

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ:
ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ мРНК ГЕНОВ *Tph1*, *Tph2*, АКТИВНОСТИ
ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ И МЕТАБОЛИЗМА СЕРОТОНИНА
В МОЗГЕ МЫШЕЙ ЧЕРЕЗ 5 СУТОК
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

© 2023 г. Д. В. Щербаков^а, А. Б. Арефьева^а, П. Д. Комлева^а, А. Е. Изъюров^а, Н. В. Хоцкин^а,
Д. В. Базовкина^а, А. В. Куликов^{а, *, **}

^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru

**e-mail: avkulikov52@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 25.08.2022 г.

Триптофангидроксилазы 1 и 2 (ТПГ1 и ТПГ2) играют ключевую роль в синтезе гормона и медиатора серотонина (5-НТ) в периферических тканях и 5-НТ нейронах соответственно. С целью изучения роли ТПГ1 в головном мозге мыши определили уровень мРНК гена *Tph1* в разных структурах мозга мышей в норме и при воспалении и сравнили его с уровнем мРНК гена *Tph2*, с активностью ТПГ и метаболизмом 5-НТ. Опыты проводили на трех группах молодых (4 недели) самцов мышей линии C57BL/6 (интактных, контрольных, которым вводили в/б физиологический раствор, и опытных, у которых воспаление моделировали однократным в/б введением липополисахарида (2 мг/кг, ЛПС)). Через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС определяли маркеры воспаления, массу селезенки и тимуса. В коре головного мозга, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге с помощью ВЭЖХ оценивали уровень 5-НТ и его метаболита — 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), активность ТПГ. Уровень мРНК генов *Tph1* и *Tph2* определяли методом количественной ОТ-ПЦР. Через 5 суток после введения ЛПС наблюдали значительное увеличение массы селезенки и уменьшение массы тимуса. Выявлено значительное увеличение уровня 5-НТ и 5-НИАА в среднем мозге и снижение уровня 5-НИАА и активности ТПГ в гипоталамусе мышей, которым вводили физиологический раствор и ЛПС, по сравнению с интактными мышами. Уровень мРНК гена *Tph2* была максимальной в среднем мозге, где расположены тела 5-НТ нейронов, тогда как в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе уровень мРНК этого гена был в несколько раз ниже. В среднем мозге мышей всех групп уровень мРНК гена *Tph1* был в несколько сотен раз ниже, чем уровень мРНК гена *Tph2*. Таким образом, в мозге мышей ТПГ1 экспрессируется на слишком низком уровне, чтобы существенно влиять на синтез 5-НТ в норме и при воспалении.

Ключевые слова: мыши, триптофангидроксилазы 1 и 2, серотонин, липополисахарид, головной мозг

DOI: 10.31857/S0026898423020209, **EDN:** EEWKAW

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) действует как ключевой медиатор в мозге и гормон на периферии. В мозге позвоночных 5-НТ синтезируется в 5-НТ нейронах, тела которых расположены в стволовой части мозга [1], тогда как на периферии он синтезируется в энтерохромаффинных клетках кишечника, тучных клетках кожи и эпифизе. Нарушения 5-НТ системы мозга связывают с риском различных психопатологий, тогда как транспортер и рецепторы 5-НТ служат мишенями для клинически эффективных антидепрессантов, анксиолитиков и антипсихотиков [2–4].

В организме млекопитающих 5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты — *L*-триптофана. Ключевыми ферментами синтеза 5-НТ являются триптофангидроксилазы 1 и 2 (ТПГ1 и ТПГ2), которые гидроксилируют *L*-триптофан до 5-гидрокситриптофана (5-НТР) [5, 6]. Основным геном считается *Tph2*, который экспрессируется в 5-НТ нейронах, тогда как *Tph1* экспрессируется исключительно в периферических клетках, таких как энтерохромаффинные клетки кишечника, тучные клетки и пинеалоциты эпифиза [5–9]. Однако транскрипты гена *Tph1* найдены в мозге крысы [10], мыши [11, 12] и человека [13–15], причем концентрации транскриптов *Tph1* и *Tph2*

были соизмеримыми. Стресс может усиливать экспрессию гена *Tph1* в мозге мышей [12].

