прилежащих ядер, гиппокамп, стриатум, черную субстанцию, область среднего мозга. Выбор структур был обусловлен тем, что гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп, стриатум являются чувствительными к нейротоксическому действию этанола на уровне экспрессии генов раннего реагирования [25–26]. Область ядер шва среднего мозга и черная субстанция являются основным местом локализации тел серотониновых [8] и дофаминовых нейронов [27] соответственно. Область прилежащих ядер и стриатум получают главным образом дофаминергические проекции, а гипоталамус, фронтальная кора, область прилежащих ядер, гиппокамп, стриатум – серотонинергические проекции [8, 27].

При выделении структур мозга ориентировались на данные атласа мозга мыши [28]. Для лобной коры использовали следующие координаты: передне-задняя (anterior-posterior, AP) – от +1,6 до +2,8; латеральная (L) – от –2 до +2; толщина среза была около 1,5 мм. Гипоталамус рассекали по координатам AP – от +0,3 до –2,9; L – от –1 до +1; дорсо-вентрально (dorsal-ventral, DV) – от 3,2 до 5,8. Оба гиппокампа были рассечены от AP –0,8 до AP –2,9. Координаты полосатого тела: AP – от +1,3 до –1,0; L – от –2,4 до –3,8 и от +2,4 до +3,8; DV – от 2,4 до 3,8. Координаты области, содержащей

прилежащие ядра: AP – от +1,8 до +1,2; L – от –1,7 до –0,5 и от 0,5 до 1,7; DV – от 4,2 до 3,6. Для среднего мозга делали краниальный срез перед верхним бугорком (AP –3) и каудальный срез перед ромбовидной ямкой (AP –7,3), после чего бугорки удаляли. Черная субстанция рассекалась по координатам: AP – от –2,7 до –3,4; L – от –1,2 до –2,0 и от +1,2 до +2,0; DV – от 3,6 до 4,4.

Проводили две серии введения этанола: образцы тканей первой серии использовали для выделения РНК (число животных в группе составило 6–7 мышей), образцы второй серии – для хроматографического анализа (число животных в группе составило 7–8 мышей). Биоматериал замораживали в жидком азоте и хранили при –70 °С до процедур выделения РНК или ВЭЖХ.

Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Life technologies», США), затем обработана ДНКазой без РНКазной активности (RNase free DNase («Promega», США), 1000 о.е./мл) в соответствии с инструкциями производителей. Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре («Nanodrop», США). РНК была разведена водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранилась при –70 °С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [29, 30].

Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу, описанному ранее [25]. Общую РНК (8 мкл или 1 мкг) смешивали со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкМ стерильного 1М KCl в объеме 16 мкл, денатурировали при 94 °С в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 («БИС-Н», Россия), затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей 0,5 М Tris-HCl, рН 8,3 (0,63 мкл); смесь трифосфатов 4 мМ (3,63 мкл); 0,1 М дитиотреитол (2,25 мкл); 0,1 М MnCl₂ (0,3 мкл); 2000 ед. обратной транскриптазы MuMLV («Биосан», Россия) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Полученную смесь (конечным объемом 31 мкл) инкубировали при 41 °С в течение 60 мин. Синтезированную кДНК хранили при температуре –20 °С.

ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), разработанного в нашей лаборатории [24, 25]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуе-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	T _{отж.} , °С	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>rPol2</i>	F: tgtgacaactccatacaatgc R: ctctcttagtgaatttcgctact	60	194
<i>c-fos</i>	F: aaagagaaggaataaactggag R: cggaacaagaagtcatcaa	58	264

мых генов (табл. 1), разрабатывали на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезировали в компании «Биосан». Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 («Roche Applied Science», Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 95 °С – 3 мин; затем 40 циклов: 95 °С – 10 с; при соответствующей температуре отжига (табл. 1) – 30 с; 72 °С – 30 с. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 и 64 нг/мкл амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – lg P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением «LightCycler 480». Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривой плавления ПЦР-продукта для каждого прогона каждой пары праймеров. Экспрессия гена *c-fos* представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*rPol2*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [17, 29, 30].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Содержание 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА (5-гидроксииндолуксусная кислота), норадреналина, дофамина и его метаболитов ДОРАС (3,4-дигидроксибензилуксусная кислота) и НВА (гомованилиновая кислота) в мозге оценивали при ВЭЖХ по протоколу, описанному ранее [31]. Образцы мозга гомогенизировали в 150 мкл 0,6 М

перхлората (HClO_4), смесь центрифугировали 15 мин при 4°C и 14 000 об./мин для осаждения белка. Затем отбирался супернатант, который разбавляли бидистиллированной водой в 2 раза. Оставшийся осадок хранили при -20°C для последующего определения белка по Брэдфорду [31]. Супернатант (20 мкл) вводили в петлю системы ВЭЖХ, которая состояла из следующих компонентов: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE ИТМ) и проточный элемент из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb) («Antec», Нидерланды), системный контроллер СВМ-20А, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20А и дегазатор DGU-20A5R («Shimadzu Corporation», США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0,6 мл/мин на колонке Luna 5 мкм C18, L \times ID 75 \times 4,6 мм, защищенной предколонкой C8 («Phenomenex», США). Подвижная фаза состояла из 90%-ного буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия («Sigma Aldrich», США), 1,4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты («Chimmed», Россия) и 0,05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты («Sigma Aldrich», США) pH 3,9 и 10% метанола («Chimmed»). Для построения калибровочной кривой внешних стандартов использовали серию растворов, содержащих 0,5; 1 и 2 нг каждого исследуемого вещества («Sigma Aldrich»). Высота пиков была оценена при помощи программы LabSolution LG/GC («Shimadzu», США) и калибрована на соответствующий внешний стандарт. Концентрации биогенных аминов выражали в нг/мг белка.

