

## ВЛИЯНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ И МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МОЗГА МЫШЕЙ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2023 г. Д. В. Базовкина<sup>1</sup> \*, Е. М. Кондаурова<sup>1</sup>, С. Н. Адонина<sup>1</sup>,  
Е. Ю. Баженова<sup>1</sup>, А. В. Куликов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 06.02.2023 г.

После доработки 04.04.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Депрессивные расстройства и алкогольная зависимость являются одними из самых распространенных психопатологий. Известно, что нарушения функционирования серотонинергической и дофаминергической систем мозга лежат в патогенезе алкоголизма и аффективных расстройств. В данной работе изучали эффекты субхронического введения этанола (1.5 г/кг, 20%, 10 дней, внутривентрикулярно) на поведение, функциональную активность рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> и экспрессию генов, кодирующих серотониновые (*Htr1a*, *Htr2a*) и дофаминовые (*Drd1*, *Drd2*) рецепторы, в структурах мозга у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и у мышей родительской “недепрессивной” линии СВА. Показано, что алкоголизация привела к увеличению двигательной активности у животных обеих линий и повышению уровня исследовательского поведения у мышей линии ASC. Не было найдено значимого влияния этанола на социальное и депрессивноподобное поведение. Функциональная активность рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> (определяемая по реакции на введение соответствующих агонистов этих рецепторов) снижалась под действием этанола только у животных линии ASC. У мышей родительской линии СВА, получавших алкоголь, было обнаружено снижение экспрессии гена серотонинового 5-HT<sub>2A</sub>-рецептора во фронтальной коре. В то же время этанол привел к повышению уровней мРНК гена 5-HT<sub>1A</sub>-рецептора в стриатуме и гена DRD1-рецептора в гипоталамусе, а также снижению экспрессии гена DRD2-рецептора в гиппокампе у мышей линии ASC. Таким образом, изменения в серотонинергической и дофаминергической системах мозга под действием этанола оказались более значительными у мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивноподобному поведению.

*Ключевые слова:* этанол, серотонин, дофамин, рецепторы, депрессивноподобное поведение, мозг, мышь

DOI: 10.31857/S1027813323030044, EDN: YUKSYI

### ВВЕДЕНИЕ

Депрессивные расстройства и алкоголизм представляют собой серьезные психопатологии, распространенные во всем мире [1, 2]. При этом сочетание алкоголизма и депрессии связано с большей тяжестью и худшим прогнозом для обоих расстройств [3]. Было показано, что с одной стороны, алкоголизм в анамнезе является фактором риска депрессивных расстройств, а с другой стороны – у больных с первичной депрессией выше вероятность развития алкоголизма [1, 5, 6]. Следовательно, важной и актуальной задачей является создание адекватных моделей на живот-

ных для изучения этиологии и лечения сочетанных депрессивных расстройств и алкогольной зависимости.

Общим в патогенетической основе алкоголизма и депрессии является недостаточность серотонинергической (5-HT) и дофаминергической (DA) нейротрансмиссии [6–9]. Согласно литературным данным, ключевые элементы HT- и DA-систем мозга, такие как серотониновые 5-HT<sub>1A</sub>- и 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторы [10, 11], а также дофаминовые DRD1- и DRD2-рецепторы [7, 12], могут играть значительную роль в развитии депрессивных нарушений поведения (в том числе, связанных с потреблением алкоголя) и у человека, и у животных.

Линия мышей ASC была создана в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН в процессе длительной селекции гибридов ката-

Принятые сокращения: 5-HT – серотонин, DA – дофамин.

\* Адресат для корреспонденции: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10, e-mail: daryabazovkina@gmail.com.

лептической линии CBA и некаталептической линии AKR на повышенную предрасположенность к каталепсии [13, 14]. У мышей линии ASC проявились депрессивноподобные характеристики поведения, такие как снижение двигательной и исследовательской активностей, усиление показателей депрессивноподобного поведения в тестах “принудительное плавание” и “подвешивание за хвост” [13], нарушения в иммунной системе [15]. Кроме этого, было обнаружено, что у мышей линии ASC содержание в структурах мозга нейротрофического фактора BDNF, играющего важную роль в нейрогенезе, значительно ниже, чем у мышей “недепрессивной” линии CBA [16], что согласуется с данными о дефиците BDNF при расстройствах депрессивного спектра [17]. Введение мышам ASC экзогенного BDNF или антидепрессанта флуоксетина приводило к нормализации показателей поведения и 5-HT системы мозга [18, 19].

Ранее было показано, что введение этанола (1.5 г/кг, 20%) в течение 14 дней привело к повышению уровня предшественника proBDNF во фронтальной коре мышей ASC и снижению уровня BDNF в гиппокампе мышей линии CBA [16]. Это свидетельствует о том, что предрасположенность к депрессивноподобному поведению может модулировать эффекты продолжительной алкоголизации на ЦНС. Несмотря на то, что к настоящему времени проведено немало исследований по влиянию этанола на моноаминергические системы мозга, практически нет данных по влиянию хронической алкоголизации на 5-HT- и DA-нейромедиаторные системы, полученных с использованием генетических моделей депрессивноподобного поведения.

Целью работы было исследование эффектов длительной алкоголизации на поведение, функциональную активность рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> и уровни mPFC генов, кодирующих 5-HT- и DA-рецепторы, в структурах мозга у мышей линии ASC с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и у мышей родительской “недепрессивной” линии CBA.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Опыты проводили на взрослых (10–12 нед.) самцах мышей линий CBA ( $n = 16$ ) и ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) ( $n = 14$ ). Вес животных составлял  $25 \pm 0.7$  г, мыши содержались в пластиковых клетках размером  $40 \times 30 \times 15$  см в стандартных условиях (температура 20–22°C, относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (14 ч света и 10 ч темноты)) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Исследование было выполнено на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ Институт цитологии и генетики

СО РАН (RFMEFI62119X0023). 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).

