

УДК 613:614.3:615.9

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ, НА ТЯЖЕСТЬ ДЕПРИМИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА У КРЫС

Н.С. Осечкина¹, Г.В. Назаров²,
Е.Ю. Бонитенко¹, М.Б. Иванов¹,
В.А. Кашиуро¹, Н.В. Лапина¹, А.В. Бабкин²,
И.С. Бердинских², А.С. Мелехова¹,
К.О. Войцехович¹, Д.С. Лисицкий¹,
Н.В. Макарова¹, Т.В. Кашина¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Изучены экспрессия и полиморфизм генов (кодирующих ГАМК-рецепторы), определяющих тяжесть депримирующего действия этанола у белых нелинейных крыс. В ходе эксперимента проводилось генотипирование животных по 16 однонуклеотидным заменам генов, кодирующих рецепторы ГАМК. Генетическое разнообразие аллельных вариантов было обнаружено по 11 полиморфизмам. Выявлено, что у крыс с гомозиготным вариантом генотипа ТТ (rs197587817) уровень экспрессии гена *Gabra1* (в головном мозге через 8 часов после введения этанола) был достоверно (в 2 раза) ниже по сравнению с гетерозиготным генотипом СТ. Показана достоверная ($p < 0,05$) ассоциация уровня экспрессии гена *Gabrb1* с глубиной тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему крыс спустя 8 часов после введения токсиканта.

Ключевые слова: ГАМК – рецепторы, генетический полиморфизм, ген, экспрессия, этанол.

Введение. Количество тяжелых осложнений и высокая летальность при острых отравлениях нейротоксикантами свидетельствуют о необходимости разработки новых, при совершенствовании имеющихся, методов диагно-

стики тяжести поражения и прогноза исхода химической травмы [1].

Острые отравления этанолом, одним из широко распространенных нейротоксикантов, характеризуются целым каскадом нарушений

Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna), младший научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, dunats@rambler.ru

Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valerevich), доктор химических наук, доцент, начальник отдела научно-исследовательского испытательного института военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, denis-100@list.ru

Бонитенко Евгений Юрьевич (Bonitenko Evgeniy Yurevich), доктор медицинских наук, директор ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, eu_bonitenko@mail.ru

Иванов Максим Борисович (Ivanov Maksim Borisovic), доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, m.b.ivanov@toxicology.ru

Кашиуро Вадим Анатольевич (Kashuro Vadim Anatol'evich), доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, e-mail kashuro@yandex.ru

Лапина Наталия Вадимовна (Lapina Nataliya Vadimovna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, lapina2005@inbox.ru

Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), научный сотрудник научно-исследовательского испытательного института военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, babkinnik@yandex.ru

Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskikh Irina Sergeevna), научный сотрудник научно-исследовательского испытательного института военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, irina_berdinskikh@mail.ru

Мелехова Александра Сергеевна (Melekhova Aleksandra Sergeevna), младший научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, melehovaalexandra@gmail.com

Войцехович Карина Олеговна (Voytsekhovich Karina Olegovna), младший научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, carvoice@gmail.com

Лисицкий Дмитрий Сергеевич (Lisitskiy Dmitriy Sergeevich), кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, lisitskiydmity@gmail.com.

Макарова Наталья Васильевна (Makarova Natalya Vasil'evna), доктор медицинских наук, научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, makarova1953@list.ru

Кашина Татьяна Владимировна (Kashina Tat'yana Vladimirovna), ветеринарный врач лаборатории психофармакологии ФГБУН «Институт токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, tat.t@mail.ru

на различных уровнях (системном, органном, клеточном и субклеточном). К наиболее тяжелым состояниям, сопровождающимся глубокой дисфункцией центральной нервной системы и высокой летальностью, относится токсическая кома [2, 3].

В настоящее время большое значение при прогнозе течения алкогольной интоксикации придается индивидуальным, генетически детерминированным особенностям организма. Анализ литературных данных подтверждает существование генетически обусловленных различий в реагировании биологических систем на воздействие этанола [4-7].