Статистика. Результаты представляли как $m \pm \text{SEM}$ и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (факторы «генотип» и «этанол») с последующим межгрупповым сравнением методом LSD по Фишеру. Нормальность выборок определяли по критерию Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и критерию Шапиро–Уилка. Достоверными считались различия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена *c-fos*. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,22} = 5,23$; $p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,22} = 9,85$; $p < 0,01$) для уровня мРНК гена *c-fos* во фронтальной коре, при этом эффект генотипа был обнаружен на уровне тенденции ($F_{1,22} = 3,36$, $p = 0,08$). Пост-хок-анализ показал достоверное увеличение экспрессии гена *c-fos* во фронтальной коре после введения этанола только у мышей линии В6-1473G ($p < 0,01$) (рис. 1). Были найдены существенные эффекты генотипа ($F_{1,22} = 24,15$; $p < 0,001$), этанола ($F_{1,22} = 16,22$; $p < 0,001$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,22} = 23,74$; $p < 0,001$) для уровня мРНК гена *c-fos* в гиппокампе. Анализ межгрупповых сравнений показал, что рост уровня экспрессии этого гена, обусловленный введением этанола, наблюдался в гиппокампе только мышей линии В6-1473С ($p < 0,001$) (рис. 1). В стриатуме для уровня мРНК гена *c-fos* был обнаружен

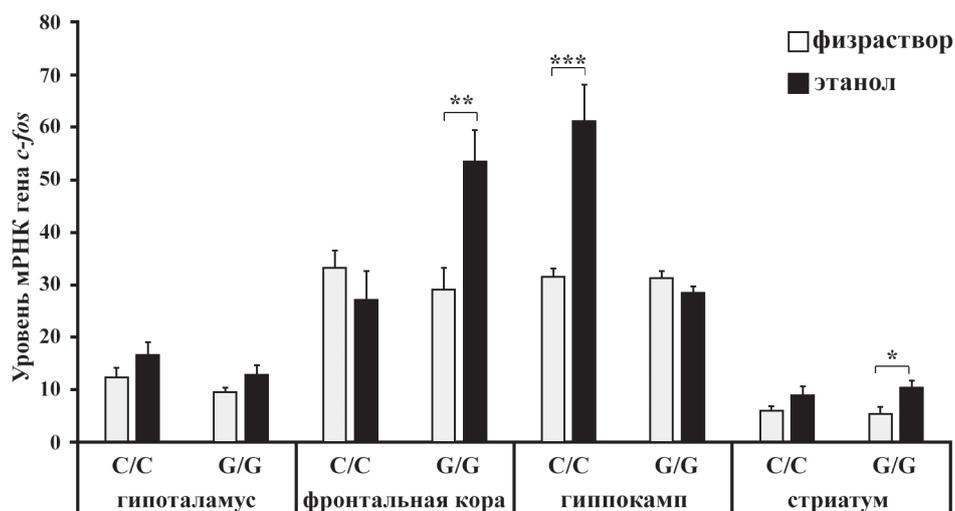


Рис. 1. Влияние острого введения этанола на экспрессию гена *c-fos* в структурах мозга мышей линий В6-1473С (C/C) и В6-1473G (G/G). Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*; $n = 6-7$ животных в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