Вопрос об экспрессии гена *Tph1* принципиально важен для понимания роли ТПГ2 и ТПГ1 в функционировании 5-НТ системы мозга в норме и при патологиях, поэтому основная цель нашей работы состояла в определении соотношения этих ферментов в мозге в норме и при патологии. Изучена экспрессия мРНК генов *Tph1* и *Tph2* в структурах головного мозга, содержащих тела 5-НТ нейронов (средний мозг), в которых экспрессируется ген *Tph2*, и окончания этих нейронов (кора, гиппокамп, стриатум и гипоталамус), в которых данный ген не экспрессируется, в норме и через 5 сут после активации иммунной системы мышей бактериальным липополисахаридом (ЛПС). Состояние иммунной системы оценивали по массе селезенки и тимуса, а 5-НТ системы — по уровню 5-НТ и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), а также по активности ТПГ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные и воздействия. Опыты проводили на мышах линии C57BL/6 (24 молодых самца в возрасте 4 недель с массой тела 16.7 ± 0.4 г). Выбор молодых животных обусловлен их повышенной чувствительностью к ЛПС и лабильностью 5-НТ системы мозга.

Для снятия группового эффекта животных сразу после получения рассаживали поодиночно в вентилируемые клетки Optimice (“Animal Care Systems, Inc.”, США) и содержали в течение всего эксперимента при температуре 24°C, влажности 45–50% и стандартном для вивария световом режиме (14 ч свет, 10 ч темнота). Стерильный корм и воду животные получали без ограничения. Все мыши были разделены на три выровненные по весу группы: интактную ($n = 8$, масса 16.4 ± 0.5 г), контрольную ($n = 8$, масса 17.1 ± 0.7 г) — мышам этой группы в/б вводили физиологический раствор; и опытную ($n = 8$, масса 16.7 ± 0.8 г) — мышам этой группы в/б вводили 2 мг/кг ЛПС (“Sigma-Aldrich”, Германия), растворенного в физиологическом растворе. Через 5 сут после введения физиологического раствора или ЛПС животных усыпляли углекислым газом, декапировали, выделяли головной мозг, селезенку и тимус. Последние взвешивали с точностью до мг на весах Ohaus AX124 (“Ohaus Corp.”, США). Из головного мозга выделяли структуры, содержащие окончания (переднюю кору, гиппокамп, стриатум, гипоталамус) и тела (средний мозг) 5-НТ нейронов, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Биохимические протоколы. В работе использовали метод, позволяющий определять содержание 5-НТ, активность ТПГ и уровень мРНК целе-

вых генов в одних и тех же образцах ткани. Для сохранения активности ТПГ кору, стриатум и гипоталамус гомогенизировали в 250 мкл, гиппокамп в 300 мкл и средний мозг в 400 мкл холодного 50 мМ Трис-НСl, pH 7.6, содержащего 1 мМ дитиотреитола. Одну аликвоту (50 мкл) суспензии немедленно переносили в пробирку эппендорф (1.5 мл), содержащую 150 мкл 0.6 М HClO_4 , для экстракции 5-НТ и 5-НИАА. Другую аликвоту (100 мкл) суспензии немедленно переносили в пробирку эппендорф (1.5 мл), содержащую 500 мкл Trizol Reagent (“Ambion, Life Technologies”, США) для экстракции РНК. Остальной гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при $+4^\circ\text{C}$ и 12700 об./мин, чистый супернатант переносили в пробирки, хранили при -80°C и использовали для определения активности ТПГ2. Процедура гомогенизации в буфере и аликвотирования одной пробы занимает меньше 1 мин и не вызывает деградации ни 5-НТ, ни РНК.

Определение уровня 5-НТ и 5-НИАА. Смесь суспензии (50 мкл) и 0.6 М HClO_4 (150 мкл) центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин ($+4^\circ\text{C}$). Полученный супернатант разбавляли в 2 раза водой MilliQ и использовали для определения уровня 5-НТ и 5-НИАА с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna C18(2) (частицы 5 мкм, $L \times I.D = 75 \times 4.6$ мм, “Phenomenex”, США) и электрохимического детектора (750 мВ, DECADE II™ Electrochemical Detector; “Antec”, Нидерланды). Осадок растворяли в 0.1 М NaOH для определения концентрации общего белка в пробе по Брэдфорду (“BioRad”, США) согласно протоколу производителя. Концентрации 5-НТ и 5-НИАА в пробе определяли по площади пика с помощью программы LabSolution LG/GC (“Shimadzu Corp.”, Япония) и нормировали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов 1, 2 и 3 нг для 5-НТ и 5-НИАА [16]. Содержание 5-НТ и 5-НИАА выражали в нг/мг белка.