Токсическое действие этанола сопровождается воздействием на ГАМК-рецепторы [8]. Считается экспериментально обоснованным, что ряд поведенческих реакций при интоксикации этанолом обусловлен влиянием спирта на функционирование ГАМК_A-ергической нейромедиаторной системы. При этом развитие и степень выраженности различных патологических процессов при острой и хронической интоксикации могут быть сопряжены с генетическими вариациями ГАМК-рецепторов [9, 10]. В ряде исследований показано влияние уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4* на формирование устойчивости к воздействию этанола [11, 12].

Несмотря на наличие большого количества работ, посвященных изучению полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, данных о связи глубины депримирующего действия этанола на ЦНС с рассматриваемыми генетическими особенностями пока нет. На сегодняшний день не обнаружены маркеры предрасположенности к формированию тяжелых форм интоксикации этанолом.

Таким образом, получение новых данных о влиянии экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, на степень течения интоксикации позволит осуществить прогнозирование глубины депримирующего воздействия этанола на нервную систему, разработать эффективные методы диагностики тяжести состояний отравленных и подходы к созданию индивидуализированных схем терапии.

В связи с этим, *целью настоящей работы* было выявление ассоциации полиморфных вариантов генов (ГАМК-рецепторов), уровня их экспрессии (в крови, печени, головном мозге) с глубиной и тяжестью депримирующего действия этанола на нервную систему белых нелинейных крыс.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена в соответствии с Национальными и Международными правилами работы

с лабораторными животными, а ее выполнение санкционировано Комиссией по биоэтике (IACUC). Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180–240 г, содержащихся в условиях вивария. За 12 часов до начала эксперимента животных не кормили. Для моделирования различной степени угнетения функций нервной системы (оглушение-сопор-кома) 33% раствор этанола вводили животным внутривентриально в дозе 0,8 ЛД₅₀ (5,1 г/кг). Наблюдение за крысами осуществляли в течение 8 часов после введения этанола.

Оценку неврологического статуса экспериментальных животных при остром отравлении этанолом проводили с использованием алгоритма, разработанного в работе Башарина В.А. [13].

ДНК для проведения генотипирования выделяли из образцов периферической венозной крови с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Arrow» (Швеция) и коммерческого набора «Arrow Blood DNA Kit 500» (Швеция) по протоколу «DNA Blood 500».

Тотальную РНК для проведения анализа экспрессии выделяли из образцов крови, печени и головного мозга крыс с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Arrow» (Швеция) и коммерческого набора «Arrow RNA» (Швеция) по протоколу «RNA v.2.1». Выделенную РНК переводили в кДНК по протоколу High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (США) [14].

Измерение концентрации выделенных образцов ДНК и РНК осуществляли с использованием спектрофотометра «BioSpec-pano» (Япония).

Для определения полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, проводили полимеразно-цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе «QuantStudio 12K Flex», Applied Biosystems (США), с использованием коммерческих праймеров и зондов, синтезированных и нанесенных производителем на пластины «OpenArray». Термоциклирование пластин «OpenArray» проводили по следующей программе: 95°C – 600 с – 1 цикл; (92°C – 15 с, 60°C – 60 с) – 40 циклов [15]. Анализ данных ПЦР-РВ проводили с использованием специализированного программного обеспечения «НОМЕ Genotyper».

Экспрессию генов, кодирующих ГАМК-рецепторы в крови, печени и головном мозге крыс спустя 8 часов после введения этанола, оценивали методом ПЦР-РВ, по отношению к гену-рефери 18S-РНК на амплификаторе «7900HT Fast Real-Time PCR System», Applied

Biosystems (США), с использованием коммерческой тест-системы Applied Biosystems (Rn01430371_m1). Термоциклирование осуществляли по следующей программе: 50°C – 120 сек. – 1 цикл; 95°C – 600 сек. – 1 цикл; (95°C – 15 сек., 60°C – 60 сек.) – 45 циклов. Анализ данных проводили с использованием программы RQ Manager v.1.2.1 [16].

Для определения относительного количества кДНК, соответствующего относительно количеству мРНК в анализируемом образце, использовали разведения пулированных исследуемых образцов, при помощи которых осуществлялось построение калибровочных кривых. Показатель уровня экспрессии гена определяли относительно гена-рефери 18s-РНК по следующей формуле:

$$УЭ = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК гена - РНК}} \times 100,$$

где УЭ – относительный уровень экспрессии гена [17].

