

УДК 591.55;612.821.3

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫМИ СИСТЕМАМИ В ГИПОТАЛАМУСЕ САМЦОВ МЫШЕЙ

© 2024 г. И. Л. Коваленко^{1,*}, А. Г. Галямина¹, Д. А. Смагин¹, Н. Н. Кудрявцева^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: koir0909@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Хронический социальный стресс, вызванный повторным негативным опытом в агонистических взаимодействиях, вызывает формирование депрессивноподобного состояния у самцов мышей. Цель исследования – изучить изменения экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в метаболизме, рецепции, транспорте катехоламинов, опиоидов, глутамата и ГАМК, в гипоталамусе под влиянием хронического социального стресса. Образцы гипоталамуса были секвенированы методом RNA-Seq. Было показано, что экспрессия катехоламинергических генов *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Ppp1r1b*, *Sncb*, *Sncg* и *Th* у животных с депрессивноподобным состоянием повышается, а экспрессия генов *Maoa* и *Maob* снижается. Экспрессия опиоидергических и каннабиноидергических генов *Pdyn*, *Penk*, *Pomc*, *Pnoc*, *Ogfr* и *Faah* была повышена, в то время как, экспрессия генов *Oprk1*, *Oprcl1*, *Ogfrl1* и *Cnr1* снижена. Экспрессия глутаматергических генов *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grm2* и *Grm4* повышается, а генов *Gria3*, *Grik1*, *Grik2*, *Grin2a*, *Grin3a*, *Grm5*, *Grm8* и *Gad2* снижается по сравнению с контрольными животными. Экспрессия ГАМКергических генов *Gabre*, *Gabbr2* и *Slc6a11* была выше, а генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, и *Slc6a13* была ниже у животных с депрессивноподобным состоянием. Анализ полученных данных позволяет предположить, что продукты генов, через которые осуществляются взаимосвязи с другими нейротрансмиттерными системами (*Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1* и *Pdyn*), могут представлять интерес в качестве потенциальных мишеней для фармакологической коррекции последствий хронического социального стресса.

Ключевые слова: гипоталамус, хронический социальный стресс, депрессия, гены нейротрансмиттерных систем, RNA-Seq.

DOI: 10.31857/S0016675824060047 EDN: BXZTVB

Стресс, вызванный повторным опытом поражений в межсамцовых конфронтациях, вызывает формирование депрессивноподобного состояния у самцов мышей (далее депрессивные животные) [1, 2], сходного по всем критериям с данной патологией у человека. При развитии депрессивного состояния в мозге животных обнаружены изменения в активности многих нейротрансмиттерных систем. Так, у депрессивных животных отмечается снижение уровня серотонина (5-НТ) и/или его основного метаболита 5-ГИУК. Кроме того, снижается активность

триптофангидроксилазы, которая играет главную роль в синтезе серотонина [2–4], а также наблюдается снижение экспрессии серотонергических генов *Tph2*, *Sert* (*Slc6a4*), *MaoA*, *5-HT1a* [5], кодирующих триптофангидроксилазу, серотониновый транспортер, моноаминоксидазу А и серотониновые рецепторы первого типа, соответственно. У животных после хронического социального стресса были отмечены изменения в уровне дофамина в разных отделах головного мозга [2, 6, 7]. В целом результаты свидетельствовали о гипофункции дофаминергической и серотонергической

систем, развившейся под влиянием длительного социального стресса у самцов мышей [2]. Также данные литературы свидетельствуют о том, что тревожные расстройства и депрессия могут приводить к дисбалансу между глутаматергическим возбуждением и ГАМКергическим торможением в лимбических областях [8, 9]. Однако выраженность изменений показателей нейротрансмиттеров зависит от длительности социального стресса и отдела головного мозга. Согласно литературным данным, при депрессии также показана дисрегуляция эндогенной опиоидергической системы [10]. В постмортальных образцах мозга депрессивных больных и на лабораторных моделях у животных обнаружена повышенная экспрессия генов эндогенных опиатов и показан их продепрессивный эффект [11–13]. Так, можно наблюдать активацию предшественников опиатов при сниженной экспрессии рецепторов, что может свидетельствовать о снижении реакции на опиоиды. Таким образом, многие экспериментальные и клинические исследования подтверждают, что под влиянием хронического социального стресса в мозге животных обнаружены изменения в активности многих нейротрансмиттерных систем [14–17].

Хорошо известно участие гипоталамуса в регуляции стресса, процессах выработки гормонов, участвующих в координации различных физиологических функций и психоэмоциональных состояний. Кроме того, из наших предыдущих данных было известно, что наибольшее количество всех дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) наблюдалось именно в этой области, что может отражать вовлечённость гипоталамуса в развитие реакции на социальный стресс. Поэтому целью исследования было изучить изменения экспрессии генов кодирующих белки, участвующие в метаболизме, рецепции, транспорте катехоламинов, опиоидов, глутамата и ГАМК, в гипоталамусе (ГПТ) самцов мышей под влиянием хронического социального стресса. Также мы планировали обнаружить возможные функциональные взаимосвязи между ДЭГ разных нейротрансмиттерных систем и выделить гены, являющиеся потенциальными связующими звеньями между ними.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа была выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 10–12 недель и массой тела 26–28 г. Эксперимент проводили в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН в стандартных условиях со световым режимом свет/темнота – 12/12 ч. Сухой лабораторный корм и вода у животных были в свободном доступе. Все процедуры проводились

в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes).