**Введение этанола и выведение животных из эксперимента.** Алкоголизацию проводили посредством внутрибрюшинного введения раствора этанола (1.5 г/кг, 20%, в качестве растворителя использовали физиологический раствор) в течение 10 дней. Выбор дозы алкоголя и времени его действия основывался на наших ранних исследованиях, в которых было показано, что такой способ алкоголизации оказывает генотип-зависимое влияние на экспрессию нейротрофического фактора BDNF и его предшественника proBDNF у мышей CBA и ASC [16, 20]. Данный способ введения позволяет оценить чувствительность к введению этанола на ранних этапах алкоголизации. Мышам контрольной группы вводили растворитель. За день до тестирования поведения мышей рассаживали в индивидуальные клетки, чтобы исключить проявление групповых эффектов. Затем последовательно каждый день проводили тесты поведения и оценку функциональной активности рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub>. Через день после тестирования функциональной активности рецепторов 5-HT<sub>2A</sub> (на 17-ый день алкоголизации) животных декапитировали, на льду выделяли гипоталамус, фронтальную кору, гиппокамп, стриатум, область среднего мозга. Выбор структур был обусловлен тем, что гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп, стриатум получают серотонинергические и дофаминергические проекции, а область ядер шва среднего мозга является основным местом локализации тел серотониновых нейронов [19, 20]. Образцы ткани замораживали в жидком азоте и хранили при  $-80^\circ\text{C}$  до процедуры выделения РНК.

**Тесты поведения.** Тест “открытое поле” проводили в аппарате, состоящем из круглой арены (40 см в диаметре), окруженной пластиковым бортиком 25 см с инвертированным освещением (двумя галогенными лампами по 12 Вт, расположенными на 40 см ниже нее) и системой компьютерной регистрации “EthoStudio” (Россия). Мышь помещали около бортика и в течение 5 мин регистрировали пройденный путь (м) и время (%) пребывания в центре арены (20 см в диаметре) [21, 22].

**Социальное поведение** тестировали в модели “резидент–интродер”: в домашнюю клетку экспериментального самца подсаживали ювенильного самца линии Valb/c (возраст 4 нед.). В течение

10 мин с помощью программы EthoStudio фиксировали продолжительность социальных контактов (обнюхивание головы, тела интродера, груминг и следование за ним) [23].

В тесте “подвешивание за хвост” животное подвешивали за хвост с помощью специальной клейкой ленты к установке на высоте 40 см. Поведение животного регистрировали с помощью программы EthoStudio в течение 6 мин. Оценивали уровень депрессивноподобного поведения по времени неподвижности животного [24].

**Функциональную активность 5-HT<sub>1A</sub>-рецепторов** оценивали у мышей как было описано ранее [25] – по интенсивности гипотермической реакции на введение агониста этого типа рецепторов 8-ОН-DPAT (8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetraline, Sigma; 1.0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). Температуру тела измеряли электронным термометром KJT (Hanna Instruments, Singapore) с помощью ректальных датчиков для мышей (Physitemp Instruments) до и через 20 мин после введения препарата.

**Функциональную активность 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов** оценивали как было описано ранее [25] – по числу встряхиваний головой через 5 мин после введения агониста этого типа рецепторов DOI (1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, Sigma; 1.0 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). Тест проводили в домашней клетке животного и считали количество встряхиваний головой в течение 20 мин.

**Выделение общей РНК.** Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, USA), 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°C. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [26, 27].

**Реакция обратной транскрипции.** Реакцию проводили по протоколу, описанному ранее [26, 27]. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана с 8 мкл смеси, содержащей 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ), 5.65 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом и 2.25 мкл стерильного 1 М KCl, денатурирована при 94°C в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Биосан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (pH 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4 мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М MnCl<sub>2</sub> (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирикарбонатом. Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41°C в течение 60 мин.

Синтезированная кДНК хранилась при температуре –20°C.

**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 [26, 27]. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых 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” (Новосибирск, Россия). Для проведения ПЦР в реальном времени 1 мкл кДНК смешивали с универсальным набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (R-402, Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 (Roche Applied Science, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 95°C, 1 цикл; 10 с при 95°C, 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°C, 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали в отдельных пробирках (одновременно с образцами кДНК) и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – lgP (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 каждого исследуемого гена была представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы 2 (*rPol2*), выполняющей функцию внутреннего стандарта [26, 27].

**Статистика.** Результаты представляли как  $m \pm SEM$  и сравнивали в программе STATISTICA 8.0 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (факторы “генотип” и “этанол”) с последующим с 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

