

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 612.82; 577.2; 57.026

СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ Bcl-xL В ГИППОКАМПЕ КРЫС АССОЦИИРОВАНО С ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫМ ФЕНОТИПОМ

© 2024 г. Г. Т. Шишкина^{1, *}, Д. А. Ланшаков¹, А. В. Баннова¹, Н. П. Комышева¹,
Н. Н. Дыгало¹

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

*E-mail: gtshi@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.07.2024 г.

После доработки 10.07.2024 г.

Принята к публикации 18.07.2024 г.

Выявленная ранее способность анти-апоптозного белка Bcl-xL к повышению экспрессии в гиппокампе в ответ на стресс, коррелировавшая с устойчивостью к индукции стрессом депрессии [1], указывает на потенциальную возможность использования этого белка в качестве мишени для ослабления симптомов депрессивного расстройства. Целью настоящей работы было оценить на крысах влияние подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе (с помощью TET-ON системы на основе лентивирусных векторов для контролируемой доксициклином экспрессии трансгенов) на поведение в тесте принудительного плавания. Обнаруженное снижение экспрессии (определяли иммуноблотом) Bcl-xL в гиппокампе и менее выраженное во фронтальной коре сопровождалось отчетливым депрессивно-подобным эффектом, проявляющимся меньшим латентным периодом до первого эпизода замирания и большей продолжительностью пассивного поведения. У животных, получавших совместное введение вектора и доксициклина, также обнаружено достоверное увеличение экспрессии белка мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в гиппокампе, относительного веса надпочечников и снижение стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови по сравнению с группами, получавшими отдельные введения этих препаратов. Относительные веса надпочечников достоверно отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Bcl-xL во фронтальной коре. В целом ген-направленное снижение экспрессии Bcl-xL в гиппокампе приводило у крыс к депрессивно-подобному ответу в тесте принудительного плавания. Этому поведенческому эффекту сопутствовало изменение функционирования надпочечников, проявляющееся увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в периферической циркуляции.

Ключевые слова: анти-апоптозный белок Bcl-xL, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), гиппокамп, фронтальная кора, тест принудительного плавания, кортикостерон, надпочечники

DOI: 10.31857/S1027813324030024, **EDN:** EQVQNH

ВВЕДЕНИЕ

Внешние стрессовые обстоятельства могут провоцировать развитие депрессивных расстройств, как у людей, так и в экспериментальных исследованиях на животных [2, 3]. Вместе с тем, большинство индивидуумов, столкнувшихся даже с тяжелым стрессом, сохраняют нормальные поведенческие функции, что инициировало проверку возможности терапии обусловленных стрессом психопатологий путем стимулирования у чувствительных особей механизмов естественной устойчивости [4].

Экспериментальные исследования эффектов перенесенного стресса и антидепрессантных

воздействий на животных выявили в центральной нервной системе множество изменений различных систем и функций, среди которых изменения процессов апоптоза и нейрогенеза [5–10] оказались тесно связанными с развитием депрессии и ослаблением ее симптомов. Важную роль в регуляции клеточной пролиферации и жизнеспособности нейронов играют мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и анти-апоптозные белки. В связи с психопатологиями, большее внимание исследователей исторически привлекал антиапоптозный белок Bcl-2 [11], в то время как интерес к Bcl-xL возник сравнительно недавно. В 2008 году были опубликованы фактически первые результаты о снижении

экспрессии Bcl-xL в гиппокампе крыс хроническими стрессовыми воздействиями, индуцирующими депрессивно-подобное поведение [12]. Однако в ответах Bcl-xL на стресс обнаружились индивидуальные особенности, которые оказались причастными к определению поведенческой восприимчивости или устойчивости к стрессорным воздействиям. Выявленная у части животных способность к повышению экспрессии анти-апоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе в ответ на стресс коррелировала с устойчивостью к индукции стрессом депрессии [13], что позволяет причислять этот белок к участникам механизма естественной устойчивости к индуцируемой стрессом депрессии. Повышение экспрессии может представлять, таким образом, потенциальную терапевтическую стратегию для уменьшения симптомов депрессивного расстройства [1, 14], что подтверждается повышающим влиянием на экспрессию некоторых средств антидепрессантной терапии [12, 15-19].

Bcl-xL выполняют нейропротективную функцию [20, 21], поэтому снижение его уровня в мозге, сопровождающее стрессовое воздействие, предположительно может способствовать наблюдаемому усилению гибели нервных клеток и развитию депрессии. Однако будет ли снижение экспрессии этих белков реально инициировать развитие депрессии, оставалось неясным. Для ответа на этот вопрос в представленной работе на крысах было проведено исследование влияния подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе на поведение в тесте принудительного плавания. Были определены также экспрессии Bcl-xL и BDNF в гиппокампе и фронтальной коре, уровни кортикостерона и интерлейкина-6 в периферической крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работу проводили на взрослых самцах крыс (Wistar) массой тела 200–250 г, содержащихся в виварии ИЦиГ СО РАН в условиях контролируемого светового режима (14 ч свет/10 ч темнота) со свободным доступом к воде и корму. В работе следовали рекомендациям о гуманном обращении с лабораторными животными Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.) и рекомендациям Минздрава России (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Схема эксперимента. Для подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе была использована TET-ON система на основе лентивирусных векторов для контролируемой доксициклином экспрессии трансгенов [22]. Для экспрессии химерного белка тетрациклинового репрессора с транскрипционным репрессором KRAB использовали вектор pLVUT-tTR-KRAB. Последовательности, кодирующие малые ингибирующие шпильковые РНК (shRNA), находились под контролем промотора H1-TetO. Два варианта короткой шпильки (табл. 1), нацеленные на Bcl-xL, были идентифицированы с использованием BLOCK-iT™ RNAi Designer (Invitrogen) и клонированы в pLVTHM с использованием сайтов рестрикции MluI, ClaI.