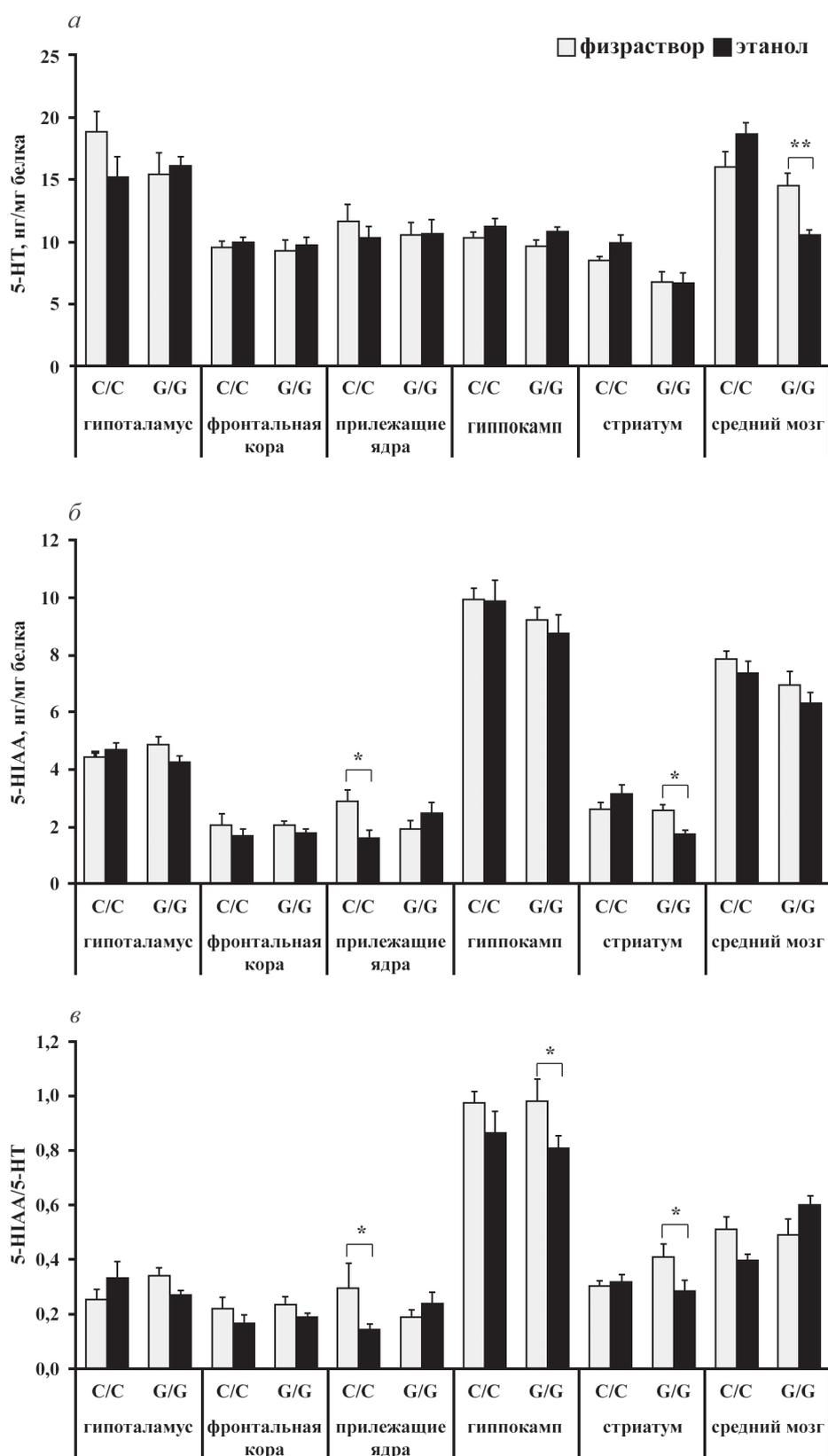


Рис. 2. Влияние острого введения этанола на содержание серотонина (а), его метаболита 5-НІАА (б) и индекс метаболизма серотонина 5-НІАА/5-НТ (в) в структурах мозга мышей линий В6-1473С (С/С) и В6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

эффект этанола ($F_{1,22} = 8,52; p < 0,01$), но не генотипа ($F_{1,22} < 1$) и взаимодействия факторов ($F_{1,22} < 1$). Уровень мРНК гена *c-fos* был выше в стриатуме мышей В6-1473G, подвергавшихся острой алкоголизации по сравнению с мышами контрольной группы ($p < 0,05$). В гипоталамусе для уровня мРНК гена *c-fos* был найден эффект этанола ($F_{1,20} = 4,59; p < 0,05$), эффект генотипа на уровне тенденции ($F_{1,20} = 3,36; p = 0,08$) и не было обнаружено эффекта взаимодействия факторов ($F_{1,22} < 1$). Анализ межгрупповых сравнений не показал никаких различий (рис. 1).

Содержание серотонина и его метаболита 5-Н1АА. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА и индекс метаболизма серотонина 5-Н1АА/5-НТ в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола, представлены в табл. 2. Анализ межгрупповых сравнений показал, что после инъекции алкоголя содержание 5-НТ в среднем мозге снизилось у мышей В6-1473G ($p < 0,01$) и выросло на уровне тенденции ($p = 0,069$) у животных

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень 5-НТ, его метаболита 5-Н1АА и индекс метаболизма серотонина 5-Н1АА/5-НТ в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
5-НТ			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,09; p > 0,05$	$F_{1,25} = 2,14; p > 0,05$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,26} = 1,08; p > 0,05$	$F_{1,26} = 3,71; p = 0,065$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 11,98; p < 0,01$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 1,98; p > 0,05$
Средний мозг	$F_{1,26} = 25,75; p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 12,37; p < 0,01$
5-Н1АА			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 3,57, p = 0,07$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,90, p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,13; p > 0,05$	$F_{1,25} = 5,06; p < 0,05$
Гиппокамп	$F_{1,26} = 2,71; p > 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 11,03; p < 0,01$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 12,19; p < 0,01$
Средний мозг	$F_{1,26} = 6,19; p < 0,05$	$F_{1,26} = 1,99; p > 0,05$	$F_{1,26} < 1$
5-Н1АА/5-НТ			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 4,62; p < 0,05$
Фронтальная кора	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2,69; p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,04; p > 0,05$	$F_{1,25} = 4,66; p < 0,05$
Гиппокамп	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 5,02; p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 1,07; p > 0,05$	$F_{1,26} = 2,04; p > 0,05$	$F_{1,26} = 4,11; p < 0,05$
Средний мозг	$F_{1,26} = 5,83; p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 8,08; p < 0,01$

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

линии В6-1473С (рис. 2, а). Пост-хок-анализом было обнаружено падение уровня 5-НІАА в области прилежащих ядер мышей В6-1473С ($p < 0,05$) и в стриатуме мышей В6-1473G ($p < 0,05$), получавших этанол, по сравнению с контролем (рис. 2, б). Индекс метаболизма серотонина, определяемый как 5-НІАА/5-НТ, снижался для области прилежащих ядер мышей В6-1473С ($p < 0,05$), а также гиппокампа ($p < 0,05$) и стриатума мышей В6-1473G ($p < 0,05$) после введения этанола (рис. 2, в). Примечательно, что для среднего мозга этот показатель на уровне тенденции уменьшился у животных линии В6-1473С ($p = 0,054$) и увеличился у мышей В6-1473G ($p = 0,056$) под действием алкоголя (рис. 1, в).

Содержание дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень DA, его метаболитов DOPAC, HVA и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA в структурах мозга

мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола, представлены в табл. 3. Анализ межгрупповых сравнений не выявил различий ни в одной из исследованных структур по содержанию дофамина у животных обеих линий ($p > 0,05$) (рис. 3, а). Однако в результате пост-хок-анализа было обнаружено, что уровень DOPAC в стриатуме повысился у мышей В6-1473С ($p < 0,05$) и упал – у животных В6-1473G ($p < 0,05$), получавших этанол (рис. 3, б). Кроме этого, анализ межгрупповых сравнений не выявил различий ни в одной из исследованных структур по содержанию HVA и индексу метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA у мышей обеих линий ($p > 0,05$) (рис. 3, в и г).