Определение активности ТПГ2. Аликвоту супернатанта (15 мкл) инкубировали в течение 15 мин при 37°C в присутствии 1 мМ дитиотреитола, 0.4 мМ субстрата, *L*-триптофана (“Sigma-Aldrich”), 0.3 мМ кофактора — 6-метилтетрагидроптерина (“Sigma-Aldrich”), 0.3 мМ ингибитора декарбоксилазы — 3-гидроксибензилгидразина (“Sigma-Aldrich”) и 5 ед. каталазы (“Sigma-Aldrich”), в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали, приливая 75 мкл 0.6 М HClO_4 , центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин ($+4^\circ\text{C}$). Чистый супернатант разбавляли в 2 раза водой MilliQ и использовали для определения уровня синтезированного 5-НТР с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna C18(2) (размер частиц 5 мкм, $L \times I.D = 75 \times 4.6$ мм, “Phenomenex”) и электро-

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных для проведения количественной ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Температура плавления, °C	Длина ампликона, п.н.	Эффективность амплификации
<i>Tph2</i>	5'-CATTCCTCGCACAATTCCAGTCG-3' 5'-AGTCTACATCCATCCCAACTGCTG-3'	62	239	1.8
<i>Tph1</i>	5'-ACAAACTCTACCCGACCCAC-3' 5'-CAGTTGCGGGATGTTGTCTT-3'	63	197	1.7
<i>Polr2a</i>	5'-GTTGTCTGGGCAGCAGAATGTAG-3' 5'-TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC-3'	63	188	1.9

химического детектора (750 мВ, DECADE II™ Electrochemical Detector; “Antec,” США) согласно [16]. Концентрации 5-НТР в пробе определяли по площади пика с помощью программы LabSolution LG/GC (“Shimadzu Corp.”) и нормировали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов 50, 100 и 200 пмоль 5-НТР [16]. В контрольные пробирки добавляли те же реактивы, но не инкубировали, а немедленно приливали 75 мкл 0.6 М HClO₄. Аликвоту супернатанта (10 мкл) смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH и определяли белок по Брэдфорду (“BioRad”) согласно протоколу производителя. Активность ТПГ2 выражали в пмолях 5-НТР, синтезированных за 1 мин в пересчете на 1 мг белка (пмоль/мг/мин).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. РНК выделяли из аликвоты (100 мкл) гомогената с помощью Trizol Reagent (“Ambion, Life Technologies”, США) согласно протоколу производителя. Следы геномной ДНК удаляли, используя ДНКазу, свободную от РНКазы (“Promega”, США). Целостность РНК определяли с помощью электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. кДНК синтезировали с помощью набора R01-250 (“Биолабмикс”, Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию мРНК определяли методом количественной ОТ-ПЦР с помощью наборов R-402 (“Синтол”, Россия) и специфически подобранных праймеров (табл. 1). Использовали следующие условия: денатурация 94°C, 4 мин, (денатурация 94°C, 15 с; отжиг и элонгация при температуре отжига (табл. 1), 60 с; измерение флуоресценции – 80°C, 2 с) 40 циклов (“Синтол”, Россия). Праймеры подбирали таким образом, чтобы продукты (ампликоны) не включали интроны. Это условие необходимо для использования геномной ДНК мыши в качестве внешнего стандарта. Уровень экспрессии оценивали с использованием калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям геномной ДНК мыши и нормировали на 100 транскриптов гена *Polr2a* в пробе, служащей внутренним стандартом [16–18]. Такой метод позволяет измерить реальное число копий кДНК целевых генов и гена домашнего хозяйства и нормировать экспрессию целевых генов на ген домашнего хозяйства [17].

Статистика. Результаты представляли как среднее ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного метода ANOVA. Сравнение *post hoc* проводили по Фишеру. Уровень значимости принят равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменение массы селезенки и тимуса через 5 суток после введения мышам физиологического раствора или ЛПС

Нами выявлены значительные различия в массе селезенки ($F(2,21) = 15.5, p < 0.001$) и тимуса ($F(2,21) = 36.9, p < 0.001$) у мышей разных групп. В группе мышей, которым вводили ЛПС (2 мг/кг), отмечено резкое увеличение массы селезенки и снижение массы тимуса через 5 сут после инъекции по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор (селезенка, $p < 0.001$; тимус, $p < 0.001$), или интактными мышами (селезенка, $p = 0.001$; тимус, $p < 0.001$) (рис. 1). При этом введение физиологического раствора не влияло на массу селезенки и тимуса, которые оставались такими же, как у интактных животных (селезенка, $p = 0.18$; тимус, $p = 0.84$) (рис. 1).

Изменения уровней 5-НТ и 5-Н1АА в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Обнаружены значительные межгрупповые различия в уровне 5-НТ в гиппокампе и среднем мозге, 5-Н1АА в гипоталамусе и среднем мозге, в гиппокампе и гипоталамусе мышей (табл. 2). Однократное введение как физиологического раствора, так и ЛПС (2 мг/кг) приводило к увеличению уровня 5-НТ в гиппокампе и среднем мозге, уровня 5-Н1АА в среднем мозге, но к уменьшению уровня 5-Н1АА в гипоталамусе (табл. 2).