**Поведение.** Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ( $F_{1,26} = 16.29$ ;  $p < 0.001$ ),

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

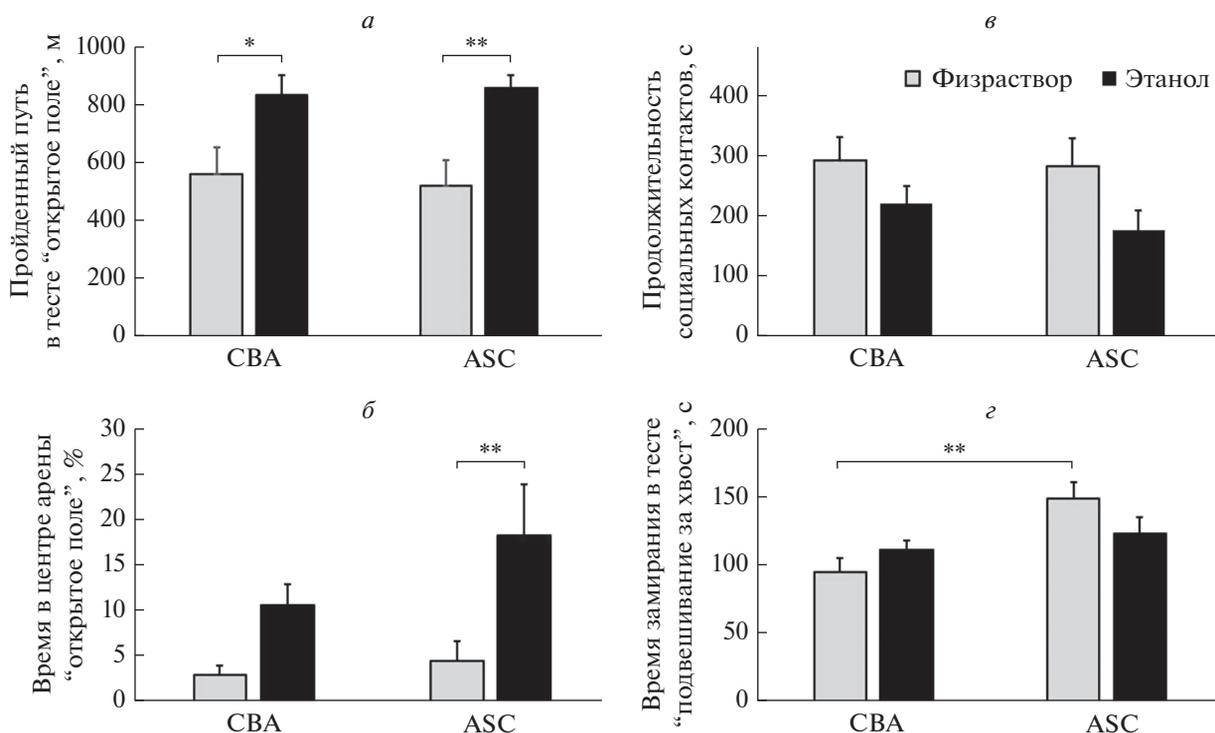
Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$ , °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>rPol2</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttcgctact-3'	60	194
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtgacctgtttatcgcctgc-3' R 5'-gtagtctatagggtcgggtgattgc-3'	62	109
<i>Htr2a</i>	F 5'-agaagccacctgtgtgtga-3' R 5'-ttgctcattgctgatggact-3'	61	169
<i>Drd1</i>	F 5'-ggaaacctgtcgaatgctctc-3' R 5'-ccagccaaaccacacaatacatcg-3'	64	222
<i>Drd2</i>	F 5'-tccgccacttcttgacatacattg-3' R 5'-cccattccacagcctccttaag-3'	65	203

но не генотипа ( $F_{1,26} < 1$ ) и не взаимодействия факторов ( $F_{1,26} < 1$ ) на длину пройденного пути в тесте “открытое поле”. Анализ межгрупповых сравнений показал, что введение этанола привело к увеличению этого параметра как у мышей линии СВА ( $p < 0.05$ ), так и у животных линии АС ( $p < 0.01$ ) (рис. 1а). Также двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ( $F_{1,26} = 10.43$ ;  $p < 0.01$ ), но не генотипа ( $F_{1,26} = 1.87$ ,  $p > 0.05$ ) и не взаимодействия факторов ( $F_{1,26} < 1$ ) на время, проведенное в центре арены “открытое поле”. Анализ межгрупповых сравнений показал, что получение этанола привело к увеличению этого параметра у мышей линии АС ( $p < 0.01$ ), но не у животных СВА (рис. 1б). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект этанола ( $F_{1,26} = 5.56$ ;  $p < 0.05$ ), но не генотипа ( $F_{1,26} < 1$ ) и не взаимодействия факторов ( $F_{1,26} < 1$ ) на продолжительность социальных контактов в тесте социального взаимодействия. Анализ межгрупповых сравнений показал, что этот показатель снизился у мышей линии АС, получавших алкоголь, но лишь на уровне тенденции ( $p = 0.07$ ) (рис. 1в). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ( $F_{1,26} = 9.97$ ;  $p < 0.01$ ) и взаимодействия факторов ( $F_{1,26} = 4.97$ ;  $p < 0.05$ ), но не этанола ( $F_{1,26} < 1$ ) на продолжительность замирания в тесте “подвешивание за хвост”. Апостериорный анализ выявил только то, что мыши линии АС контрольной группы демонстрировали более высокое время замирания по сравнению с контрольными животными линии СВА ( $p < 0.01$ ) (рис. 1з).

**Функциональная активность рецепторов.** Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ( $F_{1,24} = 6.79$ ;  $p < 0.05$ ) и этанола ( $F_{1,24} = 4.66$ ;  $p < 0.05$ ), но не взаимодействия факторов ( $F_{1,24} = 1.51$ ,  $p > 0.05$ ) на величину снижения температуры тела после введения агониста 5-НТ1А-

рецептора 8-ОН-ДРАТ. Анализ межгрупповых сравнений показал, что эта разница между начальной и конечной температурами уменьшилась только у мышей линии АС, получавших алкоголь ( $p < 0.05$ ) (рис. 2а). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ( $F_{1,26} = 4.30$ ;  $p < 0.05$ ), но не этанола ( $F_{1,26} = 1.59$ ,  $p > 0.05$ ) и не взаимодействия факторов ( $F_{1,26} = 3.38$ ,  $p = 0.08$ ) на число встряхиваний головой, вызванных введением агониста 5-НТ2А-рецептора DOI. Анализ межгрупповых сравнений показал, что этот параметр под действием этанола снизился только у мышей линии АС ( $p < 0.05$ ) (рис. 2б).