Содержание норадреналина. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ($F_{1,25} = 7,53; p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,25} = 6,64; p < 0,05$) для уровня норадреналина в гипоталамусе, при этом не было обнаружено эффекта генотипа ($F_{1,25} < 1$).

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «генотип», «этанол» и их взаимодействия на уровень DA, его метаболитов DOPAC, HVA и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA в структурах мозга мышей линий В6-1473С и В6-1473G, подвергавшихся острому введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
DA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 1,91; p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 47,95; p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 2,01; p = 0,055$
DOPAC			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 3,26; p = 0,08$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 1,08; p > 0,05$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 6,38; p < 0,05$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 10,05; p < 0,01$
HVA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 4,05; p = 0,056$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 6,80; p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} = 1,99; p > 0,05$
DOPAC + HVA/DA			
Прилежащие ядра	$F_{1,25} = 1,62; p > 0,05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2,14; p > 0,05$
Черная субстанция	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Стриатум	$F_{1,26} = 14,36; p < 0,001$	$F_{1,26} < 1$	$F_{1,26} < 1$

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

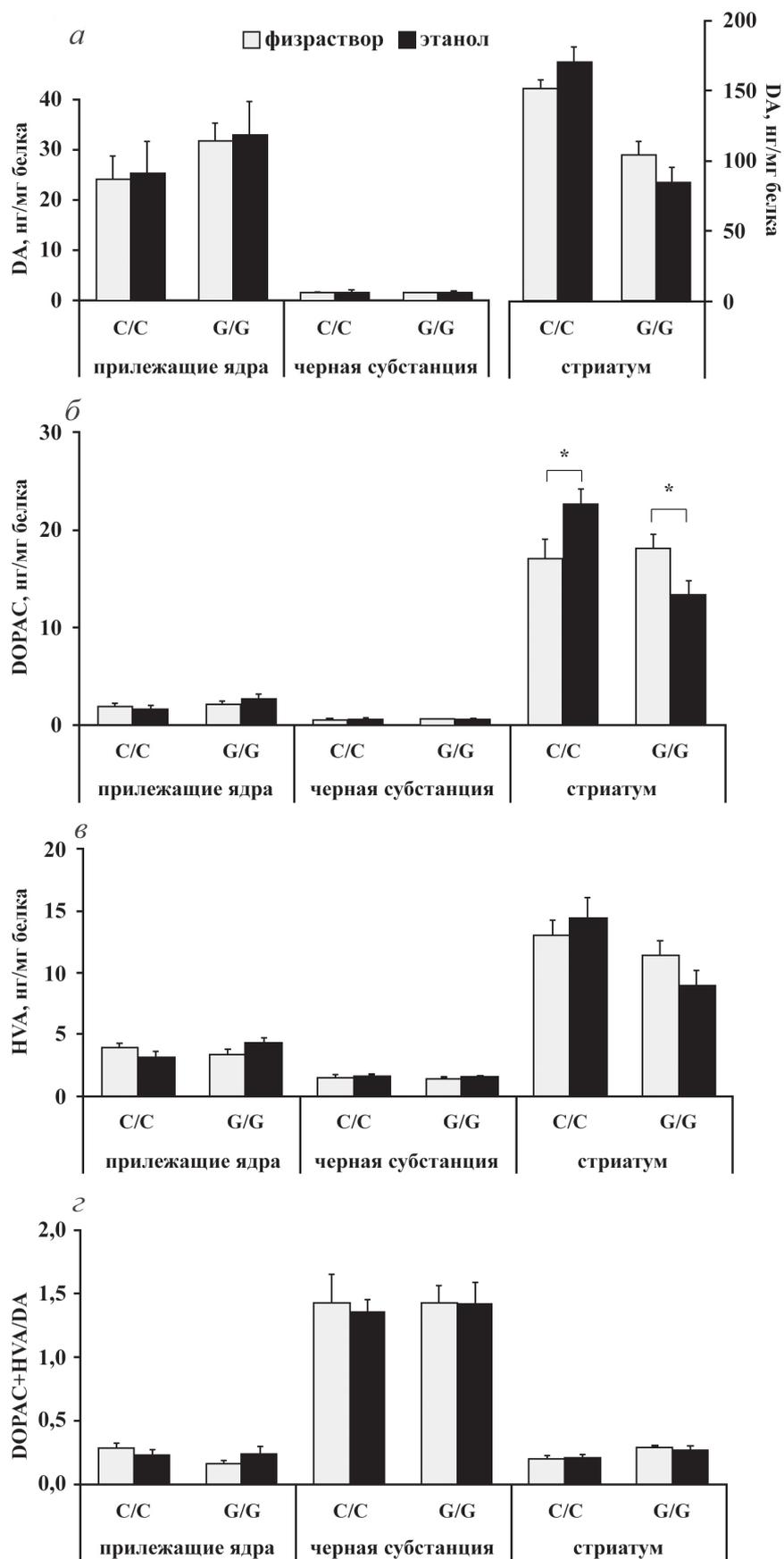


Рис. 3. Влияние острого введения этанола на содержание дофамина (а) и его метаболитов DOPAC (б), HVA (в) и индекс метаболизма дофамина DOPAC + HVA/DA (г) в структурах мозга мышей линий B6-1473C (C/C) и B6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. * $p < 0,05$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