Изменения активности ТПГ2 в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Как и ожидалось, активность ТПГ2 в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе мышей

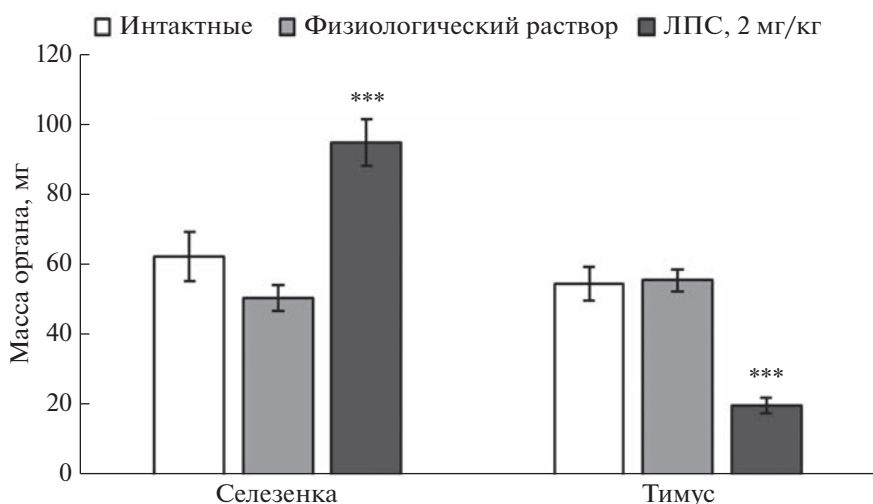


Рис. 1. Масса селезенки и тимуса у интактных мышей и через 5 дней после однократной в/б инъекции физиологического раствора или ЛПС в дозе 2 мг/кг. *** $p < 0.001$ по сравнению с интактными.

была ниже, чем в среднем мозге. Не выявлено межгрупповых различий в активности фермента в коре ($F(2,21) = 1.3$, $p = 0.29$), гиппокампе ($F(2,21) = 1.76$, $p = 0.2$), стриатуме ($F(2,21) = 1.57$, $p = 0.23$) и среднем мозге ($F(2,21) < 1$). Однако введение физиологического раствора и ЛПС снижало активность ТПГ2 в гипоталамусе ($F(2,21) = 8.88$, $p = 0.0016$) (рис. 2).

Изменения уровней мРНК генов *Tph1* и *Tph2* в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Максимальный уровень транскриптов гена *Tph1* обнаружен в гиппокампе, в других структурах мозга он был в основном ниже (табл. 3). Введение

физиологического раствора и ЛПС значительно снизило экспрессию гена *Tph1* в коре головного мозга мышей (табл. 3).

Уровень транскриптов гена *Tph2* в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе был в несколько раз ниже, чем в среднем мозге. Ни физиологический раствор, ни ЛПС не влияли на экспрессию гена *Tph2* в исследованных структурах мозга (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами впервые оценены отдаленные последствия (5 суток) однократного введения ЛПС на уровень 5-НТ, 5-НИАА, активность ТПГ, экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в головном мозге мы-

Таблица 2. Уровни 5-НТ и 5-НИАА (нг/мг белка) в структурах мозга 4-недельных самцов мышей C57BL/6, интактных и через 5 суток после однократного введения физиологического раствора или липополисахарида

Структура мозга	Интактные мыши	Физиологический раствор	ЛПС, 2 мг/кг	p
5-НТ				
Кора	2.51 ± 0.22	3.15 ± 0.32	3.08 ± 0.15	$F(2,21) = 2.1$, $p = 0.15$
Гиппокамп	2.92 ± 0.16	$3.67 \pm 0.22^{**}$	$3.14 \pm 0.16^{\#}$	$F(2,21) = 4.48$, $p = 0.02$
Стриатум	1.5 ± 0.1	2.45 ± 0.43	2.22 ± 0.13	$F(2,21) = 3.44$, $p = 0.051$
Гипоталамус	9.45 ± 1.13	7.66 ± 0.41	6.91 ± 0.33	$F(2,21) = 3.3$, $p = 0.057$
Средний мозг	3.88 ± 0.19	$5.47 \pm 0.3^{*}$	$5.63 \pm 0.38^{***}$	$F(2,21) = 10.3$, $p < 0.001$
5-НИАА				
Кора	1.02 ± 0.1	1.02 ± 0.13	1.1 ± 0.21	$F(2,21) < 1$
Гиппокамп	3.28 ± 0.16	3.18 ± 0.16	3.44 ± 0.38	$F(2,21) < 1$
Стриатум	1.38 ± 0.12	1.69 ± 0.21	1.72 ± 0.19	$F(2,21) = 1.1$, $p = 0.34$
Гипоталамус	$3.45 \pm 0.0.37$	$2.33 \pm 0.29^{**}$	$2.52 \pm 0.21^{*}$	$F(2,21) = 5.77$, $p = 0.01$
Средний мозг	2.54 ± 0.15	$3.23 \pm 0.18^{*}$	$3.7 \pm 0.21^{***}$	$F(2,21) = 10.4$, $p < 0.001$