Статистическую обработку результатов

производили с использованием программы Statistica 8.0. Для сравнения уровней экспрессии при носительстве различных генотипов использовали дисперсионный анализ.

Результаты и обсуждение. На основе анализа данных литературы были отобраны гены-кандидаты и их полиморфизмы, определяющие степень тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему лабораторных крыс [6–11]. Так, для исследования выбраны гены, кодирующие ГАМК-рецепторы и 16 полиморфизмов, расположенные в разных частях этих генов.

Для выявления частот полиморфных вариантов проводили генотипирование образцов ДНК, выделенных из периферической венозной крови белых крыс. Частоты полиморфных вариантов генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, приведены в таблице 1.

Проведенное генотипирование животных позволило выявить генетическое разнообразие аллельных вариантов только по 11 полиморфизмам (rs107127945, rs197587817,

Таблица 1

Частоты полиморфных вариантов генов, кодирующих ГАМК-рецепторы

№ п/п	Наименование гена	Генетический вариант	Частоты генотипов, N (%)		
			NN	NM	MM
1	Gabra1	G/T (rs107127945)	60 (75)	19 (23,75)	1 (1,25)
2	Gabra1	C/T (rs197587817)	57 (71,25)	22 (27,5)	1 (1,25)
3	Gabra2	C/T (rs105733011)	65 (81,25)	15 (18,75)	0 (0)
4	Gabra2	A/G (rs8168342)	67 (83,75)	13 (16,25)	0 (0)
5	Gabra2	A/G (rs198286814)	66 (82,50)	14 (17,50)	0 (0)
6	Gabra2	A/G (rs198837638)	68 (85)	12 (15)	0 (0)
7	Gabra3	A/T (rs107413315)	80 (100)	0 (0)	0 (0)
8	Gabra3	A/T (rs105096249)	68 (85)	12 (15)	0 (0)
9	Gabra4	G/T (rs197596713)	56 (70)	22 (27,50)	2 (2,50)
10	Gabra4	A/G (rs1055966045)	80 (100)	0 (0)	0 (0)
11	Gabra6	C/T (rs106047548)	80 (100)	0 (0)	0 (0)
12	Gabra6	C/T (rs107063497)	80 (100)	0 (0)	0 (0)
13	Gabrb1	C/T (rs13456854)	70 (87,50)	9 (11,25)	1 (1,25)
14	Gabrb1	C/T (rs13456853)	80 (100)	0 (0)	0 (0)
15	Gabrb1	C/T (rs13456852)	71 (88,75)	8 (10)	1 (1,25)
16	Gabrb1	C/T (rs13456851)	69 (86,25)	11 (13,75)	0 (0)

Примечание: NN – гомозигота по «дикому» аллелю, NM – гетерозигота, MM – гомозигота по «редкому» аллелю. В скобках указана частота.

rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638, rs13456854, rs13456852, rs13456851, rs105096249, rs197596713). При этом для полиморфизмов rs13456853, rs107063497, rs107413315, rs105966045, rs106047548 были обнаружены только гомозиготы по «дикому» аллелю. В связи с этим можно предположить, что полиморфные варианты, для которых обнаружено генетическое разнообразие, могут влиять на уровень экспрессии и впоследствии на формирование ответа организма при острой интоксикации этанолом.

При анализе уровня экспрессии генов в каждом образце определяли значения порогового цикла амплификации для генов-мишеней и гена-рефери (18s-РНК). С помощью математических преобразований полученные данные переводили в относительный уровень экспрессии для конкретного животного. Стоит отметить, что в образцах крови и печени лабораторных крыс экспрессия генов-мишеней не обнаружена. Однако в образцах головного мозга экспрессия изучаемых генов выявлена.

При проведении статистического анализа

установлена корреляция полиморфного варианта rs197587817 гена *Gabra1* крыс с уровнем его экспрессии в головном мозге спустя 8 часов после введения этанола (табл. 2, рис. 1).