Хронический социальный стресс вызывали у самцов мышей повторным опытом социальных поражений в ежедневных агонистических взаимодействиях [1, 18]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое воздействие. Ежедневно во второй половине дня убирали перегородку, что приводило к агонистическим взаимодействиям. Во время первых двух–трех дней тестов выявляли победителей и особей, терпящих поражения при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Взаимодействие самцов прекращали, если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время столкновений длились более трех минут, устанавливая между ними перегородку. В других ситуациях тест продолжался 10 мин. После трех недель у самцов с повторным опытом социальных поражений развивается депрессивноподобное состояние [2, 19, 20], удовлетворяющее всем критериям, принятым для диагностирования на моделях депрессии: сходство этиологического фактора, симптоматики, чувствительности к антидепрессантам, и нейрохимическим изменениям, наблюдаемым у пациентов с диагнозом депрессия.

Для транскриптомного анализа отбирали животных (из количества 12 особей в группе) с наиболее выраженными признаками патологии поведения. Животные были декапитированы на следующий день после последней конфронтации одновременно с контрольными особями. Отделы мозга извлекались одним исследователем в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brainmap.org/static/atlas>). Все образцы помещались в раствор RNAlater (Life Technologies, США) и хранились при температуре -70°C до секвенирования. В эксперименте были исследованы две группы животных: 1) самцы с депрессивноподобным состоянием, потерпевшие социальные поражения в течение 20 дней агонистических взаимодействий; 2) контрольные животные – особи без последовательного опыта агонистических взаимодействий.

RNA-Seq анализ. Анализ проб выполнялся в ООО “Геноаналитика” (<http://genoanalytica.ru>, Москва) методом RNA-Seq, используя не менее 20 млн прочтений ДНК для каждого образца. Все

образцы секвенировались отдельно. мРНК экстрагировали с использованием кита Dynabeads RNA Purification Kit (Ambion, США). Библиотеки кДНК были сконструированы с использованием протокола производителя NEBNext для Illumina (NEB E7770, New England Biolabs, Inc., Ипсвич, Массачусетс, США). Секвенирование библиотек кДНК было выполнено на платформе Illumina HiSeq 1500 (Illumina Sequencing, США). Картирование полученных ридов (прочтений) ДНК из файлов в формате fastq на референсный геном мыши GRCm38.p3 выполнялось с помощью программы TopHat. Пакет программ Cufflinks/Cuffdiff был использован для того, чтобы оценить уровень экспрессии транскриптов в единицах FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) и выявить ДЭГ. Только аннотированные гены были взяты для последующего анализа. Дифференциально экспрессирующимися считали гены, уровень экспрессии которых статистически значимо различался у контрольных и депрессивных мышей ($p < 0.05$). Решение о статистически значимых различиях экспрессии принималось также с использованием поправки на множественные сравнения (q -значения – скорректированные p -значения по методу Беньямини–Хохберга (FDR)). В каждой группе было проанализировано по три животных.

Базы данных и функциональная аннотация ДЭГ. Для анализа гены нейротрансмиттерных систем (катехоламинергических, опиоидергических, глутаматергической и ГАМКергической) отбирались по базе данных генов человека (The Human Gene Database, <http://www.genecards.org/>), онлайн каталогу генов человека и генетических болезней (OMIM, <http://omim.org/>), базе данных болезней человека (MalaCards, <http://www.malacards.org>). Далее в результатах представлены отобранные и исследованные гены, у которых обнаружены статистически значимые изменения экспрессии (ДЭГ). Для исследования взаимодействия белков использовали базу данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <http://string-db.org>). Использовались также ресурсы базы данных литературы PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДЭГ катехоламинергических систем

Были исследованы следующие гены, относящиеся к катехоламинергическим системам: *Th*, *Ddc*, *Dbh*, *Maoa*, *Maob*, *Comt*, *Ppp1r1b*, *Slc6a3*, *Slc6a2*, *Slc18a2*, *Drd1*, *Drd2*, *Drd3*, *Drd4*, *Drd5*, *Adra1a*, *Adra1b*, *Adra1d*, *Adra2a*, *Adra2b*, *Adra2c*, *Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*, *Snca*, *Sncb*, *Sncg*, *Adrbk1*, *Adrbk2*.

Из них у депрессивных животных изменилась экспрессия девяти генов (рис. 1). Уровень экспрессии генов *Adra1b* ($p = 0.002$, $q = 0.015$), *Adrbk1* ($p < 0.001$, $q = 0.006$), *Comtd1* ($p = 0.048$), *Ppp1r1b*# ($p = 0.006$, $q = 0.034$), *Sncb* ($p = 0.021$), *Sncg* ($p = 0.007$, $q = 0.037$) и *Th*# ($p < 0.001$, $q < 0.001$) был повышен. У генов *Maoa*# ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$) и *Maob*# ($p = 0.034$) экспрессия была снижена по сравнению с контролем.

В нашем эксперименте происходит активация катехоламинергических систем у депрессивных животных, что подтверждается повышением экспрессии генов *Th*, *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Snca*, *Sncb*, а также гена *Ppp1r1b*, что может являться следствием реакции на стрессорное воздействие. Увеличение экспрессии гена *Th* у таких животных может свидетельствовать об активации синтеза дофамина и норадреналина в ГПТ. В зависимости от длительности стрессорного воздействия тирозингидроксилаза может активироваться как в синем пятне головного мозга, так и в надпочечниках, но эти эффекты опосредованы различными транскрипционными факторами [22, 23].

Ранее в нашей лаборатории было проанализировано изменение экспрессии серотонергических генов, кодирующих белки, которые вовлечены в синтез, инактивацию, рецепцию серотонина, а также генов, кодирующих транскрипционные и нейротрофические факторы в пяти отделах головного мозга самцов мышей с тревожно-депрессивным расстройством [24].