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$ по сравнению с интактными мышами.

$\#p < 0.05$ по сравнению с мышами, которым ввели физиологический раствор.

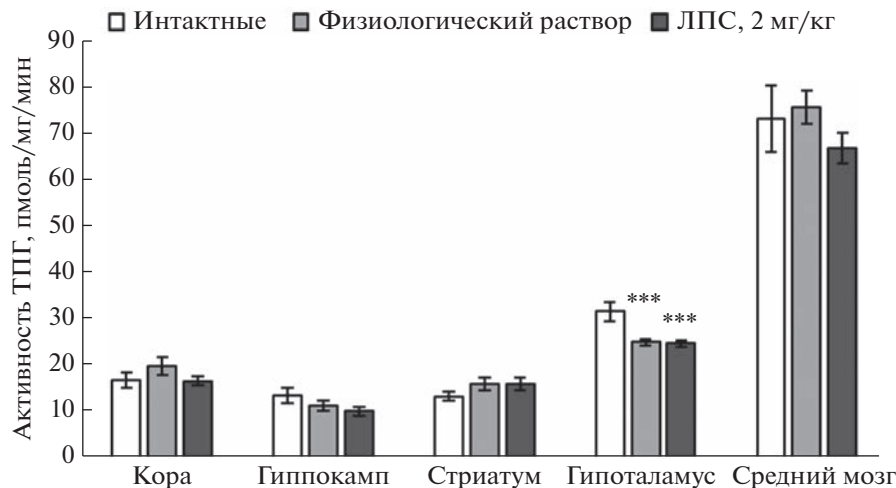


Рис. 2. Активность ТПГ (пмоль/мг/мин) в коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге интактных мышей и через 5 дней после однократной в/б инъекции физиологического раствора или ЛПС (2 мг/кг). *** $p < 0.001$ по сравнению с интактными.

шей. Мы намеренно выбрали молодых животных, поскольку они более чувствительны к стрессу и инфекциям.

Однократное введение ЛПС (2 мг/кг) приводит к активации иммунной системы, которая сохраняется по крайней мере в течение 5 суток в виде увеличения массы селезенки и снижения массы тимуса по сравнению с интактными животными и животными, которым вводили физиологический раствор.

Нами обнаружено увеличение уровня 5-Н1АА и 5-НТ в среднем мозге, а также снижение уровня 5-Н1АА в гипоталамусе через 5 суток после введе-

ния ЛПС по сравнению с интактными животными. Важно отметить, что введение физиологического раствора вызывало изменения в уровне 5-НТ и 5-Н1АА в этих структурах, сходные с вызванными ЛПС. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения в уровнях 5-НТ и 5-Н1АА вызваны, скорее всего, отдаленными последствиями стресса, сопряженного с в/б инъекцией, чем с активацией иммунной системы. Действительно, ранее мы показали увеличение уровня 5-Н1АА в мозге мышей при эмоциональном стрессе [19].

Снижение уровня 5-Н1АА в гипоталамусе мышей, которым вводили физиологический раствор

Таблица 3. Уровни мРНК* генов *Tph1* и *Tph2* в структурах мозга 4-недельных самцов мышей C57BL/6 интактных и через 5 суток после однократного введения физиологического раствора или липополисахарида