Данные, представленные в таблице 2 и на рисунке 1, демонстрируют достоверную ($p < 0,05$) ассоциацию полиморфизма rs197587817 (С/Т) с уровнем экспрессии гена *Gabra1* в головном мозге лабораторных животных после воздействия этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀ (5,1 г/кг). В ходе эксперимента установлено, что у крыс с гомозиготным вариантом генотипа ТТ (rs197587817) уровень экспрессии гена *Gabra1* (в головном мозге спустя 8 часов после введения этанола) был достоверно в 2 раза ниже по сравнению с гетерозиготным генотипом СТ. Влияние данного полиморфизма на изменение уровня экспрессии гена можно объяснить тем, что однонуклеотидная замена цитозина на тимин является синонимичной мутацией. В настоящее время предполагается, что синонимичные мутации в ДНК, изменяющие кодон РНК, но не изменяющие последовательность аминокислот, потенциально могут стать при-

Таблица 2

Относительный уровень экспрессии гена *Gabra1* в исследованной группе крыс в зависимости от генотипа

Варианты гена <i>Gabra1</i>		Относительный уровень экспрессии гена (УЭ), %	p
С/Т (rs197587817)	СТ	887,80	0,0476*
	ТТ	426,80	

Примечание: * - $p < 0,05$, *t*-критерий Стьюдента



Рис. 1. Относительный уровень экспрессии гена *Gabra1* rs197587817 в исследованной группе крыс в зависимости от генотипа.

Таблица 3

Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в зависимости от тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему белых нелинейных крыс спустя 8 часов после воздействия токсикантом

Тяжесть депримирующего действия этанола на нервную систему спустя 8 часов после воздействия токсикантом	Относительный уровень экспрессии гена (УЭ), %	p
Норма	511,57	0,00000
Оглушение	310,72	
Сопор	51,48	

Примечание: * - $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента

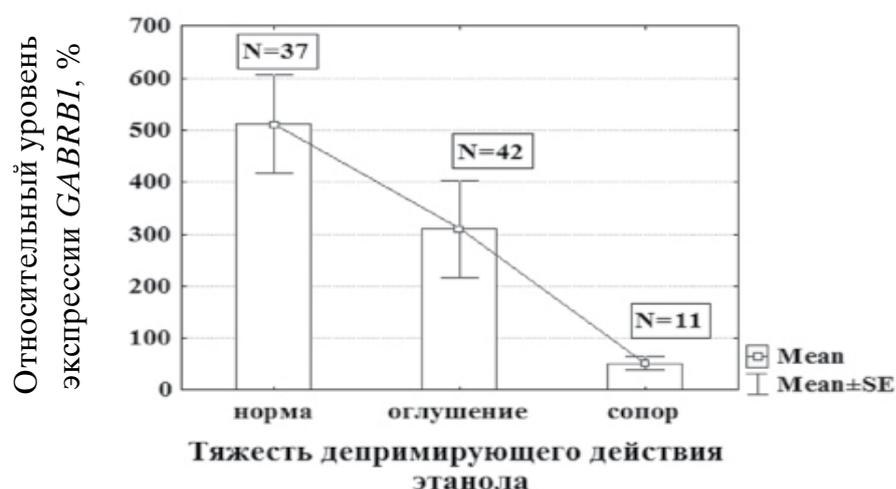


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в зависимости от тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему белых нелинейных крыс спустя 8 часов после воздействия токсикантом.

чиной изменений количества белка в клетке [18]. В связи с этим можно предположить, что крысы с гомозиготным генотипом *CC* (*rs197587817*) должны быть более устойчивы к воздействию этанола.

Для подтверждения выдвинутого предположения была проведена оценка взаимосвязи тяжести угнетения ЦНС и экспрессии генов, кодирующих ГАМК-рецепторы.

В результате выявлена достоверная ($p < 0,05$) ассоциация выраженности угнетения функционирования ЦНС спустя 8 часов после воздействия этанолом с уровнем экспрессии гена *Gabrb1* (табл. 3, рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что крысы (через 8 часов после воздействия этанолом), характеризующиеся неврологическим статусом «норма», обладали повышенным уровнем экспрессии гена *Gabrb1* по сравнению с особями, состояние которых относилось к «оглушению» и «сопору». Стоит отметить, что увеличение тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему

животного было связано с уменьшением уровня экспрессии гена *Gabrb1*.