Подробный транскрипционный анализ показал, что в ГПТ у депрессивных самцов была снижена экспрессия генов *Maoa*, *Maob* (эти гены считаются общими для серотонергической и катехоламинергических систем) и *Creb1*, и повышена экспрессия генов *Htr6* и *Aldh1b1*. Таким образом, снижение экспрессии генов *Maoa* и *Maob*, кодирующих ферменты катаболизма катехоламинов, и при этом повышение экспрессии гена *Aldh2*, который кодирует альдегид-дегидрогеназу 2, в ГПТ могут свидетельствовать о возможной активации катаболизма дофамина, а также о снижении процессов разрушения и более длительном действии норадреналина.

Также нами было обнаружено изменение экспрессии генов, кодирующих синуклеины – белки, которые регулируют синтез моноаминов, их хранение в везикулах и высвобождение в синапсе [25], а также обратный захват из синаптической щели [26]. Так, в ГПТ было показано увеличение экспрессии генов *Sncb* и *Sncg*. Хотя в других отделах головного мозга на используемой модели изменения экспрессии генов синуклеинов имели разнонаправленный характер. Так, например, в гиппокампе было показано увеличение экспрессии гена

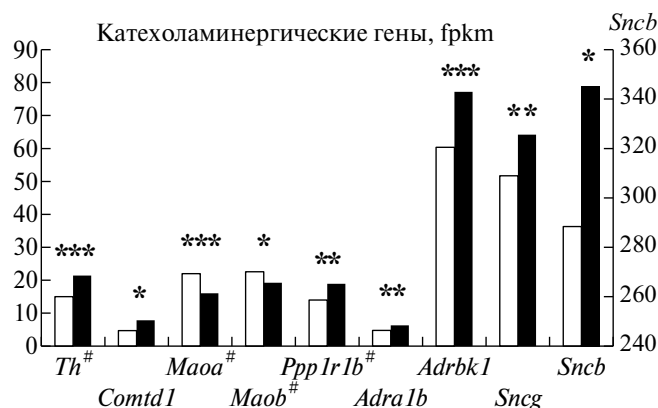


Рис. 1. Экспрессия ДЭГ катехоламинергических систем в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. контроль. Для гена *Sncb* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах ФРКМ. # – ранее опубликованные данные [21].

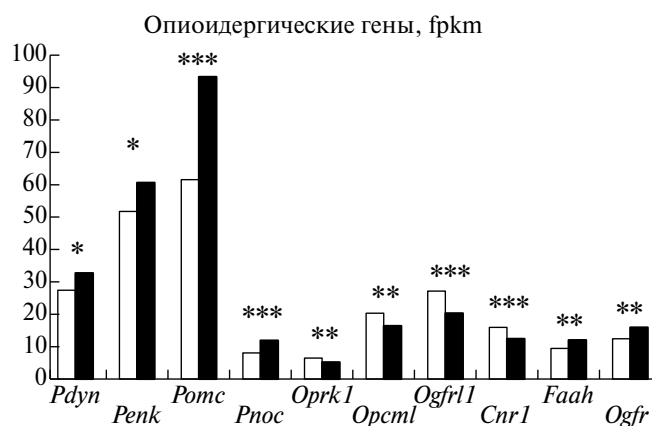


Рис. 2. Экспрессия ДЭГ опиоидергических и каннабиноидной систем в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. контроль. Данные выражены в единицах ФРКМ.

Sncb, в стриатуме – снижение экспрессии гена *Sncb* и увеличение экспрессии *Sncb*, в вентральной тегментальной области и ядрах шва среднего мозга произошло снижение экспрессии гена *Sncg* [27]. Роль α -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона и других заболеваний человека, известных как α -синуклеинопатия, хорошо известна. В частности, есть данные об участии альфа-синуклеина в развитии депрессии у людей [28]. Участие двух других членов семейства синуклеинов, β -синуклеина и γ -синуклеина, при депрессии изучено мало. Однако есть данные, что они вовлечены в

процессы нейродегенерации. При этом показано, что альфа-синуклеин и бета-синуклеин обладают противоположными эффектами [29], и гамма-синуклеин может быть вовлечен в нейрорепаративные изменения и гибель восприимчивых нейронов.

ДЭГ опиоидергических и каннабиноидной систем

Из генов опиоидергической и каннабиноидной систем были исследованы следующие гены: *Oprm1*, *Oprl1*, *Oprk1*, *Cnr1*, *Cnr2*, *Penk*, *Pdyn*, *Pnoc*, *Pomc*, *Ogfr*, *Ogfrl1*, *Opclm1*, *Faah*.

У депрессивных животных изменилась экспрессия, у 10 из исследованных генов (рис. 2). Среди генов опиоидергических и каннабиноидной систем повысилась экспрессия генов *Faah* ($p = 0.004$, $q = 0.024$), *Pdyn* ($p = 0.022$), *Penk* ($p = 0.048$), *Pnoc* ($p < 0.0001$, $q < 0.001$), *Pomc* ($p < 0.0001$, $q < 0.001$), *Ogfr* ($p = 0.002$, $q = 0.012$). При этом была снижена экспрессия генов *Cnr1* ($p < 0.001$, $q < 0.01$), *Ogfrl1* ($p < 0.0001$, $q = 0.002$), *Opclm1* ($p = 0.005$, $q = 0.029$), *Oprk1* ($p = 0.007$, $q = 0.038$) по сравнению с контрольными животными.