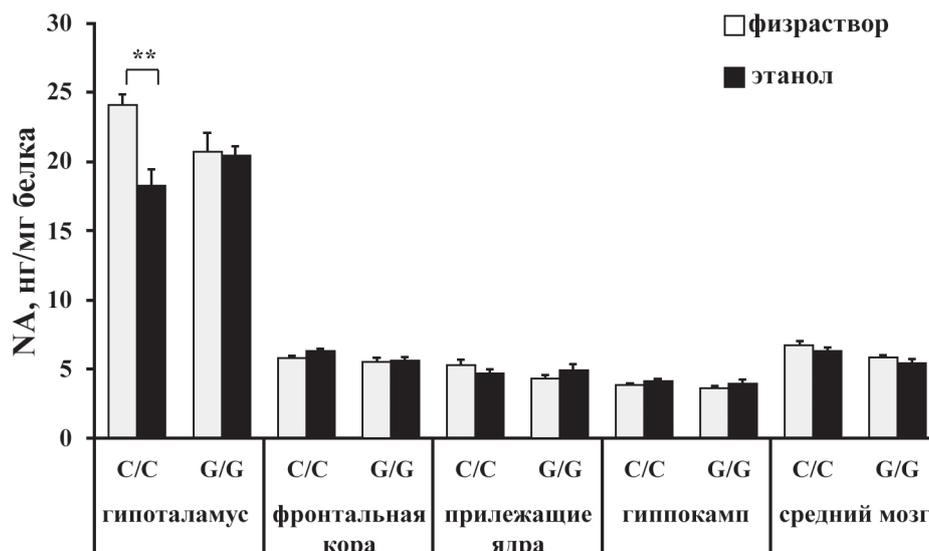


Рис. 4. Влияние острого введения этанола на содержание норадреналина в структурах мозга мышей линий В6-1473С (С/С) и В6-1473G (G/G); $n = 7-8$ животных в группе. ** $p < 0,01$ по сравнению с мышами соответствующей контрольной группы

Пост-хок-анализ показал достоверное снижение уровня этого нейромедиатора в гипоталамусе после введения этанола только у мышей линии В6-1473С ($p < 0,01$) (рис. 4). Не было обнаружено достоверного влияния ни генотипа ($F_{1,26} = 3,93$; $p = 0,058$), ни этанола ($F_{1,26} = 1,98$; $p > 0,05$), ни взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$) для фронтальной коры. Также дисперсионный анализ не выявил эффектов генотипа ($F_{1,25} < 1$), этанола ($F_{1,25} < 1$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,25} = 2,77$; $p > 0,05$) для содержания норадреналина в области прилежащих ядер. Было найдено влияние этанола ($F_{1,26} = 6,52$; $p < 0,05$), но не генотипа ($F_{1,26} = 1,88$; $p > 0,05$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$) для уровня норадреналина в гиппокампе. Анализ межгрупповых сравнений выявил лишь повышение на уровне тенденции содержания этого нейромедиатора в гиппокампе мышей В6-1473G ($p = 0,66$). Для среднего мозга дисперсионным анализом был зафиксирован значительный эффект генотипа ($F_{1,25} = 15,61$; $p < 0,001$), но не этанола ($F_{1,26} = 3,95$; $p = 0,058$) и не взаимодействия этих факторов ($F_{1,26} < 1$). Анализ межгрупповых сравнений не выявил различий между контрольной и опытной группами мышей обеих линий по уровню норадреналина в среднем мозге (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данной работы было выяснение роли полиморфизма С1473G в гене *Trh2* в эф-

фектах острого действия этанола на нервную систему мышей. Для этого мы исследовали влияние острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм биогенных аминов в структурах мозга мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, различающихся однонуклеотидной заменой С1473G в гене *Trh2* и, как следствие, — функциональной активностью фермента [16].

По литературным данным, рост экспрессии гена *c-fos* является показателем нейрональной активности в мозге после воздействий, включая острую алкогольную интоксикацию [25, 32–33]. Увеличение уровня мРНК гена *c-fos* в течение часа может наблюдаться при введении этанола в дозах 0,25–4 г/кг [21, 23]. Однако некоторые исследователи отмечают, что, хотя рост экспрессии гена или белка *c-Fos* может дать важную информацию об активированных путях сигналинга, отрицательный результат не обязательно указывает на то, что активность нейронов не повышалась в результате экспериментальных манипуляций [34]. В нашей работе острое введение этанола по-разному изменило паттерны экспрессии гена *c-fos* в структурах мозга: увеличение мРНК *c-fos* наблюдалось в гиппокампе мышей линии В6-1473С (с нормальной активностью ТПГ2) и во фронтальной коре и стриатуме мышей линии В6-1473G (со сниженной на 50% активностью ТПГ2). Примечательно, что в проведенном ранее эксперименте по изучению эффекта острого (30 мин) эмоционального стресса экспрессия гена *c-fos* значительно увеличивалась у мышей обеих линий и в коре, и в гиппокампе [17].