Оценку эффективности нокдауна каждого варианта shRNA проводили на первичных клетках фибробластов крысы с трансфекцией плазмидной ДНК с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Только вариант sh#2 снижал экспрессию Bcl-xL в два раза по сравнению с контролем через 48 часов после трансфекции [$F(3, 16)=5.3526$, $p=0.01$] (рис. 1).

Этот вариант shRNA (sh#2) был использован для производства лентивирусного вектора (Tg), который в объеме 5 мкл вводили в стереотаксисе под наркозом (кетамин/ксилазин) билатерально в область CA1 гиппокампа по следующим координатам: ± 1.5 мм медиально/латерально, -3 мм спереди/сзади, -2.7 мм дорсально/вентрально от брегмы. Через 2 недели после введения вектора, половина животных в течение 7-ми дней получала с питьевой водой доксициклин (Dox; 2 г/мл в 5% сахарозе) (Tg+Dox). Третья группа животных получала только Dox в режиме Tg+Dox.

На 6 и 7 дни проводили претестовые и тестовые сессии теста принудительного плавания (тест Порсолта; 11–13 животных в группе). Через 30 мин после тестовой сессии у животных после быстрой декапитации собирали плазму крови для определения у выбранных случайным образом 7-8 животных в каждой группе уровней кортикостерона и интерлейкина-6 иммуноферментным методом с помощью наборов (Assay Designs, Inc., USA). На холоде быстро выделяли гиппокамп и фронтальную кору для определения белков (иммуноблотом) Bcl-xL и BDNF.

Тест принудительного плавания. Тест проводили согласно протоколу, предложенному еще в 1977 г. для преclinical оценки антидепрессантной

Таблица 1. Варианты коротких шпилек, нацеленных на Bcl-xL

sh#1	CACCGCATTCAGTGATCTAACATCCCGAAGGATGTTAGATCACTGAATGCTTTT
sh#2	CACCGGACAGCATATCAGAGCTTTGCGAACAAAGCTCTGATATGCTGTCTTTT

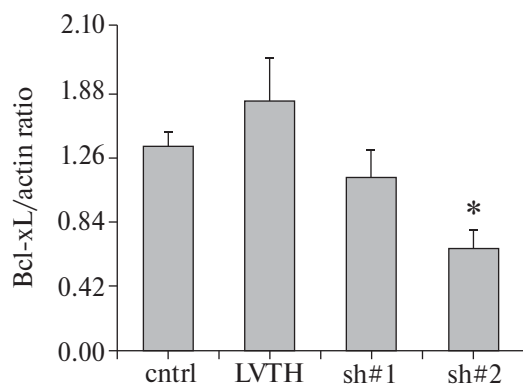


Рис. 1. Оценка эффективности нокдауна Bcl-xL вариантами shRNA: sh#1 и sh#2, в первичных клетках фибробластов крысы через 48 часов после трансфекции.
* - $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

эффективности препаратов [23]. В классическом варианте для крыс [24] принудительное плавание применяется, как правило, один раз в день в течение двух последовательных дней, 15 минут в первый день (претест) и 5 минут – во второй день (тестовая сессия). Поведение животных, помещенных в стеклянный цилиндр (46×20 см), наполненный водой до высоты 30 см, записывали с помощью видеокамеры для последующего определения латентного времени до первого эпизода депрессивно-подобного поведения и суммарной продолжительности этого поведения.

Иммуноблот. Уровни белков Bcl-xL и BDNF определяли методом Вестерн блота как описано ранее [25]. Образцы гиппокампа и фронтальной коры гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис, 1% Трипон X-100, и ингибиторы протеаз: 2 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфторид, phenylmethylsulphonyl fluoride) и по 2 мкг/мл леупептина, пепстатина и апротинина. Супернатант, содержащий 50 мкг белка, разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (система Mini-Protean 3 Dodeca Cell, “Bio-Rad Laboratories”, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad Laboratories, США) диаметром 0.45 мкм (система Trans-Blot, “Bio-Rad Laboratories”, США). Детекцию исследуемых белков на мембране проводили с помощью первичных антител – кроличьих поликлональных антител к BDNF (разведение 1:500; кроличьи поликлональные антитела, N-20, sc-546, Santa Cruz Biotechnology, США), Bcl-xL (разведение 1:500; кроличьи моноклональные антитела, #2764, 54Н6, Cell Signaling Technology, США) и бета-актину (разведение 1:20000; кроличьи поликлональные антитела, I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, США). Вторичные анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (IgG, Bio-Rad

Laboratories, США) использовали в разведении 1:1000 для окрашивания BDNF и Bcl-xL и в разведении 1:10000 для окрашивания бета-актина. Затем усиливали хемилюминисцентный сигнал с помощью специального набора (Chemiluminescence kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, “Life Technologies”, США) в течение 1 мин. Интенсивность окрашивания полос, соответствующих анализируемым белкам, определяли путем сканирования мембран (Chemidoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad Laboratories, США) с последующей компьютерной денситометрией (программа Scion Image 4.0.3.2, Scion Corporation, США). Количество белков BDNF и Bcl-xL выражали в относительных единицах к бета-актину того же образца.