Известно, что длительный прием опиатов может вызывать симптомы депрессии у людей [30, 31]. Кроме того, при депрессии отмечается дисрегуляция эндогенной опиоидергической системы [10]. В настоящем исследовании мы обнаружили увеличение экспрессии генов *Penk*, *Pdyn*, *Pnoc* и *Pomc*, кодирующих белки-предшественники эндогенных опиатов. При этом полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым повышенная экспрессия генов эндогенных опиатов наблюдается в посмертных образцах мозга депрессивных больных, либо показан их продепрессивный эффект в лабораторных моделях [11–13]. Таким образом, мы можем видеть активацию предшественников опиатов при сниженной экспрессии рецепторов, что может свидетельствовать о снижении реакции на опиоиды.

Также была увеличена экспрессия гена *Faah*, кодирующего гидролазу амидов жирных кислот, и гена *Ogfr*, кодирующего рецептор опиоидного фактора роста. Согласно базе данных GeneCards, заболевания, связанные с ФААН, включают полинаркоманию и зависимость от каннабиса. При этом данные относительно участия ФААН в механизмах депрессии противоречивы. С одной стороны, генетическая предрасположенность к депрессии связывается с низкой активностью этого фермента [32], с другой стороны, для ее ингибитора показан антидепрессивный эффект [33]. Ген *Ogfr*, как правило, не рассматривается с точки зрения его участия в развитии депрессии, для него более изучено вовлечение в механизмы формирования аддиктивных состояний, в иммунные процессы и

механизмы канцерогенеза, в частности с усилением аутоиммунной активности, что нетипично для животных с депрессивноподобным поведением.

Также мы обнаружили снижение экспрессии генов *Cnr1*, *Ogfr1*, *Opcml*, *Oprk1*, кодирующих каннабиноидный рецептор, рецептор опиоидного фактора роста, белок, связывающий опиоиды/молекула клеточной адгезии, каппа опиоидный рецептор первого типа, соответственно. Снижение экспрессии опиоидергических рецепторов возможно является компенсаторной реакцией на сенситизацию, развивающуюся в ответ на усиление экспрессии эндогенных опиатов. В то же время известно, что полиморфизм по генам *Cnr1* и *Oprk1* связан с выраженностью депрессии у людей [34–36]. Что касается гена *Opcml*, то для него существуют данные, свидетельствующие о связи полиморфизма с развитием депрессии [37], но в целом его роль в развитии этого заболевания не исследована. Таким образом, наши результаты как подтверждают известные ранее данные об активации опиоидергических систем при депрессии, так и выявляют новые опиоидные гены для дальнейшего исследования их роли в развитии этой патологии. Однако необходимо учесть, что эти изменения наблюдаются в ГПТ, в то время как в других отделах мозга в зависимости от основной функции показатели нейрогеномных изменений могут различаться.

ДЭГ глутаматергической системы

Из генов глутаматергической системы были исследованы гены: *Gria1*, *Gria2*, *Gria3*, *Gria4*, *Grik1*, *Grik2*, *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grin2d*, *Grin3a*, *Grin3b*, *Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm4*, *Grm5*, *Grm6*, *Grm7*, *Grm8*, *Slc17a6*, *Slc17a7*, *Slc17a8*, *Grid1*, *Grid2*, *Grid2ip*, *Gad1*, *Gad2*.

У депрессивных животных в ГПТ изменилась экспрессия 14 генов (рис. 3). Среди них оказалась повышенной экспрессия генов *Grik3* ($p = 0.029$), *Grik4* ($p < 0.0001$, $q = 0.004$), *Grik5* ($p = 0.003$, $q = 0.017$), *Grin1* ($p = 0.0006$, $q = 0.006$), *Grm2* ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$), *Grm4* ($p < 0.0001$, $q = 0.006$) и была снижена экспрессия у генов *Gria3* ($p = 0.005$, $q = 0.031$), *Grik1* ($p = 0.018$), *Grik2* ($p = 0.013$, $q = 0.059$), *Grin2a* ($p = 0.038$), *Grin3a* ($p = 0.045$), *Grm5* ($p = 0.003$, $q = 0.020$), *Grm8* ($p = 0.035$), *Gad2* ($p = 0.021$).

В литературе показано, что глутаматергическая система вовлечена в развитие тревожного и депрессивного поведения. Так, в некоторых работах описывают антидепрессивный эффект агонистов AMPA-рецепторов [38], в то время как анксиолитическое действие показано для их антагонистов [39, 40]. В нашем исследовании мы обнаружили снижение экспрессии гена *Gria3*, кодирующего 3 субъединицу ионотропного

AMPA-рецептора, что хорошо согласуется с литературными данными о том, что у нокаутов по гену AMPA-рецептора можно наблюдать депрессивноподобное состояние [41]. Среди генов глутаматергической системы у животных с депрессивноподобным состоянием была повышенной экспрессия гена *Grin1* и сниженной у генов *Grin2a* и *Grin3a*, кодирующих 1, 2A, 3A субъединицы ионотропного NMDA-рецептора. Согласно литературным данным, на лабораторных моделях животных, только для полных агонистов и антагонистов NMDA-рецепторов показано, что они могут проявлять как антидепрессивный [42], так и анксиолитический эффекты [43, 44]. Известно, что под влиянием хронического социального стресса происходит длительная активация глутаматергических NMDA-рецепторов [45], что хорошо согласуется с нашими данными по гену *Grin1*. У животных с тревожно-депрессивным поведением увеличивается экспрессия генов *Grm2* и *Grm4*, кодирующих метаботропные рецепторы 2, 4 подтипов, в гиппокампе [46], как и у наших животных с депрессивноподобным состоянием в ГПТ.