**Экспрессия генов.** Результаты дисперсионного анализа влияния факторов “генотип”, “этанол” и их взаимодействия на уровни мРНК генов серотониновых рецепторов *Htr1a*, *Htr2a* и дофаминовых рецепторов *Drd1*, *Drd2* в структурах мозга мышей линий СВА и АС, подвергавшихся введению этанола, представлены в табл. 2. Анализ межгрупповых сравнений показал, что под действием алкоголя увеличилась экспрессия гена *Htr1a* в стриатуме мышей линии АС ( $p < 0.05$ ). В то же время уровень мРНК гена *Htr2a* во фронтальной коре упал у мышей линии СВА, получавших этанол, по сравнению с соответствующим контролем ( $p < 0.05$ ) (рис. 3). Также следует отметить, что экспрессия этого гена в стриатуме была выше у животных линии АС по сравнению с контрольными мышами линии СВА ( $p < 0.05$ ) (рис. 3). Анализ межгрупповых сравнений обнаружил, что мыши линии АС, подвергавшиеся действию этанола, демонстрировали рост мРНК гена *Drd1* в гипоталамусе и падение мРНК гена *Drd2* в гиппокампе по сравнению с соответствующей контрольной группой (рис. 4). Также апостериорный анализ показал, что экспрессия гена *Drd2* в стриатуме была выше у животных линии



**Рис. 1.** Влияние субхронического введения этанола на длину пройденного пути (а), продолжительность времени в центре в тесте “открытое поле” (б), продолжительность социальных контактов в тесте социального взаимодействия (в) и продолжительность замирания в тесте “подвешивание за хвост” (г) у мышей линий CBA и ASC.  $N = 7-8$  животных в группе. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

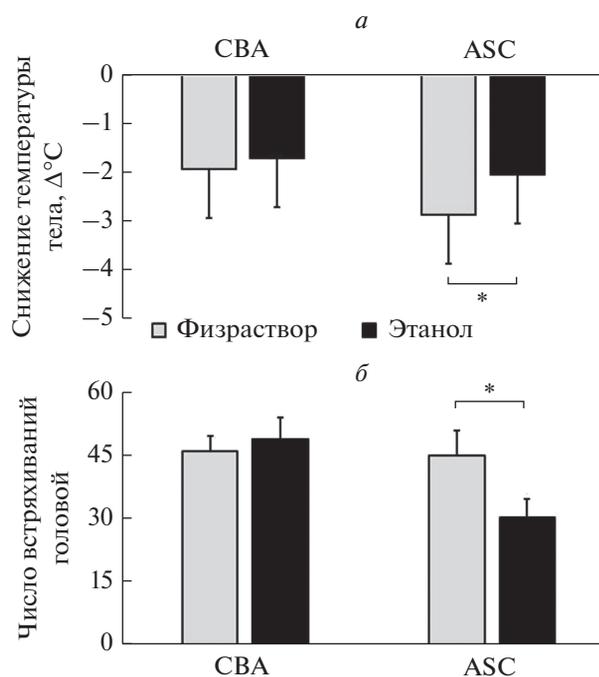
ASC по сравнению с контрольными мышами линии CBA (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе впервые было проведено комплексное сравнение влияния субхронического введения этанола на поведение, экспрессию генов 5-HT- и DA-рецепторов структурах мозга и функциональную активность рецепторов 5-HT1A и 5-HT2A у мышей с наследственной предрасположенностью к депрессивноподобному поведению и мышей “недепрессивной” линии. Алкоголизация привела к повышению двигательной активности, измеряемой по длине пройденной пути в тесте “открытое поле”, у животных обеих линий. Однако только у мышей ASC введение этанола привело к увеличению времени, проведенному в центре арены “открытое поле”, что можно интерпретировать как повышение исследовательской активности [28] и ослабление тревожноподобного поведения в этом тесте [29]. Литературные данные по влиянию алкоголизации у грызунов на поведение в “открытом поле” неоднозначны. С одной стороны, ряд работ указывает на снижение двигательной активности и повышение тревожности вследствие длительного приема этанола, например, у взрослых самцов мышей линии

C57BL/6J, характеризующейся высоким предпочтением к этанолу [30, 31]. С другой стороны, показано, что у взрослых крыс линии Lewis хроническая алкоголизация (6 мес.) привела к повышению двигательной активности и снижению тревожности в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” [32], что согласуется с нашими результатами. Примечательно, что крысы линии Lewis отличаются повышенной чувствительностью к наркотическим веществам и воспалительным агентам [33].

Что касается влияния алкоголизации на уровень социального поведения у грызунов, то данные по этому вопросу также противоречивы. Есть работы, указывающие на снижение социальных контактов после длительной экспозиции этанолу: например, трехнедельное предьявление алкоголя крысам линии Sprague-Dawley в раннем подростковом периоде (25–45 дней) привело к уменьшению социальных контактов с незнакомым партнером у этих животных в возрасте 10 нед. [34]. Однако в других исследованиях длительная алкоголизация не изменяла параметры социального поведения, например, у самцов линии C57BL/6J, получавших этанол в течение 1 мес. [35]. В нашей работе продолжительность социальных контактов уменьшалась под действием этанола на уровне тенденции только у мышей ASC ( $p = 0.07$ ). Веро-



**Рис. 2.** Влияние субхронического введения этанола на функциональную активность 5-НТ<sub>1А</sub>-рецепторов (а) и 5-НТ<sub>2А</sub>-рецепторов (б) у мышей линий СВА и АСВ. Функциональную активность 5-НТ<sub>1А</sub>-рецепторов оценивали по интенсивности гипотермической реакции на введение агониста 8-ОН-ДРАТ (1.0 мг/кг, внутривенно). Функциональную активность 5-НТ<sub>2А</sub>-рецепторов оценивали по числу встряхиваний головой после введения агониста DOI (1.0 мг/кг, внутривенно).  $N = 7-8$  животных в группе. \* $p < 0.05$ .

ятно, более продолжительное введение алкоголя могло бы привести к статистически достоверному снижению социального поведения у этих животных.

В нашем исследовании алкоголизация не оказала эффекта на депрессивноподобное поведение у мышей обеих линий, определяемое по продолжительности замирания в тесте “подвешивание за хвост”, в то же время этот показатель у контрольных мышей линии АСВ был выше, чем у животных СВА контрольной группы, что согласуется с нашими ранними результатами [13]. Ряд работ указывают на развитие признаков депрессивноподобного поведения у грызунов после длительной алкоголизации [36–38], однако некоторыми исследователями сообщается, что введение этанола может приводить к антидепрессантным эффектам, так, например, 10-дневное потребление 10% этанола снизило время неподвижности в тесте “принудительное плавание” у крыс, полученных в результате селекции на высокое предпочтение этанола (Sardinian alcohol-preferring rats) [39]. Таким образом, данные литературы и нашей работы указывают на значительный вклад генотипа в поведенче-

ские эффекты хронической и субхронической алкоголизации.