Статистический анализ. Полученные данные после проверки их соответствия нормальному распределению (использовали для этого критерий Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса) обрабатывали с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), t-критерия Стьюдента, а также корреляционного анализа (по Пирсону). Результаты поведенческих тестов анализировались с использованием ANOVA для повторных измерений с “группой” в качестве фактора. Результаты представлены как $M \pm m$. Эффекты считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние внутригиппокампальной инъекции вектора отдельно и совместно с потреблением доксициклина с питьевой водой на уровни белков Bcl-xL и BDNF в гиппокампе и фронтальной коре. Добавление доксициклина в питьевую воду крыс, получавших введения вектора, вызвало нокдаун Bcl-xL в гиппокампе [$F(2,19)=5.7934$, $p=0.0109$]. Общий уровень белка Bcl-xL в этой структуре снизился примерно до 69.1% по сравнению с контрольными животными, получавшими только Dox ($p < 0.05$), и до 75 по сравнению с Tg ($p < 0.05$) (рис. 2а).

Во фронтальной коре также наблюдалось, хотя и менее выраженное [$F(2,18) = 3.2113$, $p = 0.06417$], понижающее влияние совместного введения вектора и антибиотика на экспрессию Bcl-xL (рис. 2б). Прямые сравнения отдельных групп по t-критерию Стьюдента показали достоверные различия между группами Tg+Dox и Dox: $t(13) = -2.549784$, $p = 0.024202$, и на уровне выраженной тенденции между Tg+Dox и Tg: $t(14) = -2.107102$; $p = 0.056824$.

Введение вектор+доксициклин, подавляющего экспрессию Bcl-xL, привело в гиппокампе, помимо снижения уровня анти-апоптозного белка, к небольшому: $F(2,20) = 2.8767$, $p = 0.07979$, увеличению экспрессии белка BDNF (рис. 2в). Прямые парные сравнения по t-критерию Стьюдента

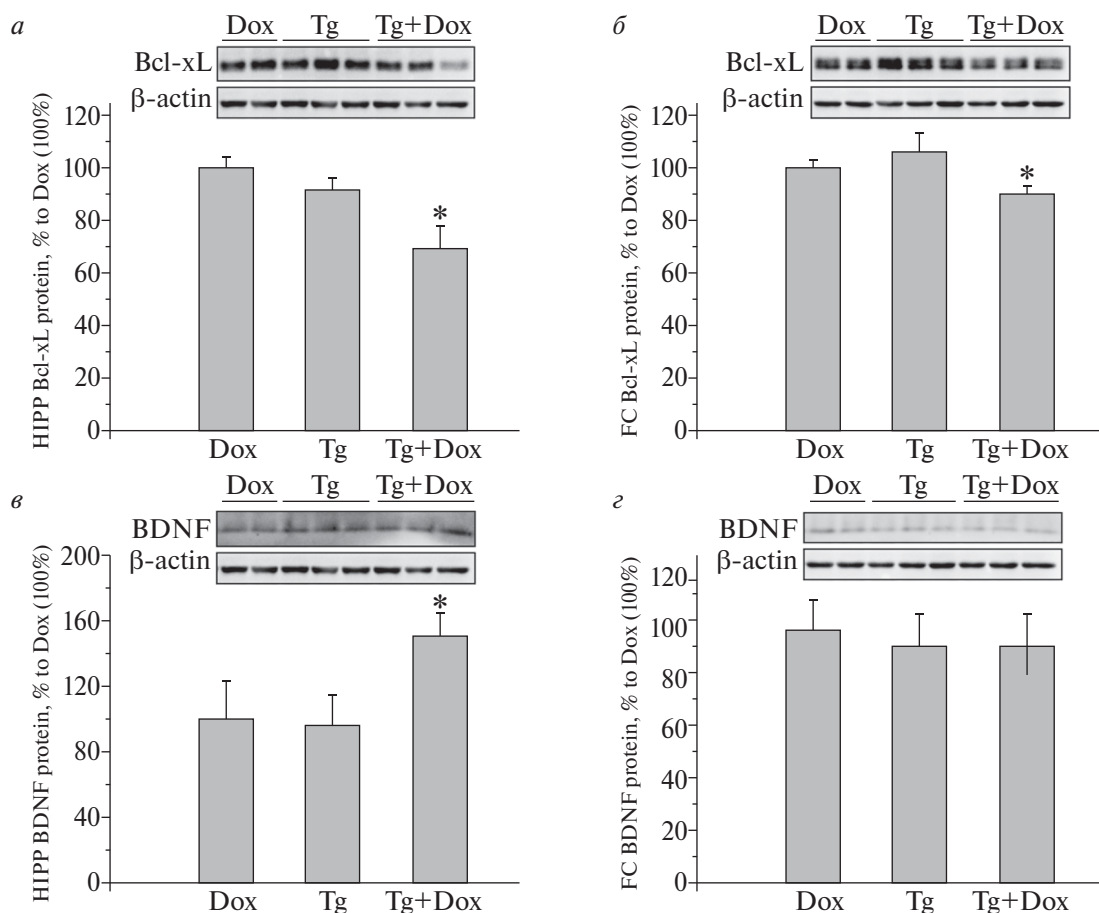


Рис. 2. Уровни белков Bcl-xL (а, б) и BDNF (в, г) в гиппокампе (а, в) и фронтальной коре (б, г) взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина. Значения $M \pm m$ представлены в процентах относительно группы Dox, принятой за 100%; в каждой группе 7–8 животных. Звездочками указаны различия между группами: на (а) – $p < 0.05$ по сравнению с группами Dox и Tg; на (б) – $p < 0.05$ по сравнению с группой Dox, с группой Tg на уровне выраженной тенденции – $p = 0.0568$; на (в) – $p < 0.05$ по сравнению с обеими контрольными группами.