В целом, хотя и показаны изменения экспрессии глутаматергических генов при депрессии, механизмы участия белков, кодируемых этими генами, пока мало изучены. Анализ ДЭГ в нашем исследовании с использованием базы данных STRING (<http://string-db.org/>) позволяет предположить, что основную роль в нарушении баланса между нейротрансмиссивными системами под влиянием хронического социального стресса могут играть ионотропные NMDA-рецепторы.

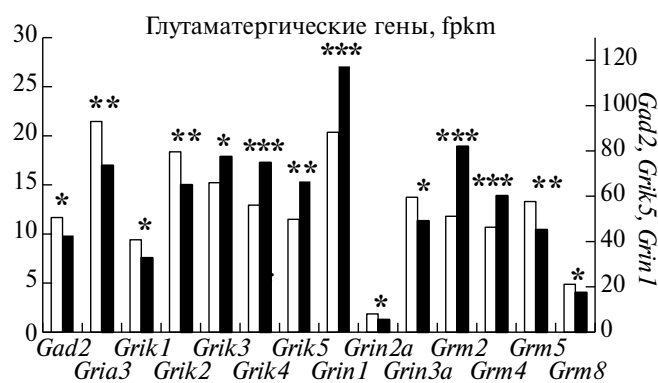


Рис. 3. Экспрессия ДЭГ глутаматергической системы в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. контроль. Для генов *Gad2*, *Grik5*, *Grin1* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах FPKM.

ДЭГ ГАМКергической системы

Из генов ГАМКергической системы были исследованы гены: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, *Gabrg3*, *Gabrd*, *Gabre*, *Gabrp*, *Gabrq*, *Gabbr1*, *Gabbr2*, *Gabbr3*, *Slc6a11*, *Slc6a13*.

Изменилась экспрессия у 11 из исследованных генов (рис. 4). Среди генов ГАМКергической системы повысилась экспрессия генов *Gabre* ($p = 0.004$, $q = 0.027$), *Gabbr2* ($p = 0.043$), *Slc6a11* ($p = 0.011$, $q = 0.051$). При этом снижена экспрессия генов *Gabra1* ($p < 0.0001$, $q = 0.002$), *Gabra2* ($p < 0.001$, $q = 0.010$), *Gabra3* ($p = 0.005$, $q = 0.029$), *Gabrb2* ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$), *Gabrb3* ($p = 0.020$), *Gabrg1* ($p < 0.001$, $q = 0.008$), *Gabrg2* ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$), *Slc6a13* ($p < 0.0001$, $q < 0.0001$).

В нашем эксперименте у депрессивных животных в ГПТ происходит снижение экспрессии ГАМКергических генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, кодирующих различные субъединицы рецепторов ГАМК, и гена *Slc6a11*, кодирующего белки переносчиков ГАМК. Также о снижении активности ГАМКергической системы свидетельствует сниженная экспрессия гена *Gad2*. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными, которые подтверждают низкую экспрессию фермента глутаматдекарбоксилазы у пациентов с депрессивным расстройством [8, 9]. В литературе хорошо освещена вовлеченность ГАМКергической системы в механизмы тревоги и депрессии. Так, например, при исследовании лабораторных животных обнаружено снижение экспрессии разных субъединиц ГАМКа-рецептора у высокотревожных животных и животных с

депрессивным расстройством [47, 48]. На активации рецепторов ГАМК основан принцип действия бензодиазепиновых анксиолитиков. Также показано усиление экспрессии ГАМКергических рецепторов под влиянием антидепрессантов [49, 50].

Функциональные взаимосвязи ДЭГ нейротрансмиттерных систем в ГПТ у депрессивных животных по данным сети функциональных белковых ассоциаций STRING (<https://string-db.org/>)

Для исследования взаимосвязей между ДЭГ разных нейротрансмиттерных систем нами была построена сеть функциональных белковых ассоциаций ДЭГ (рис. 5).

При рассмотрении на рис. 5 каждой из нейротрансмиттерных систем (системы обведены овалами: катехоламинергическая, опиоидергическая, глутаматергическая и ГАМКергическая) можно отметить, что наибольшее число взаимосвязей установлено между продуктами генов, относящимися к одной медиаторной системе, и выделить основной связующий ген, на который замыкается наибольшее число генов в одной системе.

Значимая роль в координации катехоламинергических систем была выделена для гена *Th*, который является основным ферментом синтеза тирозингидроксилазы и напрямую взаимосвязан с геном *Maob*, кодирующим ферменты катаболизма катехоламинов. Для опиоидергической системы таким геном может быть продинорфин *Pdyn*, который напрямую взаимосвязан с основными генами внутри системы (*Pnoc*, *Pomc*, *Penk*, *Oprk1*), а также взаимодействует с глутаматергической системой через гены *Grin1* и *Grin3a*, кодирующие глутаматные рецепторы. Согласно литературным данным, существует отрицательная взаимосвязь между уровнем экспрессии гена *Pdyn* и количеством глутаматергических рецепторов [51, 52]. Для глутаматергической системы таким геном, координирующим работу других рецепторных генов, может быть ген *Grin1*, кодирующий ионотропные NMDA-рецепторы первого подтипа. Для ГАМКергической системы основными генами могут быть гены, кодирующие 1 и 2 подтипы α -субъединицы ГАМКа-рецептора *Gabra1* и *Gabrg2*, осуществляя функциональную взаимосвязь с другими нейротрансмиттерными системами. Возможно, что взаимодействие гена *Th* и глутаматергической системы осуществляется через *Gad2*, ген фермента метаболизма глутамата. Также через ген *Gad2* осуществляется взаимодействие между глутаматергической (через *Grin1*) и ГАМКергической (через *Gabra1* и *Gabrg2*) системами. Известно, что эти нейротрансмиттерные системы