Связь уровня экспрессии гена *Gabrb1* с изучаемыми однонуклеотидными заменами (*rs13456851*, *rs13456852*, *rs13456853*, *rs13456854*) не выявлена, что можно объяснить наличием других функционально значимых полиморфизмов и эпигенетических маркеров.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено генетическое разнообразие аллельных вариантов по 11 полиморфизмам (*rs107127945*, *rs197587817*, *rs105733011*, *rs8168342*, *rs198286814*, *rs198837638*, *rs13456854*, *rs13456852*, *rs13456851*, *rs105096249*, *rs197596713*) из 16 исследованных. Выявлено влияние полиморфного варианта *rs197587817* (C/T) на уровень экспрессии гена *Gabra1* в головном мозге крыс после интоксикации этанолом. Продемонстрирована связь тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему (спустя 8 часов после введения токсиканта) с уровнем экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bonitenko Ю.Ю.* Острые отравления этанолом и его суррогатами. СПб.: ЭЛБИ-СПБ; 2005.
2. *Курсов С.В., Михневич К.Г., Кривобок В.И.* Острое отравление этанолом. Медицина неотложных состояний. 2012; 7-8: 46-7.
3. *Stevens R.D., Nyquist P.A.* Coma, delirium, and cognitive dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin.* 2006; 22 (4): 787-804.
4. *Пиголкин Ю.И.*, ред. Судебно-медицинская диагностика отравлений спиртами. М.: Медицинское информационное агенство; 2006.
5. *ТабакOFF Б., Хоффман Л.* Нейробиологические эффекты алкоголя. Вопросы наркологии. 2003; 5: 27-42.
6. *Macgregor et al.* Associations of ADH and ALDH2 gene variation with self report alcohol reactions, consumption and dependence: an integrated analysis. *Human Molecular*

- Genetics. 2009; 18: 580-593.
7. *Schumann G., Johann M., Frank J. et al.* Systematic analysis of glutaminergic neurotransmission genes in alcohol dependence and adolescent risky drinking behavior. *Archives of General Psychiatry.* 2008; 65 (7): 826-38.
8. *Долго-Сабуров В.Б., Петров А.Н., Лисицкий Д.С., Беляев В.А.* Центральные нейрхимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. Механизмы толерантности и зависимости (обзор литературы). Биомедицинский журнал Medline. 2011; 12: 1423-36.
9. *Enoch M., Schwartz L., Albaugh B., Virkkunen M., Goldman D.* Dimensional anxiety mediates linkage of GABRA2 haplotypes with alcoholism. *American Journal of Medical Genetics.* 2006; 141: 599-607.
10. *Головко А.И., Баринов В.А.,*

- Башарин В.А., Bonitenko Е.Ю., Иванов М.Б., Головко С.И., Лапина Н.В.* Механизмы фармакологической активности антидепримирующих средств, действующих на системы ГАМК и глутаминовой аминокислоты. Биомедицинский журнал Medline. Фармакология. 2012; 13: 157-184.
11. *Pignataro L., Varodayan F.P., Tannenholz L.E., Harrison N.L.* The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacology & Therapeutics Journal.* 2009; 124 (3): 324-335.
12. *Pignataro L., Miller A.N., Ma L.* Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *The Journal of Neuroscience.* 2007; 27 (47): 12957-66.
13. *Башарин В.А.* Нейропептиды и субстраты энергетического обмена в терапии тяжелых отравлений депримирующими веществами: Дис. ... докт. мед. наук. С-П.; 2011.

14. Protocol: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits For 200 and 1000 Reactions. Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf.
15. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide.* 2010. Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf.
16. Relative Quantitation Using Comparative Ct Getting Started Guide for the 7900HT Fast System.
17. *Мисюрин В.А.* Исследование особенностей экспрессии и распространенности раково-тестикулярных генов: Дис. ... канд биол наук. М.; 2014.
18. *Duan J., Antezana M.A.* Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *Journal of Molecular Evolution.* 2003; 57 (6): 694-01.

REFERENCES:

1. *Bonitenko Yu.Yu.* Acute ethanol poisoning and its surrogates. St. Petersburg: ELBI SPB; 2005 (in Russian).
2. *Kursov S.V., Mikhnevich K.G., Krivobok V.I.* Acute poisoning with ethanol. Medical emergency conditions. 2012; 7-8: 46-7 (in Russian).
3. *Stevens R.D., Nyquist P.A.* Coma, delirium, and cognitive dysfunction in critical illness. *Crit Care Clin.* 2006; 22 (4): 787-804.
4. *Pigolkin Yu.I.* Forensic medical diagnostics alcohol poisoning. M.: Medical News Agency; 2006 (in Russian).
5. *Tabakoff B., Khoffman L.* Neurobiological effects of alcohol. *Addiction issues.* 2003; 5: 27-42 (in Russian).
6. *Macgregor et al.* Associations of ADH and ALDH2 gene variation with self report alcohol reactions, consumption and dependence: an integrated analysis.