показали достоверные различия между группами Tg и Tg+Dox: $t(14) = 2.34143$; $p = 0.034522$. Во фронтальной коре различий между группами по экспрессии BDNF не обнаружено (рис. 2г).

Поведение в тесте принудительного плавания.

В претесте не было обнаружено различий между группами по значениям поведенческих параметров (рис. 3а, б). Использование ANOVA для повторных измерений поведения показал для латентного времени до первого замирания достоверное влияние повторного тестирования [$F(1,32) = 28.586$, $p = 0.000007$] и взаимодействие факторов (подавления экспрессии и повторного тестирования) [$F(1,32) = 3.980$, $p = 0.028598$]. Для продолжительности замирания у животных групп Tg и Tg+Dox достоверными были влияния группы [$F(1,22) = 4.674$, $p = 0.041760$] и повторного тестирования [$F(1,22) = 19.470$, $p = 0.000220$]. В 5-минутной тестовой сессии, проведенной через сутки после

претеста, животные с подавлением экспрессии Bcl-xL в гиппокампе демонстрировали достоверно меньшую продолжительность латентного времени до первого замирания (рис. 3а), то есть, по сравнению с группой Tg, они быстрее впадали в депрессивно-подобное состояние. Кроме того, эти животные характеризовались большей продолжительностью замирания в тесте (рис. 3б).

Вес надпочечников и уровень кортикостерона в плазме крови. У животных, получавших совместное введение вектора и доксициклина, обнаружено достоверное увеличение относительного веса надпочечников по сравнению с группами, получавшими отдельные введения этих препаратов (рис. 4а) [$F(2,19) = 4.1234$, $p = 0.03468$].

Дисперсионный анализ показал достоверное влияние перенесенных воздействий также на уровень кортикостерона [$F(2,19) = 4.6480$, $p = 0.02274$]. Уровень гормона, измеренный в плазме

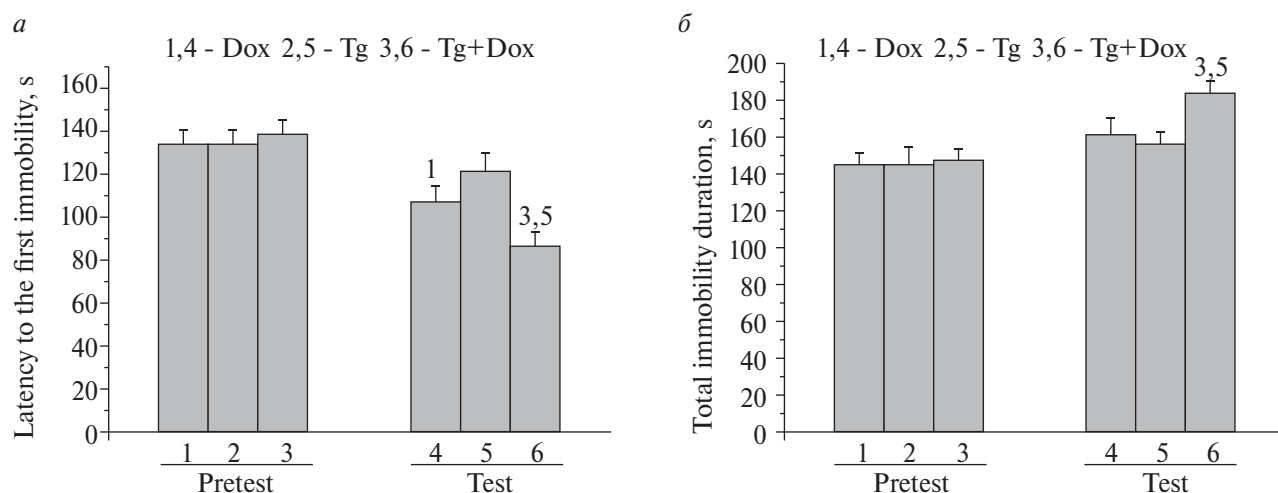


Рис. 3. Латентное время до первого замирания (а) и общая продолжительность замирания (б) взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно, в претестовой и тестовой сессиях теста принудительного плавания. Dox — доксициклин, Tg — лентивирусный вектор, Tg+Dox — лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 11–13 животных. Цифрами сверху указаны группы, между которыми выявлены достоверные отличия ($p < 0.05$).

крови через 30 минут после стресса принудительного плавания, был достоверно ($p < 0.05$) снижен у животных группы Tg+Dox по сравнению с группой Tg (рис. 4б).

Интерлейкин-6 в плазме крови. Характер изменений уровня интерлейкина-6 в плазме крови через 30 минут после стресса принудительного плавания был сходен с изменениями уровня кортикостерона, однако различия между группами были значительно менее выраженными и, также как

и общий эффект [$F(2, 18) = 1.8784$, $p = 0.18160$], не достигали статистической достоверности (рис. 5).