Многочисленными исследованиями было показано, что потребление этанола влияет на регуляцию активности 5-НТ системы мозга. Среди ключевых элементов этой нейромедиаторной системы особый интерес представляют 5-НТ<sub>1А</sub>- и 5-НТ<sub>2А</sub>-рецепторы в силу того, что они участвуют в контроле поведения широкого спектра и функций ЦНС [40].

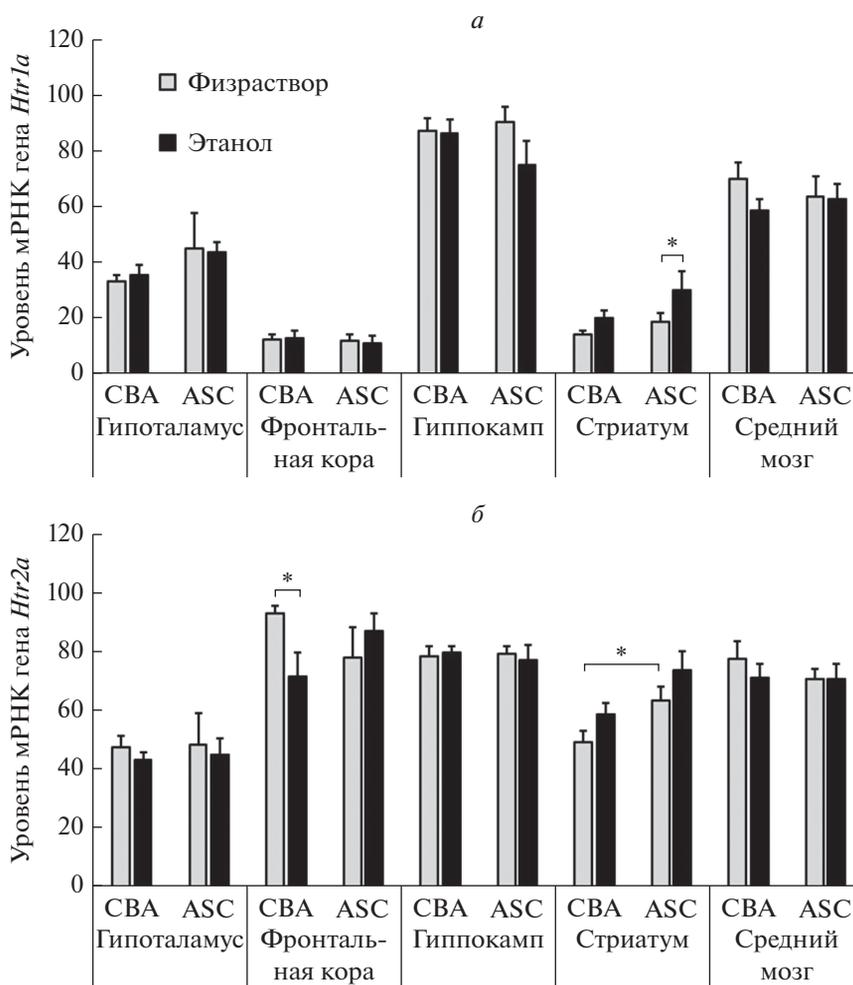
Показано, что вызванная введением 8-ОН-ДРАТ гипотермия отражает у мышей функцию 5-НТ<sub>1А</sub>-ауторецепторов, которые преимущественно локализованы в области среднего мозга [41]. Снижение этого показателя у мышей АСВ согласуется с данными о гиперсенситизации 5-НТ<sub>1А</sub>-ауторецепторов у мышей линии С57В1/6 на фоне долговременной алкоголизации, которая, в свою очередь, может быть причиной дефицита нейротрансмиссии 5-НТ [42]. Мы не показали эффекта введения этанола на уровни мРНК гена *Htr1a* в таких структурах, как гипоталамус, фронтальная кора, гиппокамп и средний мозг у животных обеих исследованных линий, что совпадает с нашими ранними результатами по влиянию хронической алкоголизации на экспрессию этого гена у мышей линии С57В1/6 [43]. Однако по данным других авторов долговременная экспозиция этанолу может приводить, например, к снижению мРНК гена *Htr1a* в гиппокампе крыс [44] или увеличению плотности 5-НТ<sub>1А</sub>-рецепторов в гиппокампе обезьян (без изменений на транскрипционном уровне) [45]. В нашей работе был обнаружен рост экспрессии гена *Htr1a* только в стриатуме мышей линии АСВ, получавших алкоголь. Известно, что 5-НТ<sub>1А</sub>-рецептор в этой структуре участвует в модуляции дофаминергической нейротрансмиссии [46], а нигростриарный путь играет важную роль в регуляции поведения при развитии наркотических зависимостей (например, социального поведения, тревожности) [47, 48], что частично согласуется с результатами настоящей работы, полученными на мышах АСВ.

Алкоголизация привела к падению уровня мРНК гена *Htr2a* во фронтальной коре мышей СВА и снижению функциональной активности 5-НТ<sub>2А</sub> рецепторов у животных линии АСВ. Ранее нами было показано, что двухнедельное введение этанола вызвало повышение уровня предшественника proBDNF во фронтальной коре мышей АСВ и снижение уровня BDNF в гиппокампе мышей линии СВА [16]. Зависимость 5-НТ<sub>2А</sub>-рецепторов от состояния системы BDNF была показана в экспериментах на мышах с нокаутом кодирующего его гена. Так, у гетерозиготных мышей *Bdnf* (+/-) со сниженным содержанием белка BDNF в мозге было обнаружено уменьшение плотности 5-НТ<sub>2А</sub>-рецепторов в префронталь-

**Таблица 2.** Результаты дисперсионного анализа влияния факторов “генотип”, “этанол” и их взаимодействия на уровни мРНК генов серотониновых рецепторов *Htr1a*, *Htr2a* и дофаминовых рецепторов *Drd1*, *Drd2* в структурах мозга мышей линий СВА и АСC, подвергавшихся длительному введению этанола