Структура мозга	Интактные мыши	Физиологический раствор	ЛПС, 2 мг/кг	<i>p</i>
Tph1				
Кора	1.77 ± 0.68	0.18 ± 0.02**	0.21 ± 0.03**	$F(2,21) = 5.32, p = 0.013$
Гиппокамп	3.35 ± 1.34	7.02 ± 2.86	7.14 ± 0.3.11	$F(2,21) < 1$
Стриатум	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.44 ± 0.21	$F(2,21) = 1.6, p = 0.23$
Гипоталамус	0.12 ± 0.11	0.06 ± 0.04	1.85 ± 1.77	$F(2,21) < 1$
Средний мозг	0.26 ± 0.08	0.44 ± 0.11	0.3 ± 0.07	$F(2,21) = 1.1, p = 0.32$
Tph2				
Кора	9.57 ± 2.17	4.5 ± 0.58	6.2 ± 1.6	$F(2,21) = 2.63, p = 0.1$
Гиппокамп	9.04 ± 2.21	17.6 ± 5.8	11.45 ± 3.14	$F(2,21) = 1.2, p = 0.32$
Стриатум	3.88 ± 0.8	4.9 ± 0.0.63	6.29 ± 1.49	$F(2,21) = 1.34, p = 0.28$
Гипоталамус	0.96 ± 0.3	0.79 ± 0.14	3.9 ± 2.9	$F(2,21) < 1$
Средний мозг	63.56 ± 9.72	77.94 ± 6.51	76.84 ± 12.19	$F(2,21) < 1$

*Уровни мРНК рассчитывали как число копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.
 ** $p < 0.01$ по сравнению с интактными мышами.

и ЛПС, по-видимому, вызвано снижением активности ТПГ2 и сопряженным снижением синтеза медиатора. В то же время, увеличение уровня 5-НТ и 5-Н1АА в среднем мозге мышей, которым вводили физиологический раствор и ЛПС, вероятно, не связано с увеличением синтеза медиатора, поскольку мы не выявили изменений активности ТПГ в данной структуре у этих мышей.

Длительные изменения в 5-НТ системе в ответ на введение физиологического раствора кажутся странными. Однако до нас никто не оценивал отдаленных последствий одной инъекции физиологического раствора на 5-НТ систему мозга. Можно предположить, что молодые мыши очень чувствительны к стрессу, вызванному всего одной инъекцией физиологического раствора, и его последствия сохраняются длительное время. Однако это предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Главной целью нашего исследования было сравнение уровней транскриптов генов *Tph2* и *Tph1* в различных структурах головного мозга. В качестве внешнего стандарта мы использовали заданные концентрации геномной ДНК, что позволяет построить калибровочную кривую зависимости порогового цикла от исходного количества матрицы и, следовательно, определить абсолютную концентрацию транскриптов в исследуемых пробах [17, 18]. Измерение абсолютных значений концентрации транскриптов позволило нам не только оценить влияние введения физиологического раствора и ЛПС на экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в каждой структуре мозга по отдельности, но и оценить соотношение транскриптов этих генов в разных структурах.

Как и следовало ожидать, наибольшей концентрация транскриптов гена *Tph2* была в среднем мозге, где локализованы тела серотониновых нейронов и транскрибируется данный ген. Мы обнаружили также небольшие, но хорошо детектируемые концентрации транскриптов гена *Tph2* и в структурах, не содержащих тела 5-НТ нейронов (в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе), где теоретически этот ген не должен транскрибироваться. Мы не знаем причин присутствия мРНК гена *Tph2* в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе, однако можно предположить два гипотетических механизма появления транскриптов гена *Tph2* в этих структурах: аксональный транспорт мРНК данного гена из тел 5-НТ нейронов и наличие небольшого числа клеток, способных экспрессировать ген *Tph2*. Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Важно отметить, что концентрация транскриптов *Tph1* во всех исследованных структурах находится примерно на одинаковом и довольно низком, практически следовом, уровне по сравнению с концентрацией транскриптов гена *Tph2*. Этот контраст в экспрессии генов *Tph1* и *Tph2*

проявляется в полной мере в среднем мозге, где концентрация транскриптов гена *Tph2* в несколько сотен раз больше, чем гена *Tph1*. Этот результат хорошо согласуется с данными других авторов [8], которые не нашли мРНК гена *Tph1* [7] и белка ТПГ1 в мозге грызунов. Данные RNA-Seq показали, что в ядрах шва среднего мозга мыши уровень экспрессии генов *Tph2* и *Tph1* составляет 1680 и 0.8 ТРМ (число транскриптов генов *Tph2* и *Tph1* на миллион транскриптов) соответственно [20]. Более того, наши результаты хорошо согласуются с данными, согласно которым нокаут гена *Tph1* снижает уровень 5-НТ в мозге мышей всего на несколько процентов, тогда как нокаут гена *Tph2* драматически снижает уровень этого биогенного амина [9]. Можно предполагать, что в мозге мыши имеется небольшое число клеток, способных экспрессировать ТПГ1. В любом случае, вклад ТПГ1 в синтез 5-НТ в мозге мышей значительно ниже, чем ТПГ2.