Корреляции. Относительные веса надпочечников достоверно отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Bcl-xL во фронтальной коре: $r = -0.42$ ($n=23$) $p < 0.05$.

Между уровнями кортикостерона и интерлейкина-6 в плазме крови через 30 минут после стресса принудительного плавания обнаружена достоверная положительная корреляция: $r = 0.44$ ($n=21$) $p < 0.05$.

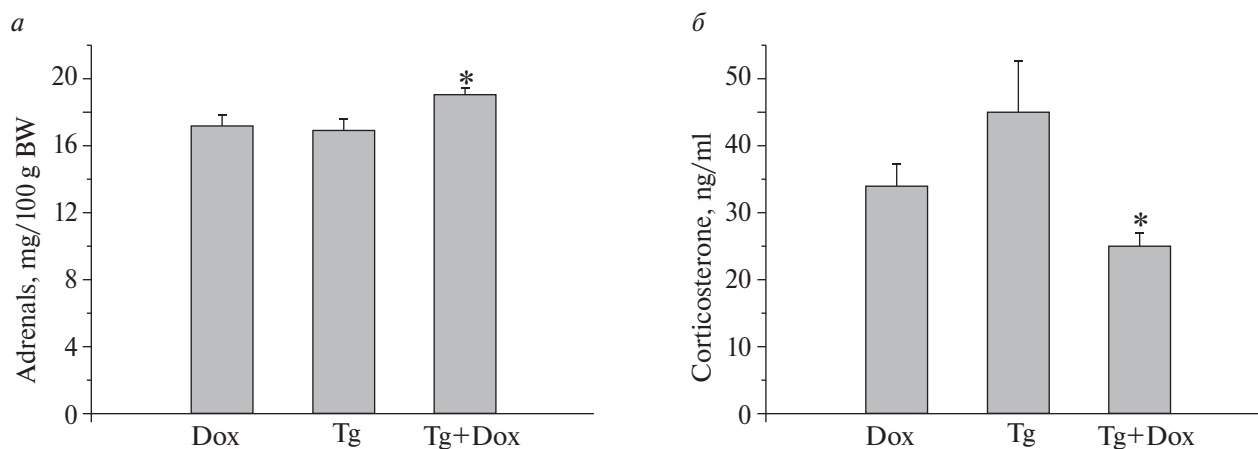


Рис. 4. Относительные веса надпочечников (а) и стрессорные уровни кортикостерона (б) в плазме периферической крови взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox — доксициклин, Tg — лентивирусный вектор, Tg+Dox — лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 7–8 животных. На (а) — * $p < 0.05$ по сравнению с группами Dox; на (б) — * $p < 0.05$ по сравнению с группой Tg.

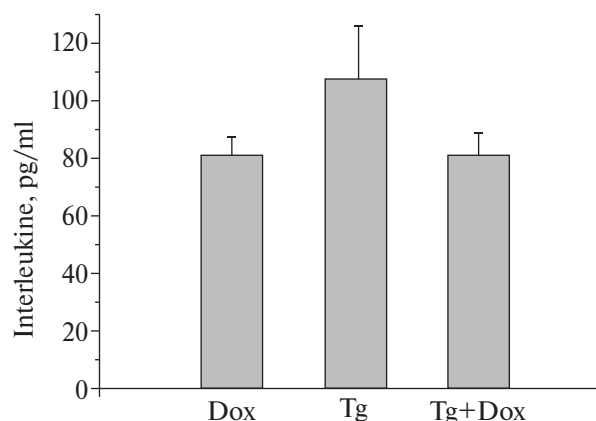


Рис. 5. Стрессорные (через 30 минут после стресса принудительного плавания) уровни интерлейкина-6 в плазме периферической крови взрослых крыс, получавших внутригиппокампальные инъекции лентивирусного вектора и доксициклин с питьевой водой отдельно и совместно. Dox – доксициклин, Tg – лентивирусный вектор, Tg+Dox – лентивирусный вектор с последующим потреблением доксициклина; в каждой группе 7–8 животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом работы явилось впервые обнаруженное увеличение депрессивно-подобного поведения у животных после ген-направленного подавления экспрессии Bcl-xL в гиппокампе. В 5-минутной тестовой сессии, животные со сниженной экспрессией Bcl-xL в гиппокампе проявляли достоверно большую продолжительность замирания. Помимо продолжительности пассивного поведения, для улучшения прогностической достоверности теста был использован дополнительный показатель – латентный период до первого эпизода замирания [26], уменьшение которого свидетельствовало также и о более быстром развитии депрессивно-подобного состояния у этих животных.