Структура	Генотип	Этанол	Генотип × Этанол
<i>Htr1a</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} = 2.72, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} = 1.53, p > 0.05$	$F_{1,24} = 1.16, p > 0.05$
Стриатум	<b><math>F_{1,25} = 4.53, p &lt; 0.05</math></b>	<b><math>F_{1,25} = 6.11, p &lt; 0.05</math></b>	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} = 1.17, p > 0.05$	$F_{1,24} < 1$
<i>Htr2a</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	<b><math>F_{1,24} = 4.56, p &lt; 0.05</math></b>
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Стриатум	<b><math>F_{1,25} = 9.51, p &lt; 0.01</math></b>	<b><math>F_{1,25} = 4.50, p &lt; 0.05</math></b>	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
<i>Drd1</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	<b><math>F_{1,25} = 5.55, p &lt; 0.05</math></b>	$F_{1,25} < 1$
Фронтальная кора	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
Стриатум	$F_{1,25} = 1.47, p > 0.05$	$F_{1,25} = 3.22, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$
<i>Drd2</i>			
Гипоталамус	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} < 1$	$F_{1,25} = 2.11, p > 0.05$
Фронтальная кора	$F_{1,24} = 3.13, p > 0.05$	$F_{1,24} = 1.48, p > 0.05$	$F_{1,24} < 1$
Гиппокамп	<b><math>F_{1,24} = 9.99, p &lt; 0.01</math></b>	<b><math>F_{1,24} = 5.26, p &lt; 0.05</math></b>	$F_{1,24} = 2.83, p > 0.05$
Стриатум	<b><math>F_{1,25} = 9.25, p &lt; 0.01</math></b>	$F_{1,25} = 1.31, p > 0.05$	$F_{1,25} < 1$
Средний мозг	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$	$F_{1,24} < 1$

Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты.

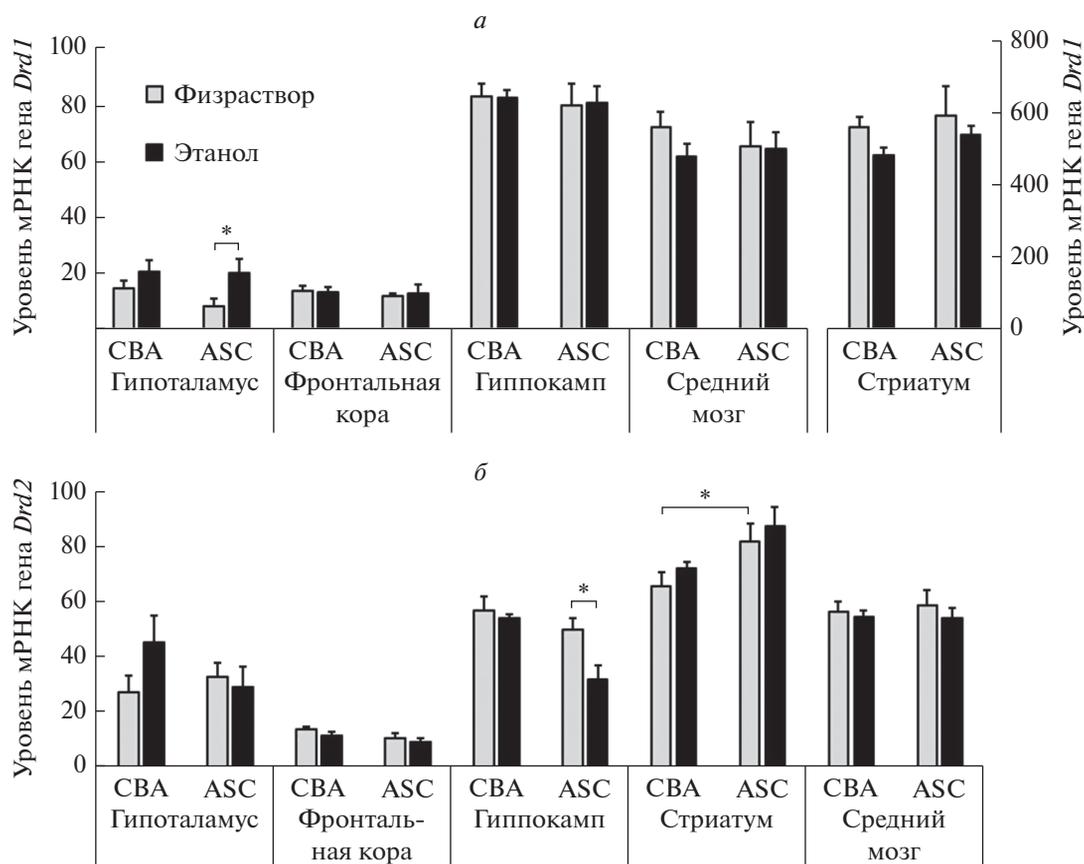


**Рис. 3.** Влияние субхронического введения этанола на экспрессию генов серотониновых рецепторов *Htr1a* (а) и *Htr2a* (б) в структурах мозга мышей линий CBA и ASC. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*.  $N = 7-8$  животных в группе. \*  $p < 0.05$ .

ной коре и ядрах шва среднего мозга [49]. Следует отметить, что полученные в этой работе результаты согласуются с данными других исследований об алкоголь-индуцированном снижении плотности 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторов в коре крыс [50], а также с нашими другими данными, демонстрирующими снижение экспрессии гена *Htr2a* во фронтальной коре мышей линии C57Bl/6, получавших этанол в течение 6 нед. [43]. Примечательно, что у этих животных одновременно было найдено повышение содержания proBDNF во фронтальной коре и снижение уровня BDNF в гиппокампе [43]. Можно предположить, что влияние введения этанола на 5-HT<sub>2A</sub>-рецепторы в меньшей степени зависит от вклада генотипа и носит общий характер.