Поскольку уровень мРНК гена *Tph1* возрастал в 1.8 раза через несколько часов после стресса, было высказано предположение о возможности повышения относительной роли ТПГ1 в мозге при патологиях [12]. В нашем исследовании мы моделировали патологическое состояние, вызванное введением ЛПС, и не выявили существенных изменений в экспрессии гена *Tph1* в структурах мозга. Синтез белка ТПГ1 может происходить только в телах 5-НТ нейронов. Поэтому о вкладе ТПГ1 и ТПГ2 в синтез 5-НТ в 5-НТ нейронах можно судить по относительной экспрессии генов *Tph1* и *Tph2* в среднем мозге, где локализованы тела 5-НТ нейронов. Поскольку экспрессия гена *Tph2* в этой структуре в несколько сотен раз превышает экспрессию *Tph1*, вклад ТПГ2 в синтез серотонина в 5-НТ нейронах во много раз превышает вклад ТПГ1. Даже стресс, который может увеличить экспрессию гена *Tph1* в 1.8 раза [12], не способен изменить доминирование ТПГ2 в синтезе 5-НТ.

Тем не менее, соизмеримые концентрации мРНК генов *Tph1* и *Tph2* найдены в мозге грызунов [10–12] и человека [13–15]. Проанализируем подробно эти результаты. В работах, выполненных на грызунах [10–12], использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$, который не позволяет определить абсолютную концентрацию транскриптов, а оценивает только степень изменения концентрации при воздействии по сравнению с животными контрольной группы, уровень транскриптов у которых принимается за 1 (или 100) [21]. Поэтому измеренная методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ экспрессия разных генов вне зависимости от абсолютной концентрации их транскриптов всегда будет 1 (или 100), что мы и наблюдаем в работах [10–12]. Иными словами, одинаковость экспрессии генов *Tph1* и *Tph2* в мозге грызунов в этих работах является иллюзорной и

обусловлена особенностью метода. Авторы, изучающие экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в мозге человека [13–15], использовали модифицированный протокол, позволяющий оценить концентрацию мРНК целевого гена относительно гена домашнего хозяйства. В этих работах обнаружен высокий уровень мРНК гена *Tph1* в мозге человека. Поскольку анализировали посмертные образцы, то нельзя исключить, что относительно высокая экспрессия гена *Tph1* может быть обусловлена изменениями в мозге, вызванными агонией. Наконец, высокий уровень экспрессии гена *Tph1* в мозге может быть видовой особенностью человека. Недавно мы показали, что одинаковый уровень экспрессии генов *Tph1a*, *Tph1b* и *Tph2* в мозге является видовой особенностью рыб *Nothobranchius furzeri* [22] и *Danio rerio* [16].

Таким образом, нами получены три существенных результата. Во-первых, стресс (инъекция) оставляет продолжительный след (5 суток) на уровне метаболизма 5-НТ в мозге молодых мышей. Во-вторых, наибольший уровень мРНК гена *Tph2* наблюдается в среднем мозге, где расположены тела 5-НТ нейронов, тогда как в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе, где расположены их аксоны и окончания, уровень мРНК данного гена в несколько раз ниже. В-третьих, в мозге мышей в норме и при воспалении выявлены лишь следовые количества мРНК *Tph1*. Это свидетельствует о том, что ТПГ1, по-видимому, не играет существенной роли в синтезе 5-НТ в мозге мышей как в норме, так и при патологиях.

Мышей содержали и разводили в Российском национальном центре генетических ресурсов лабораторных животных, который поддерживается бюджетными проектами № FWNR-2022-0023 и RFMEFI62117X0015.

Выполнение данной работы поддержано Российским научным фондом (грант № 21-15-00035).