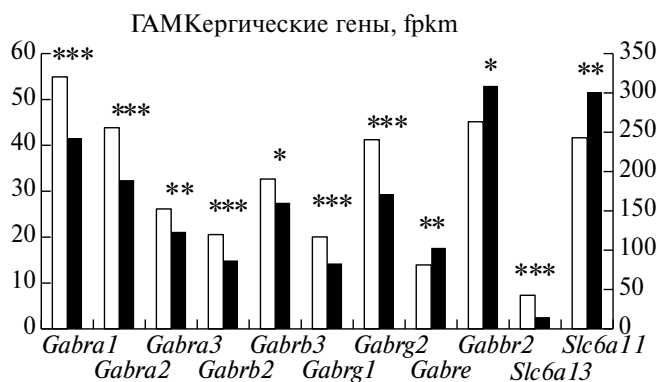


Рис. 4. Экспрессия ДЭГ ГАМКергической системы в ГПТ у депрессивных самцов мышей. Белые столбцы – контроль, темные столбцы – депрессивные мыши. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. контроль. Для гена *Slc6a11* представлена вспомогательная шкала. Данные выражены в единицах ФРКМ.

Также в результате многолетних исследований в нашей лаборатории было показано, что депрессивное расстройство у животных сопровождается развитием психогенного иммунодефицита, проявляющегося в снижении общей резистентности, нарушении гуморального и клеточного иммунитета, процессов пролиферации и апоптоза в иммунокомпетентных органах и усилении процессов онкогенеза [55]. Таким образом, изменения метаболических процессов и рецепторной функции, возникающие в ГПТ в процессе формирования депрессивного состояния, создавая дисбаланс в работе нейромедиаторных систем, могут влиять и на работу генов, однако последовательности молекулярных событий предстоит еще выявить.

Настоящее исследование показало, что в ГПТ, как и в других отделах мозга, хронический социальный стресс приводит к нарушениям в работе нейротрансмиттерных систем не только на уровне синтеза, рецепции и метаболизма сигнальных молекул, но и на уровне функционирования генов. В целом для катехоламинергической, опиоидергической и глутаматергической систем отмечается увеличение экспрессии генов, при этом экспрессия генов ГАМКергической системы снижается. Можно предположить, что ключевую роль в нарушении работы различных нейротрансмиттерных систем играют гены *Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1* и *Pdyn*. При этом в качестве связующего гена между этими системами можно выделить ген *Gad2*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы благодарны ИЦиГ СО РАН (БП №FWNR-2022-0019) за содержание животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-10095).

Исследование одобрено Этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН, Научной комиссией № 9 (март, 24, 2010, № 613).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryavtseva N.N., Bakshantovskaya I.V., Koryakina L.A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991. V.38. P. 315–320, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90284-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90284-9)
2. Августинович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бакштановская И.В. и др. Динамические изменения серотонергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование // *Успехи физиол. наук.* 2004. Т. 35. С. 19–40.
3. Кудрявцева Н.Н., Амстиславская Т.Г., Августинович Д.Ф. и др. Влияние хронического опыта побед и поражений в социальных конфликтах на состояние серотонергической системы головного мозга мышей // *Журн. высшей нервной деят. им. И.П. Павлова.* 1996. Т. 46. С. 1088–1096.
4. Amstislavskaya T.G., Kudryavtseva N.N. Effect of repeated experience of victory and defeat in daily agonistic confrontations on brain tryptophan hydroxylase activity // *FEBS Lettr.* 1997. V. 406. P. 106–108. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00252-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00252-4)
5. Smagin D., Boyarskikh U., Bondar N. et al. Reduction of serotonergic gene expression in the raphe nuclei of the midbrain under positive fighting experience in male mice // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013. V. 4. P. 36–44.
6. Puglisi-Allegra S., Cabib S. Effects of defeat experiences on dopamine metabolism in different brain areas of the mouse // *Aggress. Behav.* 1990. V. 16. P. 271–284. <https://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.9.863689>
7. Tidey J.W., Miczek K.A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: An in vivo microdialysis study // *Brain. Res.* 1996. V. 721. P. 140–149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00159-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00159-x)
8. Fatemi S.H., Stary J.M., Earle J.A. et al. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum // *Schizophr. Res.* 2005. V. 72. P. 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2004.02.017>
9. Karolewicz B., Maciag D., O'Dwyer G. et al. Reduced level of glutamic acid decarboxylase 67 kDa in the prefrontal cortex in major depression // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2010. V. 13. P. 411–420. <https://doi.org/10.1017/S1461145709990587>
10. Browne C.A., Lucki I. Targeting opioid dysregulation in depression for the development of novel therapeutics // *Pharmacol. Ther.* 2019. V. 201. P. 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.04.009>
11. Anderson S.A., Michaelides M., Zarnegar P. et al. Impaired periamygdaloid-cortex prodynorphin is characteristic of opiate addiction and depression // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. P. 5334–5341. <https://doi.org/10.1172/JCI70395>
12. Melo I., Drews E., Zimmer A., Bilkei-Gorzo A. Enkephalin knockout male mice are resistant to chronic mild stress // *Genes Brain Behav.* 2014. V. 13. P. 550–558. <https://doi.org/10.1111/gbb.12139>
13. Qu N., He Y., Wang C. et al. A POMC-originated circuit regulates stress-induced hypophagia, depression, and anhedonia // *Mol. Psychiatry.* 2020. V. 25.