- Human Molecular Genetics.* 2009; 18: 580-93.
7. *Schumann G., Johann M., Frank J. et al.* Systematic analysis of glutaminergic neurotransmission genes in alcohol dependence and adolescent risky drinking behavior. *Archives of General Psychiatry.* 2008; 65 (7): 826-38.
8. *Dolgo-Saburov V.B., Petrov A.N., Lisitskiy D.S., Belyaev V.A.* The central neurochemical effects of acute and chronic influence of ethanol. The mechanisms of tolerance and dependence (Review). *Biomedical Journal Medline.* 2011; 12: 1423-36 (in Russian).
9. *Enoch M., Schwartz L., Albaugh B., Virkkunen M., Goldman D.* Dimensional anxiety mediates linkage of GABRA2 haplotypes with alcoholism. *American Journal of Medical Genetics.* 2006; 141: 599-607.

10. *Golovko A.I., Barinov V.A., Basharin V.A., Bonitenko E.Ju., Ivanov M.B., Golovko S.I., Lapina N.V.* Pharmacological activity of the amethystic agents influencing the gaba and glutamic acid systems. *Biomedical Journal Medline. Pharmacology.* 2012; 13: 157-84 (in Russian).
11. *Pignataro L., Varodayan F.P., Tannenholz L.E., Harrison N.L.* The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacology & Therapeutics Journal.* 2009; 124 (3): 324-335.
12. *Pignataro L., Miller A.N., Ma L.* Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *The Journal of Neuroscience.* 2007; 27 (47): 12957-66.
13. *Basharin V.A.* Neuropeptides and substrates of energy metabolism in the treatment of severe poisoning deprimiruyushchie substances: Dis. ... Doctor. honey. Sciences. S-P.; 2011. (in Russian).

14. Protocol: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits For 200 and 1000 Reactions. Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf.
15. *TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide.* 2010. Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf.
16. Relative Quantitation Using Comparative Ct Getting Started Guide for the 7900HT Fast System.
17. *Misiurin V.A.* Investigation of the features of expression and prevalence of testicular cancer-gene: Dis. ... Candidate Biol of Sciences. M.; 2014 (in Russian).
18. *Duan J., Antezana M.A.* Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *J Mol Evol.* 2003; 57 (6): 694-01.

N.S. Osechkina¹, G.V. Nazarov², E.Yu. Bonitenko¹, M.B. Ivanov¹, V.A. Kashuro¹, N.V. Lapina¹, A.V. Babkin², I.S. Berdinskiy², A.S. Melekhova¹, K.O. Voytsekhovich¹, D.S. Lisitskiy¹, N.V. Makarova¹, T.V. Kashina¹

THE EXPRESSION AND POLYMORPHISM INFLUENCE OF GENES, ENCODING THE GABA-RECEPTORS, ON SEVERITY OF THE ETHANOL DEPRESSING ACTION IN RATS

¹Federal State Budgetary Science Institution «Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

²Scientific Research Test Institute of Military Medicine, S.M. Kirov Medical Military Academy, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

Expression and polymorphism of encoding the Gaba-receptors of genes, which determine the severity of the depressing effect of ethanol in white outbred rats were studied. In the course of the experiment, genotyping of animals was made using 16 single-nucleotide replacements in genes encoding the GABA. The genetic diversity of allelic variants was revealed, based on 11 polymorphisms. It was found out that in rats with the genotype homozygous variant TT (rs 197587817) the expression level of gene Gabra 1 (in brain 8 h after administration of ethanol) was authentically lower (2-fold) as compared to the heterozygous genotype CT. An authentic association of the gene Gabra1 expression level ($p < 0.05$) with the severity degree of the ethanol depressing effect on the nervous system in rats 8 h after administration of the toxicant was demonstrated.

Key words: the GABA-receptors, genetic polymorphism, gene expression, ethanol.

Материал поступил в редакцию 03.10.2014 г.