Дофаминовые рецепторы D1 и D2 участвуют в регуляции алкоголь-зависимого поведения. Так, DRD1 KO и DRD2 KO мыши демонстрируют значительное снижение потребления этанола по

сравнению с диким типом [51]. Показано, что введение агониста D1-рецептора в паравентрикулярное ядро гипоталамуса облегчает высвобождение кортиколиберина, что может повышать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой-системы (ГГНС) [52]. Предположительно, повышение экспрессии гена *Drd1* в гипоталамусе мышей ASC, получавших этанол, может свидетельствовать о большем влиянии этанола на функции ГГНС у животных этой линии, но данная гипотеза требует дополнительных исследований. Известно, что гиппокамп является частью мезолимбической системы и вовлечен в регуляцию исследовательского и тревожного поведения [53]. В данной работе было показано, что обусловленное этанолом снижение тревожности и увеличение исследовательской активности у мышей линии ASC сопровождается уменьшением уровня мРНК гена *Drd2* в гиппокампе, что согласуется с литературными данными, демонстриру-



**Рис. 4.** Влияние субхронического введения этанола на экспрессию генов дофаминовых рецепторов *Drd1* (а) и *Drd2* (б) в структурах мозга мышей линий CBA и ASC. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*.  $N = 7-8$  животных в группе. \*  $p < 0.05$ .

ющими анксиолитический эффект введения антагониста D2 рецепторов в эту структуру у мышей [54].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мыши линии ASC с предрасположенностью к депрессивноподобному поведению продемонстрировали по сравнению с мышами “недепрессивной” линии CBA большую чувствительность к эффектам субхронического введения этанола, как на уровне поведения, так и рецепторов 5-HT и DA нейромедиаторных систем. По результатам настоящей работы, линия мышей ASC имеет большой потенциал для изучения взаимодействия предрасположенности к депрессивноподобному поведению и эффектов алкоголя на центральную нервную систему.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00051). Содержание ли-

ний мышей осуществлялось за счет средств бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* 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.

*Вклад авторов.* Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – концепция и руководство работой; Д.В. Базовкина, Е.М. Кондаурова, С.Н. Адонина, Е.Ю. Баженова – проведение экспериментов; Д.В. Базовкина, А.В. Куликов – обсуждение результатов исследования; Д.В. Базовкина – написание текста статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boden J.M., Fergusson D.M. // *Addiction* (Abingdon, England). 2011. V. 106. P. 906–914.
2. Agabio R., Trogu E., Pani P.P. // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018. V. 4. CD008581.
3. McHugh R.K., Weiss R.D. // *Alcohol Research: Current Reviews*. 2019. V. 40. arcr.v40.1.01.
4. Stephen Rich J., Martin P.R. // *Co-occurring psychiatric disorders and alcoholism / Handbook of Clinical Neurology*, 2014. P. 573–588.
5. Ngui H.H.L., Kow A.S.F., Lai S., Tham C.L., Ho Y.C., Lee M.T. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. P. 14912.
6. McIntosh C., Chick J. // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2004. V. 75. Suppl. 3. P. iii16–iii21.
7. Nutt D.J. // *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2006. V. 67. Suppl. 6. P. 3–8.
8. Marcinkiewicz C.A. // *ACS Chem. Neurosci*. 2015. V. 6. P. 1026–1039.
9. Kraus C., Castrén E., Kasper S., Lanzenberger R. // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2017. V. 77. P. 317–326.
10. Wrzosek M., Jakubczyk A., Wrzosek M., Matsumoto H., Łukaszkiwicz J., Brower K.J., Wójnar M. // *Pharmacological Reports*. 2012. V. 64. P. 449–453.
11. Underwood M.D., Kassir S.A., Bakalian M.J., Galfalvy H., Dwork A.J., Mann J.J., Arango V. // *Translational Psychiatry*. 2018. V. 8. P. 279.
12. Morganstern I., Tejani-Butt S. // *Neurochemical Research*. 2010. V. 35. P. 1708–1715.
13. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. // *Генетика*. 2005. Т. 41. С. 1222–1228.
14. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. // *Genes, Brain, and Behavior*. 2008. V. 7. P. 506–512.
15. Альперина Е.Л., Куликов А.В., Попова Н.К., Идова Г.В. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007. Т. 144. P. 188–190.
16. Базовкина Д.В., Кондаурова Е.М., Цыбко А.С., Ковецкая А.И., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. // *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51. № 4. С. 647–655.
17. Duman R.S., Deyama S., Fogaça M.V. // *Eur. J. Neurosci*. 2021. V. 53. P. 126–139.
18. Tikhonova M.A., Alperin, E.L., Tolstikova T.G., Bazovkina D.V., Di V.Y., Iдова G.V., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2010. V. 40. P. 521–527.
19. Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Neuroscience*. 2012. V. 214. P. 59–67.
20. Базовкина Д.В., Цыбко А.С., Филимонова Е.А., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С. // *Молекулярная биология*. 2016. Т. 50. № 2. С. 302–310.
21. Куликов А.В., Куликов В.А., Базовкина Д.В. // *Журн. Высш. нервн. деят.* 2005. Т. 55. № 1. С. 116–122.
22. Kulikov A.V., Tikhonova M.A., Kulikov V.A. // *J. Neurosci. Methods*. 2008. V. 170. P. 345–351.
23. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Antonov Y.V., Akulov A.E., Kulikov A.V., Kondaurova E.M. // *Neuroscience Research*. 2017. V. 117. P. 14–21.
24. Kulikova E.A., Moskaliuk V.S., Rodnyy A.Y., Bazovkina D.V. // *Advances in Gerontology*. 2021. Т. 11. № 1. С. 37–43.
25. Bazovkina D., Naumenko V., Bazhenova E., Kondaurova E. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Т. 22. № 21.
26. Науменко В.С., Куликов А.В. // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40. № 1. С. 37–44.
27. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kulikov A.V., Kostina E.V. // *Journal of Neuroscience Methods*. 2008. Т. 170. № 2. С. 197–203.
28. Bao X., Qi C., Liu T., Zheng X. // *Behavioural Brain Research*. 2021. V. 414. P. 113483.
29. Kraeuter A.K., Guest P.C., Sarnyai Z. // *Methods in Molecular Biology*. 2019. V. 1916. P. 99–103.
30. Wang X., Yu H., Wang C., Liu Y., You J., Wang P., Xu G., Shen H., Yao H., Lan X., Zhao R., Wu X., Zhang G. // *Toxicology*. 2020. V. 446. P. 152625.
31. Rath M., Tawfic J., Abrorkhujaeva A., Sowell S., Wu S., Eans S.O., Peris J., McLaughlin J.P., Stevens S.M., Liu B. // *Alcohol*. 2021. V. 95. P. 25–36.
32. Blokland A., Prickaerts J., Raaijmakers W. // *Physiology & Behavior*. 1992. V. 51. P. 245–248.
33. Cadoni C. // *Frontiers in Neuroscience*. 2016. V. 10. P. 13.
34. Varlinskaya E.I., Truxell E., Spear L.P. // *Alcohol*. 2014. V. 48. P. 433–444.
35. Pradhan G., Melugin P.R., Wu F., Fang H.M., Weber R., Kroener S. // *Psychopharmacology*. 2018. V. 235. P. 2027–2040.
36. Walker B.M., Drimmer D.A., Walker J.L., Liu T., Mathe A.A., Ehlers C.L. // *Alcohol*. 2010. V. 44. P. 487–493.
37. Boonlert W., Benya-Aphikul H., Umka Welbat J., Rodsiri R. // *Nutrients*. 2017. V. 9. P. 931.
38. Yao H., Shen H., Yu H., Wang C., Ding R., Lan X., Tash D., Wu X., Wang X., Zhang G. // *Physiology & Behavior*. 2021. V. 234. P. 113387.
39. Ciccocioppo R., Panocka I., Froidi R., Colombo G., Gessa G.L., Massi M. // *Psychopharmacology*, 1999. V. 144. P. 151–157.
40. Sharp T., Barnes, N.M. // *Neuropharmacology* 2020. V. 177. P. 108155.
41. Martin K.F., Phillips I., Hearson M., Prow M.R., Heal D.J. // *Br. J. Pharmacol.* 1992. V. 107. P. 15–21.
42. Kelai S., Renoir T., Chouchana L., Saurini F., Hanoun N., Hamon M., Lanfumey L. // *Journal of Neurochemistry*. 2008. V. 107. P. 1660–1670.
43. Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Antonov E.V., Pershina A.V., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. // *Alcohol*. 2020. V. 87. P. 1–15.
44. Kinoshita H., Jessop D.S., Roberts D.J., Hishida S., Harbuz M.S. // *Pharmacology & Toxicology*. 2003. V. 93. P. 100–102.
45. Burnett E.J., Grant K.A., Davenport A.T., Hemby S.E., Friedman D.P. // *Drug and Alcohol Dependence*. 2014. V. 136. P. 135–142.
46. Haleem D.J. // *Behavioural Pharmacology*. 2015. V. 26. P. 45–58.
47. Lago T., Davis A., Grillon C., Ernst M. // *Brain Res*. 2017. V. 1654. P. 177–184.
48. Poisson C.L., Engel L., Saunders B.T. // *Frontiers in Neural Circuits*. 2021. V. 15. P. 752420.