Различные исследования показали, что острое введение этанола может приводить как к увеличению, так и к уменьшению уровня 5-НТ и его основного метаболита 5-Н1АА во всем мозге и/или различных областях мозга, или вообще не оказывать влияния на эти параметры [35, 36]. Эти противоречия, вероятно, можно объяснить тем, что в описанных работах используются различные виды и линии животных и дизайны экспериментов (дозы этанола, способ его введения, временные интервалы и т.д.). В нашем исследовании больше изменений в метаболизме серотониновой системы мозга после введения этанола демонстрировали мыши линии В6-1473G, у которых наблюдалось достоверное снижение содержания 5-НТ в области ядер шва среднего мозга и метаболита – в стриатуме, а также уменьшение индекса метаболизма 5-НТ в гиппокампе и стриатуме. В то же время у мышей линии В6-1473С наиболее чувствительной к острому действию этанола оказалась область прилежащих ядер, где наблюдалось снижение 5-Н1АА и индекса метаболизма нейромедиатора. Весьма примечательно, что изменения в показателе 5-Н1АА/5-НТ для области ядер шва среднего мозга носили разнонаправленный характер (хотя и на уровне тенденции): уменьшение для мышей В6-1473С и увеличение для мышей В6-1473G. Поскольку область ядер шва среднего мозга является основным местом локализации тел серотониновых нейронов [8], можно предположить связь обнаруженного эффекта введения этанола с особенностями 5-НТ-системы мозга мышей В6-1473G. Важно отметить – несмотря на то что замена цитозина на гуанин в положении 1473 гена *Tph2* приводит к существенному снижению активности фермента ТПГ2, между контрольными группами линий В6-1473G и В6-1473С не было найдено достоверных различий в уровне серотонина, что согласуется с более ранними исследованиями [16, 37]. Этот факт может быть объяснен развитием компенсаторных процессов в серотонинергической системе мозга у мышей В6-1473G (вследствие снижения активности ТПГ2), одним из которых является десенситизация пресинаптических рецепторов 5-НТ_{1А}, локализованных в области ядер шва среднего мозга и осуществляющих регуляцию высвобождения серотонина по принципу «обратной связи» [38]. Механизмы действия острого введения этанола на высвобождение 5-НТ до сих пор остаются не до конца ясны. Считается, что в регуляции этих процессов значительную роль играет активность пресинаптических 5-НТ_{1А}-ауторецепторов [39].

Предположительно, острое введение этанола нарушает у мышей В6-1473G баланс компенсаторных процессов в области среднего мозга, и 5-НТ нейромедиаторная система мышей этой линии оказывается более чувствительной к алкоголю. Это предположение согласуется с данными литературы, демонстрирующими увеличение чувствительности ауторецепторов 5-НТ_{1А} вследствие действия этанола [40]. Нужно отметить, что 30-минутный рестрикционный стресс оказал большее влияние на метаболизм 5-НТ-системы животных линии В6-1473С [17]. Данные этого эксперимента и результаты нашей работы свидетельствуют о разных механизмах регуляции эффектов острого эмоционального стресса и острого введения этанола у мышей линий В6-1473G и В6-1473С на 5-НТ-систему мозга и экспрессию гена раннего ответа *c-fos*.

Другими важными нейромедиаторами, участвующими в контроле этанол-индуцированных эффектов на нервную систему, являются дофамин и норадреналин [41–42]. В данной работе острое введение этанола оказало разнонаправленный эффект на изменение содержания метаболита дофамина DOPAC в стриатуме: обнаружено снижение у мышей В6-1473G, а также повышение – у мышей В6-1473С. Последний результат косвенно может свидетельствовать об увеличении внеклеточного дофамина в области стриатума под действием этанола, что согласуется с данными литературы [43]. Ранее было показано, что полиморфизм С1473G в гене *Tph2* влияет на метаболизм DA-системы мозга, приводя к снижению уровней DA и DOPAC в среднем мозге и стриатуме [44], однако механизм этого влияния остается пока неясным. Вероятно, измененная регуляция дофаминовой нейромедиаторной системы у мышей линии В6-1473G обусловила различие в ответах введения этанола на эту систему мозга у животных обеих линий. Также в нашем исследовании острая алкоголизация привела к падению содержания норадреналина в гипоталамусе, но только у мышей линии В6-1473С, что согласуется с данными о большей чувствительности к острому стрессу животных этой линии [17].

Таким образом, полиморфизм С1473G в гене *Tph2* участвует в регуляции эффектов острого введения этанола на экспрессию гена раннего ответа *c-fos* и метаболизм важнейших нейромедиаторов, таких как серотонин и катехоламины. Результаты настоящей работы говорят о том, что линии мышей В6-1473G и В6-1473С являются перспективными для изучения роли ТПГ2 в регуляции эффектов алкоголя на центральную нервную систему.