Выявленный про-депрессивно-подобный поведенческий эффект мог быть реально связан со снижением экспрессии Bcl-xL, обнаруженным не только в гиппокампе, но и во фронтальной коре. Хронический непредсказуемый умеренный стресс активировал апоптоз в гиппокампе и коре мышей, а также значительно увеличивал продолжительность пассивного поведения в тесте принудительного плавания [27]. Исследования, проведенные на ранних постнатальных стадиях, показали, что дефицит Bcl-xL в коре и CA1-CA3 областях гиппокампа индуцировал апоптоз в популяции дифференцированных нейронов, регулирующих сложное поведение [28]. PGAM5 (Bcl-xL-Binding Protein V68) дефосфорилирует Bcl-xL и препятствует тем самым апоптозу [29]. Недавно было обнаружено, что нокауты по PGAM5 проявляют

депрессивно-подобное поведение, а хронический стресс, провоцирующий депрессивно-подобное поведение, снижал экспрессию PGAM5 в префронтальной коре и гиппокампе [30]. Авторы считают, что одним из механизмов провоцирования депрессивно-подобного поведения снижением экспрессии PGAM5 является ограничение продукции АТФ в нейронах, приводящее к уменьшению количества нейрональных шипиков в префронтальной коре. Хотя Bcl-xL в основном известен своей ролью в регуляции апоптоза, и как анти-апоптотический фактор он может предотвращать гибель нейронов, Bcl-xL имеет и неканонические функции, независимые от апоптоза [31]. Показано, например, его участие в росте и дифференцировке нейронов и аксонов [32, 33], синаптической трансмиссии [34], а также, посредством регуляции митохондриального метаболизма, в образовании синапсов [35, 36].

Наряду с поведенческими изменениями, последствия снижения экспрессии Bcl-xL в гиппокампе и фронтальной коре включали значительные различия в функциональной активности надпочечников, что проявилось увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови животных. Несмотря на общепринятое мнение о связи повышенного уровня глюкокортикоидов с развитием психопатологией, функциональное значение этих гормонов для инициации первых эпизодов стресс-индуцированного депрессивно-подобного поведения остается до конца не изученным. Увеличение уровня глюкокортикоидов при стрессе участвует в реакциях преодоления стресса, и можно думать, что снижение их уровня в некоторых случаях может способствовать развитию депрессивно-подобного поведения, что, например, согласуется с ослаблением депрессивно-подобного поведения однократным введением кортикостерона [37]. Вместе с тем, полученный нами результат указывает на явную разбалансировку гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, механизмы которой, а также отношение к поведенческим эффектам не ясны. Относительные веса надпочечников отрицательно коррелировали с уровнем экспрессии Bcl-xL во фронтальной коре, что может свидетельствовать о защитной роли Bcl-xL в этой структуре против гипертрофии надпочечников. Механизм связи между снижением экспрессии Bcl-xL, стрессорного уровня кортикостерона и усилением депрессивно-подобного поведения может включать изменение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР). Являясь важнейшими транскрипционными факторами, они значительно увеличивают ядерную транслокацию в клетках мозга при остром стрессе [38, 39], а во фронтальной коре в разные сроки, через 20 [40] и 40 минут [41], после стресса принудительного плавания обнаружено увеличение уровней мРНК и белка ГР. Глюкокортикоиды могут влиять на

экспрессию антиапоптозных белков [42, 43], образование комплексов между этими белками и ГР, а также их перемещение в митохондрии, усиливая активные пути преодоления стресса в ответ на негативные стимулы [44, 45]. В последнее время в литературе появляется все больше данных, связывающих митохондриальную дисфункцию с патофизиологией депрессии [46].

Информативным маркером нейрональной пластичности, ассоциируемым с депрессивным фенотипом, считают экспрессию BDNF [47]. Однако, в отличие от обычно сниженной, согласно нейротрофической гипотезе депрессии [48], экспрессии нейротрофина в различных животных моделях этой патологии [49], экспрессия BDNF в гиппокампе после подавления Bcl-xL, несмотря на продепрессантный поведенческий эффект, была повышенной. Такое несоответствие поведения и экспрессии BDNF в ключевых отделах мозга, связанных с контролем депрессивно-подобного поведения, наблюдается нередко. Например, повышенный уровень экспрессии нейротрофина был обнаружен во фронтальной коре крыс, проявляющих большую продолжительность пассивного поведения в тесте принудительного плавания по сравнению с крысами, проявляющими меньшую продолжительность [50]. Следует отметить, что существенной особенностью головного мозга, обеспечивающей адекватные поведенческие ответы на негативные стимулы, является его пластичность, согласованное функционирование ключевых компонентов и механизмов которой в гиппокампе осуществляется с участием глюкокортикоидных гормонов [51]. Повышение уровня BDNF в гиппокампе в нашей работе может объясняться сниженным уровнем кортикостерона, оказывающего угнетающее влияние на экспрессию BDNF [52]. Повышение экспрессии BDNF в гиппокампе могло быть также компенсаторным ответом на снижение экспрессии Bcl-xL. Функционирование нейротрофической и анти-апоптозной систем взаимосвязано, на что указывает повышающее влияние BDNF на экспрессию Bcl-xL в гиппокампе [53].

Активную роль в провоцировании депрессивно-подобного поведения играют воспалительные процессы [54], которые в условиях нашего эксперимента могли быть вызваны, например, инъекцией вирусных векторов в мозг [55] или стрессовыми условиями теста принудительного плавания. Даже такое небольшое стрессовое воздействие, как 30-минутное ограничение подвижности, повышало в плазме крови крыс уровень, по крайней мере, одного провоспалительного цитокина – интерлейкина-6 [56]. Клинические исследования показывают прямую взаимосвязь между уровнем интерлейкина-6 в периферической крови и тяжестью депрессии [57]. Однако в нашей работе не было обнаружено значительных различий между

группами по уровню интерлейкина-6 в периферической циркуляции, что отвергает возможность существенного вклада периферического воспаления в изменение поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение экспрессии Bcl-xL в гиппокампе и фронтальной коре сопровождалось у крыс депрессивно-подобным ответом в тесте принудительного плавания. Этому поведенческому эффекту сопутствовало изменение функционирования надпочечников, проявляющееся увеличением веса желез и снижением стрессорного уровня кортикостерона в плазме крови.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность замечательным квалифицированным помощникам в проведении экспериментальных исследований, сборе материала и его последующей обработке Красноперовой Ларисе Александровне и Рябчиковой Ирине Алексеевне.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана бюджетным проектом № FWN-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной рукописи.