49. *Homberg J.R., Molteni R., Calabrese F., Riva M.A.* // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2014. V. 43. P. 35e47.
50. *Druse M.J., Tajuddin N.F., Ricken J.D.* // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 1997. V. 21. P. 1157–1164.
51. *Le Foll B., Gallo A., Le Strat Y., Lu L., Gorwood, P.* // *Behavioural Pharmacology*. 2009. V. 20. P. 1–17.
52. *Ran X., Yang Y., Meng Y., Li Y., Zhou L., Wang Z., Zhu J.* // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2019. V. 98. P. 97–103.
53. *Bertoglio L.J., Joca S.R., Guimaraes F.S.* // *Behav. Brain Res.* 2006. V. 175. P. 183–188.
54. *Ebrahimi-Ghiri M., Nasehi M., Zarrindast M.R.* // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2018. V. 391. P. 1107–1118.

## Effect of Subchronic Alcoholization on the Behavior and Monoaminergic Systems of the Brain of Mice with a Predisposition to Depression-Like Behavior

D. V. Bazovkina<sup>a</sup>, E. M. Kondaurova<sup>a</sup>, S. N. Adonina<sup>a</sup>, E. Yu. Bazhenova<sup>a</sup>, and A. V. Kulikov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

Depressive disorders and alcohol dependence are among the most common psychopathologies. It is known that disorders in the serotonergic and dopaminergic brain systems functioning lie in the pathogenesis of alcoholism and affective disorders. In this work, we studied the effects of prolonged administration of ethanol (1.5 g/kg, 20%, 10 days, i.p.) on behavior, functional activity of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors and expression of genes encoding serotonin (*Htr1a*, *Htr2a*) and dopamine (*Drd1*, *Drd2*) receptors in brain structures in mice of ASC strain (with the genetic predisposition to depressive-like behavior) and mice of the parental (“non-depressive”) CBA strain. It has been shown that alcoholization leads to an increase in motor activity in animals of both lines and an increase in the level of exploratory behavior in ASC mice. No significant effect of ethanol on social and depression-like behavior was found. The functional activities of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors (determined by the response to the administration of corresponding receptor agonists) were reduced by ethanol only in ASC animals. A decrease in 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene expression was found in the frontal cortex of CBA mice treated with alcohol. At the same time, ethanol led to an increase in the mRNA levels of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene in the striatum and the DRD1 receptor gene in the hypothalamus, as well as a decrease in the expression of the DRD2 receptor gene in the hippocampus of ASC mice. Thus, changes in the serotonergic and dopaminergic brain systems induced by chronic ethanol were more significant in ASC mice with a genetic predisposition to depression-like behavior.

*Keywords: ethanol, serotonin, dopamine, receptors, depressive-like behavior, brain, mouse*