Вклад авторов. Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – концепция и руководство работой; Д.В. Базовкина, Д.В. Фурсенко, В.С. Науменко – проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00051). Содержание животных осуществлялось за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры выполняли в соответствии с Международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996) и приказом Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 119н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован 15.08.2016 № 43232). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sari, Y., Johnson, V. R., and Weedman, J. M. (2011) Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **98**, 401-443, doi: 10.1016/B978-0-12-385506-0.00010-7.
- Marcinkiewicz, C. A. (2015) Serotonergic systems in the pathophysiology of ethanol dependence: relevance to clinical alcoholism, *ACS Chem. Neurosci.*, **6**, 1026-1039, doi: 10.1021/cn5003573.
- Lappalainen, J., Long, J. C., Eggert, M., Ozaki, N., Robin, R. W., Brown, G. L., Naukkarinen, H., Virkkunen, M., Linnoila, M., and Goldman, D. (1998) Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations, *Arch. Gen. Psychiatry*, **55**, 989-994, doi: 10.1001/archpsyc.55.11.989.
- Bonasera, S. J., Chu, H. M., Brennan, T. J., and Tecott, L. H. (2006) A null mutation of the serotonin 6 receptor alters acute responses to ethanol, *Neuropsychopharmacology*, **31**, 1801-1813, doi: 10.1038/sj.npp.1301030.
- Wrzosek, M., Jakubczyk, A., Wrzosek, M., Matsumoto, H., Łukaszkiwicz, J., Brower, K. J., and Wojnar, M. (2012) Serotonin 2A receptor gene (HTR2A) polymorphism in alcohol-dependent patients, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 449-453, doi: 10.1016/s1734-1140(12)70787-9.
- Boyce-Rustay, J. M., Wiedholz, L. M., Millstein, R. A., Carroll, J., Murphy, D. L., Daws, L. C., and Holmes, A. (2006) Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **30**, 1957-1965, doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00241.x.
- Popova, N. K., Vishnivetskaya, G. B., Ivanova, E. A., Skrinskaya, J. A., and Seif, I. (2000) Altered behavior and alcohol tolerance in transgenic mice lacking MAO A: a comparison with effects of MAO A inhibitor clorgyline, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **67**, 719-727, doi: 10.1016/s0091-3057(00)00417-2.
- Kulikova, E. A., and Kulikov, A. V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **23**, 655-667, doi: 10.1080/14728222.2019.1634691.
- Zhang, X., Gainetdinov, R. R., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Burch, L. H., Williams, R. B., Schwartz, D. A., Krishnan, K. R., and Caron, M. G. (2005) Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression, *Neuron*, **45**, 11-16, doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.014.
- Bach, H., Arango, V., Kassir, S. A., Tsaava, T., Dwork, A. J., Mann, J. J., and Underwood, M. D. (2014) Alcoholics have more tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein in the dorsal and median raphe nuclei, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **38**, 1894-1901, doi: 10.1111/acer.12414.
- Zupanc, T., Pregelj, P., Tomori, M., Komel, R., and Paska, A. V. (2011) TPH2 polymorphisms and alcohol-related suicide, *Neurosci. Lett.*, **490**, 78-81, doi: 10.1016/j.neulet.2010.12.030.
- Bragatti, J. A., Bandeira, I. C., de Carvalho, A. M., Abujamra, A. L., Leistner-Segal, S., and Bianchin, M. M. (2014) Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene polymorphisms and psychiatric comorbidities in temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **32**, 59-63, doi: 10.1016/j.yebeh.2014.01.007.
- Zill, P., Preuss, U. W., Koller, G., Bondy, B., and Soyka, M. (2007) SNP- and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase 2 gene in alcohol-dependent patients and alcohol-related suicide, *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1687-1694, doi: 10.1038/sj.npp.1301318.
- Gacek, P., Conner, T. S., Tennen, H., Kranzler, H. R., and Covault, J. (2008) Tryptophan hydroxylase 2 gene and alcohol use among college students, *Addict. Biol.*, **13**, 440-448, doi: 10.1111/j.1369-1600.2008.00118.x.
- Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2004) Tryptophan

- hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis, *Science*, **305**, 217, doi: 10.1126/science.1097540.
16. Osipova, D. V., Kulikov, A. V., and Popova, N. K. (2009) C1473G polymorphism in mouse tph2 gene is linked to tryptophan hydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test, *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1168-1174, doi: 10.1002/jnr.21928.
 17. Bazhenova, E. Y., Bazovkina, D. V., Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., Khotskin, N. V., Lichman, D. V., and Kulikov, A. V. (2017) C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the regulation of the reaction to emotional stress, *Neurosci. Lett.*, **640**, 105-110, doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.010.
 18. Bazhenova, E. Y., Fursenko, D. V., Kulikova, E. A., Khotskin, N. V., Sinyakova, N. A., and Kulikov, A. V. (2019) Effect of photoperiodic alterations on depression-like behavior and the brain serotonin system in mice genetically different in tryptophan hydroxylase 2 activity, *Neurosci. Lett.*, **699**, 91-96, doi: 10.1016/j.neulet.2019.01.041.
 19. Bazovkina, D. V., Lichman, D. V., and Kulikov, A. V. (2015) The C1473G polymorphism in the Tryptophan hydroxylase-2 gene: involvement in ethanol-related behavior in mice, *Neurosci. Lett.*, **589**, 79-82, doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.043.
 20. Boone, E. M., Cook, M. N., Hou, X., and Jones, B. C. (1997) Sex and strain influence the effect of ethanol on central monoamines, *J. Stud. Alcohol*, **58**, 590-599, doi: 10.15288/jsa.1997.58.590.
 21. Hitzemann, B., and Hitzemann, R. (1997) Genetics ethanol and the Fos response: a comparison of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **21**, 1497-1507.
 22. Raymond, J. S., Wilson, B. B., Tan, O., Gururajan, A., and Bowen, M. T. (2019) Acute alcohol exposure dose-dependently alleviates social avoidance in adolescent mice and inhibits social investigation in adult mice, *Psychopharmacology*, **236**, 3625-3639, doi: 10.1007/s00213-019-05335-8.
 23. Ogilvie, K. M., Lee, S., and Rivier, C. (1998) Divergence in the expression of molecular markers of neuronal activation in the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus evoked by alcohol administration via different routes, *J. Neurosci.*, **18**, 4344-4352.
 24. Nevo, I., and Hamon, M. (1995) Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism, *Neurochem. Int.*, **26**, 305-342, doi: 10.1016/0197-0186(94)00139-1.
 25. Vilpoux, C., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., and Naassila, M. (2009) Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **33**, 945-969, doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00916.x.
 26. Abrahao, K. P., Salinas, A. G., and Lovinger, D. M. (2017) Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits, *Neuron*, **96**, 1223-1238, doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.032.
 27. Ford, C. P. (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission, *Neuroscience*, **282**, 13-22, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025.
 28. Slotnick, B. M., and Leonard, C. M. (1975) *A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain*, U. S. Dept. of Health, Education and Welfare, Rockville, 174 p.
 29. Naumenko, V. S., and Kulikov, A. V. (2006) Quantitative assay of 5-HT_{1A} serotonin receptor gene expression in the brain, *Mol. Biol. (Mosk)*, **40**, 37-44, doi: 10.1134/s0026893306010079.
 30. Naumenko, V. S., Osipova, D. V., Kostina, E. V., and Kulikov, A. V. (2008) Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain, *J. Neurosci. Methods*, **170**, 197-203, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.008.
 31. Bazovkina, D., Naumenko, V., Bazhenova, E., and Kondaurova, E. (2021) Effect of central administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on behavior and brain monoamine metabolism in new recombinant mouse lines differing by 5-HT_{1A} receptor functionality, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11987, doi: 10.3390/ijms222111987.
 32. Robinson, S. L., Dornellas, A., Burnham, N. W., Houck, C. A., Luhn, K. L., Bendrath, S. C., Companion, M. A., Brewton, H. W., Thomas, R. D., Navarro, M., and Thiele, T. E. (2020) Distinct and overlapping patterns of acute ethanol-induced c-Fos activation in two inbred replicate lines of mice selected for drinking to high blood ethanol concentrations, *Brain Sci.*, **10**, 988, doi: 10.3390/brainsci10120988.
 33. Smith, M. L., Li, J., Cote, D. M., and Ryabinin, A. E. (2016) Effects of isoflurane and ethanol administration on c-Fos immunoreactivity in mice, *Neuroscience*, **316**, 337-343, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.047.
 34. McBride, W. J. (2002) Central nucleus of the amygdala and the effects of alcohol and alcohol-drinking behavior in rodents, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 509-515, doi: 10.1016/s0091-3057(01)00680-3.
 35. LeMarquand, D., Pihl, R. O., and Benkelfat, C. (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies, *Biol. Psychiatry*, **36**, 395-421, doi: 10.1016/0006-3223(94)91215-7.
 36. Badawy, A. A. (2002) Tryptophan metabolism in alcoholism, *Nutr. Res. Rev.*, **15**, 123-152, doi: 10.1079/NRR200133.
 37. Siesser, W. B., Zhang, X., Jacobsen, J. P., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2010) Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6 and BALB/c congenic mice, *Neurosci. Lett.*, **481**, 6-11, doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.035.
 38. Berger, S. M., Weber, T., Perreau-Lenz, S., Vogt, M. A., Gartside, S. E., Maser-Gluth, C., Lan-