- P. 1006–1021.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0506-1>
14. *Parsons C.G., Danysz W., Quack G.* Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update // *Drug. News. Perspect.* 1998. V. 11. P. 523–569.
<https://doi.org/10.1358/dnp.1998.11.9.863689>
 15. *Nestler E.J., Carlezon W.A. Jr.* The mesolimbic dopamine reward circuit in depression // *Biol. Psychiatry.* 2006. V. 59. P. 1151–1159.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>
 16. *Hashimoto K.* Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder // *Brain. Res. Rev.* 2009. V. 61. P. 105–123.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.05.005>
 17. *Barker D.J., Root D.H., Zhang S., Morales M.* Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area // *J. Chem. Neuroanat.* 2016. V. 73. P. 33–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.12.016>
 18. *Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B.* Repeated positive fighting experience in male inbred mice // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. P. 2705–2717.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.156>
 19. *Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F.* Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC) // *Aggress. Behav.* 1998. V. 24. P. 271–286.
 20. *Kudryavtseva N.N.* Development of mixed anxiety/depression-like state as a consequence of chronic anxiety: Review of experimental data // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2022. V. 54. P. 125–152.
https://doi.org/10.1007/7854_2021_248
 21. *Коваленко И.Л., Смагин Д.А., Галямина А.Г. и др.* Изменение экспрессии дофаминергических генов в структурах мозга самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: данные RNA-seq // *Мол. биология.* 2016. V. 50. P. 184–187.
<https://doi.org/10.7868/S00268984116010080>
 22. *Hebert M.A., Serova L.I., Sabban E.L.* Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogenactivated protein kinases in the rat locus coeruleus // *J. Neurochem.* 2005. V. 95. P. 484–498.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03386.x>
 23. *Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M.* Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. P. 535–606.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>
 24. *Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L. et al.* Serotonergic genes in the development of anxiety/depression-like state and pathology of aggressive behavior in male mice: RNA-seq data // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. P. 251–262,
<https://doi.org/10.7868/S0026898417020136>
 25. *George J.M.* The synucleins // *Genome Biol.* 2002. V. 3.
<https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002>
 26. *Oaks A.W., Sidhu A.* Synuclein modulation of monoamine transporters // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 1001–1006.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.009>
 27. *Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N.* Changes in the expression of neurotransmitter system genes in the ventral tegmental area in depressed mice: RNA-seq data // *Neurosci. and Behav. Physiol.* 2018. V. 48. P. 591–602.
 28. *Frieling H., Gozner A., Römer K.D. et al.* Alpha-synuclein mRNA levels correspond to beck depression inventory scores in females with eating disorders // *Neuropsychobiology.* 2008. V. 58. P. 48–52.
<https://doi.org/10.1159/000155991>
 29. *Ninkina N., Peters O., Millership S. et al.* Gamma-synucleinopathy: Neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 1779–1794.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp090>
 30. *Merrill J.O., Korff M., Banta-Green C.J. et al.* Prescribed opioid difficulties, depression and opioid dose among chronic opioid therapy patients // *Gen. Hosp. Psychiatry.* 2012. V. 34. P. 581–587.
<https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2012.06.018>
 31. *Scherrer J. F., Salas J., Copeland L.A. et al.* Prescription opioid duration, dose, and increased risk of depression in 3 large patient populations // *Ann. Fam. Med.* 2016. V. 14. P. 54–62.
<https://doi.org/10.1370/afm.1885>
 32. *Lazary J., Eszlari N., Juhasz G., Bagdy G.* Genetically reduced FAAH activity may be a risk for the development of anxiety and depression in persons with repetitive childhood trauma // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016. V. 26. P. 1020–1028.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.03.003>
 33. *Wang Y., Zhang X.* FAAH inhibition produces antidepressant-like effects of mice to acute stress via synaptic long-term depression // *Behav. Brain Res.* 2017. V. 324. P. 138–145.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.054>
 34. *Domschke K., Dannlowski U., Ohrmann P. et al.* Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: Impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008. V. 18. P. 751–759.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.003>
 35. *Mitjans M., Serretti A., Fabbri C. et al.* Screening genetic variability at the CNR1 gene in both major depression etiology and clinical response to citalopram treatment // *Psychopharmacology.* 2013. V. 227. P. 509–519,
<https://doi.org/10.1007/s00213-013-2995-y>
 36. *Masih J., Verbeke W.* Exploring association of opioid receptor genes polymorphism with positive and negative moods using Positive and Negative Affective