Содержание и экспериментальные процедуры проведены в соответствии с правилами Совета Европейского Парламента (Директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г) и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaspar P., Lillesaar C. (2012) Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 2382–2394.
2. Willner P., Scheel-Krüger J., Belzung C. (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**, 2331–2371.
3. Hamon M., Blier P. (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **45**, 54–63.
4. Miller B.R., Hen R. (2015) The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr. Opin. Neurobiol.* **30**, 51–58.
5. Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* **299**, 76.
6. Walther D.J., Bader M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1673–1680.
7. Patel P.D., Pontrello C., Burke S. (2004) Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry.* **55**, 428–433.
8. Sakowski S.A., Geddes T.J., Thomas D.M., Levi E., Hatfield J.S., Kuhn D.M. (2006) Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* **1085**, 11–18.
9. Savelieva K.V., Zhao S., Pogorelov V.M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T.H. (2008) Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One.* **3**, e3301.
10. Megha K., Deshmukh P.S., Ravi A.K., Tripathi A.K., Abegaonkar M.P., Banerjee B.D. (2015) Effect of low-intensity microwave radiation on monoamine neurotransmitters and their key regulating enzymes in rat brain. *Cell Biochem. Biophys.* **73**, 93–100.
11. Igarashi K., Kuchiiwa T., Kuchiiwa S., Iwai H., Tomita K., Sato T. (2021) Kamishoyosan (a Japanese traditional herbal formula), which effectively reduces the aggressive biting behavior of male and female mice, and potential regulation through increase of *Tph1*, *Tph2*, and *Esr2* mRNA levels. *Brain Res.* **1768**, 147580.
12. Browne C.A., O'Brien F.E., Connor T.J., Dinan T.G., Cryan J.F. (2012) Differential lipopolysaccharide-induced immune alterations in the hippocampus of two mouse strains: effects of stress. *Neurosci.* **6**, 237–248.
13. Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Möller H.J., Ackenheil M., Bondy B. (2007) Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J. Psychiatr. Res.* **41**, 168–173.
14. Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Müller J., Möller H.J., Bondy B. (2009) Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain. *Neuroscience.* **159**, 1274–1282.
15. Sugden K., Tichopad A., Khan N., Craig I.W., D'Souza U.M. (2009) Genes within the serotonergic system are differentially expressed in human brain. *BMC. Neurosci.* **10**, 50.
16. Сорокин И.Е., Евсюкова В.С., Куликов А.В. (2022) Влияние короткого светового дня на поведение и серотониновую систему головного мозга рыб вида *Danio rerio*. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **173**, 279–284.
17. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. (2005) Quantitative RT-PCR of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as a standard. *J. Neurosci. Meth.* **141**, 97–101.

18. Науменко В.С., Куликов А.В. (2006) Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге. *Молекуляр. биология*. **40**, 37–44.
19. Bazhenova E.Y., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Lichman D.V., 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.
20. Bonthuis P.J., Huang W.C., Stacher Hörndli C.N., Ferris E., Cheng T., Gregg C. (2015) Noncanonical genomic imprinting effects in offspring. *Cell Rep.* **12**, 979–991.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. **25**, 402–408.
22. Evsiukova V.S., Kulikova E.A., Kulikov A.V. (2021) Age-related alterations in the behavior and serotonin-related gene mRNA levels in the brain of males and females of short-lived turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*). *Biomolecules*. **11**, 1421.

Alterations in the Level of mRNA of *Tph1*, *Tph2* Genes, Tryptophan Hydroxylase Activity and Serotonin Metabolism in Mouse Brain 5 Days after Lipopolysaccharide Administration

D. V. Sherbakov¹, A. B. Arefieva¹, P. D. Komleva¹, A. E. Iz'urov¹, N. V. Khotskin¹,
D. V. Bazovkina¹, and A. V. Kulikov¹, *, **

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru

**e-mail: avkulikov52@gmail.com

Tryptophan hydroxylases 1 and 2 (TPH1 and TPH2) play the key role in the synthesis of a neurotransmitter and hormone, serotonin (5-HT) in peripheral organs and in the brain, respectively. The main aim of the present study was to clarify the distribution of mRNA of *Tph1* and *Tph2* genes in brain structures in norm and after inflammation. The experiments were carried out on young (4 weeks old) males of C57BL/6 mice. The animals were divided into three groups: intact, control, injected ip with saline, and injected ip with 2 mg/kg of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Markers of inflammation, spleen and thymus mass were assayed 5 days after the saline or LPS administration. In their frontal cortex, hippocampus, striatum, hypothalamus and midbrain the concentrations of 5-HT, its main metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), and TPH activity were assayed in using HPLC, while *Tph1* and *Tph2* mRNA were quantified by quantitative real-time RT-PCR. Dramatic increase of spleen mass and decrease of thymus mass 5 days after LPS administration was shown. Significant increase of 5-HT and 5-HIAA levels in midbrain as well as decrease of 5-HIAA concentration and TPH activity in hypothalamus in mice treated with LPS and saline compared with intact animals was revealed. The highest concentration of *Tph2* gene mRNA was observed in midbrain in 5-HT neuron bodies, while in this gene mRNA level was lower in 5-HT endings (cortex, hippocampus, striatum and hypothalamus). Trace amounts of *Tph1* mRNA was revealed in all studied brain structures in mice of the three groups. Thus, *Tph1* gene expression in the mouse brain is too low to significantly affect 5-HT synthesis in normal conditions and during inflammation.

Keywords: mice, tryptophan hydroxylase 1 и 2, serotonin, lipopolysaccharide, brain