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, рекомендациям биоэтической комиссии Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Информированное согласие. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T. // Cell. Mol. Neurobiol. 2012. V. 32. P. 767–776.
2. McEwen B.S. // Metabolism. 2005. V. 54. P. 20–23.
3. Lucassen P.J., Pruessner J., Sousa N., Almeida O.F., Van Dam A.M., Rajkowska G., Swaab D.F., Czéh B. // Acta Neuropathol. 2014. V. 127. P. 109–135.
4. Nestler E.J., Russo S.J. // Neuron. 2024. V. 112(12). P. 1911–1929.

5. *Lucassen P.J., Vollmann-Honsdorf G.K., Gleisberg M., Czéh B., De Kloet E.R., Fuchs E.* // *Eur. J. Neurosci.* 2001. V. 14(1). P. 161–166.
6. *Lucassen P.J., Heine V.M., Muller M.B., van der Beek E.M., Wiegant V.M., De Kloet E.R., Joels M., Fuchs E., Swaab D.F., Czéh B.* // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2006. V. 5. P. 531–546.
7. *Kubera M., Obuchowicz E., Goehler L., Brzeszcz J., Maes M.* // *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 35. P. 744–759.
8. *Culig L., Surget A., Bourdey M., Khemissi W., Le Guisquet A.M., Vogel E., Sahay A., Hen R., Belzung C.* // *Neuropharmacology.* 2017. V. 126. P. 179–189.
9. *Planchez B., Surget A., Belzung C.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. V. 50. P. 88–95.
10. *Jones K.L., Zhou M., Jhaveri D.J.* // *NPJ Sci. Learn.* 2022. V. 7. P. 16.
11. *Murray F., Hutson P.H.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. V. 569. P. 41–47.
12. *Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C.* // *Neuropsychopharmacology.* 2008. V. 33. P. 545–558.
13. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N.* // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 213. P. 218–224.
14. *Malkesman O., Austin D.R., Tragon T., Henter I.D., Reed J.C., Pellecchia M., Chen G., Manji H.K.* // *Mol. Psychiatry.* 2012. V. 17. P. 770–780.
15. *Wang Y., Xiao Z., Liu X., Berk M.* // *Hum. Psychopharmacol.* 2011. V. 26(2). P. 95–101.
16. *Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N.* // *Neuropharmacology.* 2012. V. 62. P. 177–183.
17. *Engel D., Zomkowski A.D., Lieberknecht V., Rodrigues A.L., Gabilan N.H.* // *J. Psychiatr. Res.* 2013. V. 47. P. 802–808.
18. *Dygalo N.N., Bannova A.V., Sukhareva E.V., Shishkina G.T., Ayriyants K.A., Kalinina T.S.* // *Biochemistry (Mosc).* 2017. V. 82. P. 345–350.
19. *De-Paula V.J., Dos Santos C.C.C., Luque M.C.A., Ali T.M., Kalil J.E., Forlenza O.V., Cunha-Neto E.* // *Metab. Brain Dis.* 2021. V. 36. P. 193–197.
20. *González-García M., García I., Ding L., O'Shea S., Boise L.H., Thompson C.B., Núñez G.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4304–4308.
21. *Jonas E.A., Porter G.A., Alavian K.N.* // *Front. Physiol.* 2014. V. 5. P. 355.
22. *Szulc J., Wiznerowicz M., Sauvain M.O., Trono D., Aebischer P.* // *Nat. Methods.* 2006. V. 3. P. 109–116.
23. *Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M.* // *Nature.* 1977. V. 266. P. 730–732.
24. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. P. 379–391.
25. *Bannova A.V., Menshanov P.N., Dygalo N.N.* // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. P. 344–348.
26. *Castagné V., Porsolt R.D., Moser P.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. V. 616. P. 128–133.
27. *Ge C., Wang S., Wu X., Lei L.* // *Behav. Brain Res.* 2024. V. 465. P. 114934.
28. *Nakamura A., Swahari V., Plestant C., Smith I., McCoy E., Smith S., Moy S.S., Anton E.S., Deshmukh M.* // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 5448–5461.
29. *Ma K., Zhang Z., Chang R., Cheng H., Mu C., Zhao T., Chen L., Zhang C., Luo Q., Lin J., Zhu Y., Chen Q.* // *Cell Death Differ.* 2020. V. 27. P. 1036–1051.
30. *Cui W., Chen C., Gong L., Wen J., Yang S., Zheng M., Gao B., You J., Lin X., Hao Y., Chen Z., Wu Z., Gao L., Tang J., Yuan Z., Sun X., Jing L., Wen G.* // *CNS Neurosci. Ther.* 2024. V. 30. P. e14377.
31. *Li M., Wang D., He J., Chen L., Li H.* // *Pharmacol Res.* 2020. V. 151. P. 104547.
32. *Park H.A., Licznarski P., Alavian K.N., Shanabrough M., Jonas E.A.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 22. P. 93–108.
33. *Jansen J., Scott M., Amjad E., Stumpf A., Lackey K.H., Caldwell K.A., Park H.A.* // *Biology (Basel).* 2021. V. 10. P. 772.
34. *Jonas E.A., Hoit D., Hickman J.A., Brandt T.A., Polster B.M., Fannjiang Y., McCarthy E., Montanez M.K., Hardwick J.M., Kaczmarek L.K.* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 8423–8431.
35. *Li H., Chen Y., Jones A.F., Sanger R.H., Collis L.P., Flannery R., McNay E.C., Yu T., Schwarzenbacher R., Bossy B., Bossy-Wetzel E., Bennett M.V., Pypaert M., Hickman J.A., Smith P.J., Hardwick J.M., Jonas E.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 2169–2174.
36. *Bas J., Nguyen T., Gillet G.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 3202.
37. *Stone E.A., Lin Y.* // *Eur. J. Pharmacol.* 2008. V. 580. P. 135–142.
38. *Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K.* // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 4344–4355.
39. *Caudal D., Jay T.M., Godsil B.P.* // *Front. Behav. Neurosci.* 2014. V. 8. P. 19.
40. *Karandrea D., Kittas C., Kitraki E.* // *Neuroendocrinology.* 2002. V. 75. P. 217–226.
41. *Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N.* // *Psychopharmacology (Berl).* 2015. V. 232. P. 51–60.
42. *Gascoyne D.M., Kypta R.M., Vivanco d. M.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 18022–18029.
43. *Viegas L.R., Vicent G.P., Barañao J.L., Beato M., Pecci A.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 9831–9839.
44. *Du J., McEwen B., Manji H.K.* // *Commun. Integr. Biol.* 2009. V. 2(4). P. 350–352.