- States Scale (PANAS) // *Clin. Exp. Psychol.* 2019. V. 5. № 1. P. 1–6.
37. *Schol-Gelok S., Janssens A. C., Tiemeier, H. et al.* A genome-wide screen for depression in two independent Dutch populations // *Biol. Psychiatry.* 2010. V. 68. P. 187–196.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.033>
38. *Li X., Tizzano J.P., Griffey K. et al.* Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098) // *Neuropharmacology.* 2001. V. 40. P. 1028–1033.
[https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00194-5](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00194-5)
39. *Kotlinska J., Liljequist S.* The putative AMPA receptor antagonist, LY326325, produces anxiolytic effects without altering locomotor activity in rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998. V. 60. P. 119–124.
[https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(97\)00565-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(97)00565-0)
40. *Walker D.L., Davis M.* The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002. V. 71. P. 379–392.
[https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00698-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00698-0)
41. *Chourbaji S., Vogt M.A., Fumagalli F. et al.* AMPA receptor subunit 1 (GluRA) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression // *FASEB J.* 2008. V. 22. P. 3129–3134.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-106450>
42. *Papp M., Moryl E.* Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression // *Eur. J. Pharmacol.* 1994. V. 263. P. 1–7.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90516-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90516-9)
43. *Wiley J.L., Cristello A.F., Balster R.L.* Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice // *Eur. J. Pharmacol.* 1995. V. 294. P. 101–107.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00506-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00506-4)
44. *Barkus C., McHugh S.B., Sprengel R. et al.* Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 626. P. 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.014>
45. *Stelly C.E., Pomrenze M.B., Cook J.B., Morikawa H.* Repeated social defeat stress enhances glutamatergic synaptic plasticity in the VTA and cocaine place conditioning // *Elife.* 2016. V. 5.
<https://doi.org/10.7554/eLife.15448>
46. *Wieronska J.M., Branski P., Szewczyk B. et al.* Changes in the expression of metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the rat hippocampus in an animal model of depression // *Pol. J. Pharmacol.* 2001. V. 53. P. 659–662.
47. *Wang H., Zhu Y.Z., Wong P. T.-H. et al.* cDNA microarray analysis of gene expression in anxious PVG and SD rats after cat-freezing test. // *Exp. Brain. Res.* 2003. V. 149. P. 413–421.
<https://doi.org/10.1007/s00221-002-1369-1>
48. *4Kroes R.A., Panksepp J., Burgdorf J. et al.* Modeling depression: Social dominance-submission gene expression patterns in rat neocortex // *Neuroscience.* 2006. V. 137. P. 37–49.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.076>
49. *Tanay V.A., Glencorse T.A., Greenshaw A.J. et al.* Chronic administration of antipanic drugs alters rat brainstem GABAA receptor subunit mRNA levels // *Neuropharmacology.* 1996. V. 35. P. 1475–1482.
[https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00065-2)
50. *Tanay V.M., Greenshaw A.J., Baker G.B., Bateson A.N.* Common effects of chronically administered antipanic drugs on brainstem GABA(A) receptor subunit gene expression // *Mol. Psychiatry.* 2001. V. 6. P. 404–412.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000879>
51. *Ménard C., Tse Y.C., Cavanagh C. et al.* Knockdown of prodynorphin gene prevents cognitive decline, reduces anxiety, and rescues loss of group 1 metabotropic glutamate receptor function in aging // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. P. 12792–12804.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0290-13.2013>
52. *Ménard C., Quirion R., Bouchard S. et al.* Glutamatergic signaling and low prodynorphin expression are associated with intact memory and reduced anxiety in rat models of healthy aging // *Front. Aging Neurosci.* 2014. V. 6.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00081>
53. *Smagin D.A., Kovalenko I.L., Galyamina A.G. et al.* Dysfunction in ribosomal gene expression in the hypothalamus and hippocampus following chronic social defeat stress in male mice as revealed by RNA-seq // *Neural. Plast.* 2016. 3289187.
54. *Raimundo N.* Mitochondrial pathology: Stress signals from the energy factory // *Trends in Molecular Medicine.* 2014. V. 20. N. 5. P. 282–292.
55. *Кудрявцева Н.Н., Шурлыгина А.В., Галямина А.Г. и др.* Иммунопатология смешанного тревожно-депрессивного расстройства: экспериментальный подход к коррекции иммунодефицитных состояний // *Журн. высшей нервной деят. им И.П. Павлова.* 2017. Т. 67. № 6. С. 671–692.

Influence of Chronic Social Stress on the Expression of Genes Associated with Neurotransmitter Systems in the Hypothalamus of Male Mice

I. L. Kovalenko^{1, *}, A. G. Galyamina¹, D. A. Smagin¹, N. N. Kudryavtseva^{1, 2}

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

²Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: koir0909@mail.ru

Chronic social stress caused by repeated negative experiences in agonistic interactions induces depressive-like behavior in male mice. The aim of the study was to study changes in the expression of genes encoding proteins involved in the metabolism, reception, and transport of catecholamines, opioids, glutamate, and GABA under the influence of chronic stress. Hypothalamic samples were sequenced using RNA-Seq. It was shown that the expression of the catecholaminergic genes *Adra1b*, *Adrbk1*, *Comtd1*, *Ppp1r1b*, *Sncb*, *Sncg*, and *Th* in depressed animals is increased, while the expression of the *Maoa* and *Maob* genes is reduced. The expression of the opioidergic and cannabinoidergic genes *Pdyn*, *Penk*, *Pomc*, *Pnoc*, *Ogfr*, and *Faah* was upregulated, while that of the *Oprk1*, *Opcml*, *Ogfrl1*, and *Cnr1* genes was downregulated. The expression of the glutamatergic genes *Grik3*, *Grik4*, *Grik5*, *Grin1*, *Grm2*, and *Grm4* was increased, while the expression of the *Gria3*, *Grik1*, *Grik2*, *Grin2a*, *Grin3a*, *Grm5*, *Grm8*, and *Gad2* genes was reduced. The expression of the GABAergic genes *Gabre*, *Gabbr2*, and *Slc6a11* was higher, while the expression of the *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabrb2*, *Gabrb3*, *Gabrg1*, *Gabrg2*, and *Slc6a13* genes was lower in depressed animals. The data suggest that gene products that interact with other neurotransmitter systems (*Th*, *Gad2*, *Gabra1*, *Gabrg2*, *Grin1*, and *Pdyn*) may be of interest as potential targets for pharmacological correction of the consequences of social stress.

Keywords: hypothalamus, chronic social stress, depression, , genes of neurotransmitter systems, RNA-Seq.