- fumey, L., Gass, P., Spanagel, R., and Bartsch, D. (2012) A functional Tph2 C1473G polymorphism causes an anxiety phenotype via compensatory changes in the serotonergic system, *Neuropsychopharmacology*, **37**, 1986-1998, doi: 10.1038/npp.2012.46.
39. Kirby, L. G., Zeeb, F. D., and Winstanley, C. A. (2011) Contributions of serotonin in addiction vulnerability, *Neuropharmacology*, **61**, 421-432, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.03.022.
40. Kelaï, S., Renoir, T., Chouchana, L., Saurini, F., Hanoun, N., Hamon, M., and Lanfumey, L. (2008) Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors in C57BL/6J mice, *J. Neurochem.*, **107**, 1660-1670, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05733.x.
41. Melis, M., Diana, M., Enrico, P., Marinelli, M., and Brodie, M. S. (2009) Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress, *Alcohol*, **43**, 531-539, doi: 10.1016/j.alcohol.2009.05.004.
42. Weinshenker, D., and Schroeder, J. P. (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction, *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1433-1451, doi: 10.1038/sj.npp.1301263.
43. Tang, A., George, M. A., Randall, J. A., and Gonzales, R. A. (2003) Ethanol increases extracellular dopamine concentration in the ventral striatum in C57BL/6 mice, *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **27**, 1083-1089, doi: 10.1097/01.ALC.0000075825.14331.65.
44. Sinyakova, N. A., Bazhenova, E. Y., Kulikova, E. A., Fursenko, D. V., and Kulikov, A. V. (2020) Effect of the C1473G polymorphic variant of the tryptophan hydroxylase 2 gene and photoperiod length on the dopamine system of the mouse brain [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk)*, **54**, 60-68, doi: 10.31857/S0026898420010140.

THE ROLE OF C1473G POLYMORPHISM IN TRIPTOPHANHYDROXYLASE-2 GENE IN THE ACUTE ETHANOL EFFECTS ON *c-fos* GENE EXPRESSION AND METABOLISM OF BIOGENIC AMINES IN BRAIN OF MICE

D. V. Bazovkina*, D. V. Fursenko, V. S. Naumenko, and A. V. Kulikov

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: daryabazovkina@gmail.com*

Tryptophan hydroxylase-2 is a key enzyme in the synthesis of the neurotransmitter serotonin, which plays an important role in the mechanisms of regulation of a wide range of physiological functions and behaviors. In this work, we studied the effect of acute ethanol administration on the expression of the *c-fos* early response gene and the metabolism of serotonin and catecholamines in the brain structures of B6-1473C and B6-1473G congenic mice, which differ in the C1473G single-nucleotide substitution in the Tph2 gene and enzyme activity. Acute alcoholization led to a significant increase in *c-fos* gene expression in the frontal cortex and striatum of B6-1473G mice and the hippocampus of B6-1473C mice. The introduction of ethanol caused a decrease in the index of serotonin metabolism in the nucleus accumbens in B6-1473C mice, as well as in the hippocampus and striatum of B6-1473G mice. Also, ethanol led to a decrease in the level of norepinephrine in the hypothalamus in B6-1473C mice. Thus, the C1473G polymorphism in the Tph2 gene has a significant effect on changes in the *c-fos* gene expression pattern and metabolism of biogenic amines in the brain induced by acute ethanol administration.

Keywords: ethanol, C1473G polymorphism, tryptophan hydroxylase-2, *c-fos* gene, serotonin, dopamine, norepinephrine, mouse