45. *Drakulić D., Veličković N., Stanojlović M., Grković I., Mitrović N., Lavrnja I., Horvat A.* // J. Neuroendocrinol. 2013. V. 25. P. 605–616.
46. *Khan M., Baussan Y., Hebert-Chatelain E.* // Biomolecules. 2023. V. 13. P. 695.
47. *Chakrapani S., Eskander N., De Los Santos L.A., Omisore B.A., Mostafa J.A.* // Cureus. 2020. V. 12. P. e11396.
48. *Duman R.S., Monteggia L.M.* // Biol. Psychiatry. 2006. V. 59(12). P. 1116–1127.
49. *Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N.* // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. P. 932757.
50. *Stepanichev M., Manolova A., Peregud D., Onufriev M., Freiman S., Aniol V., Moiseeva Y., Novikova M., Lazareva N., Gulyaeva N.* // Neuroscience. 2018. V. 375. P. 49–61.
51. *Gulyaeva N.V.* // Biochemistry (Mosc). 2023. V. 88. P. 565–589.
52. *Schaaf M.J., De Kloet E.R., Vreugdenhil E.* // Stress. 2000. V. 3. P. 201–208.
53. *Chao C.C., Ma Y.L., Lee E.H.* // Brain Pathol. 2011. V. 21. P. 150–162.
54. *Kim Y.K., Na K.S., Myint A.M., Leonard B.E.* // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2016. V. 64. P. 277–284.
55. *Martianova E., Aniol V.A., Manolova A.O., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V.* // Acta Histochem. 2019. V. 121. P. 368–375.
56. *Serrats J., Grigoleit J.S., Alvarez-Salas E., Sawchenko P.E.* // Brain Behav. Immun. 2017. V. 62. P. 53–63.
57. *Min X., Wang G., Cui Y., Meng P., Hu X., Liu S., Wang Y.* // Front. Immunol. 2023. V. 14. P. 1110775.

A Reduced Expression of BCL-XL in the Hippocampus is Accompanied by a Depression-Like Phenotype in Rats

G. T. Shishkina¹, D. A. Lanshakov¹, A. V. Bannova¹, N. P. Komysheva¹, and N. N. Dygalo¹

¹*The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

The previously identified ability of the anti-apoptotic protein Bcl-xL to increase expression in the hippocampus in response to stress, which correlated with resistance to stress-induced depression (Shishkina et al., 2010; Dygalo et al., 2012), indicates the potential use of this protein as a target for reducing symptoms of depressive disorder. The aim of this work was to evaluate in rats the effect of suppression of Bcl-xL expression in the hippocampus (using a TET-ON system based on lentiviral vectors for doxycycline-controlled transgene expression) on behavior in the forced swim test. The detected decrease in the expression (determined by immunoblotting) of Bcl-xL in the hippocampus and less pronounced in the frontal cortex was accompanied by a clear depressive-like effect, manifested by a shorter latency period before the first episode of freezing and a longer duration of passive behavior. Animals that received joint administration of the vector and doxycycline also showed a significant increase in the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein in the hippocampus, the relative weight of the adrenal glands, and a decrease in the stress level of corticosterone in the blood plasma compared to groups that received separate administrations of these drugs. Relative adrenal weights were significantly negatively correlated with Bcl-xL expression levels in the frontal cortex. Overall, gene-directed reduction of Bcl-xL expression in the hippocampus resulted in a depressive-like response in the forced swim test in rats. This behavioral effect was accompanied by a change in the functioning of the adrenal glands, manifested by an increase in the weight of the glands and a decrease in the stress level of corticosterone in the peripheral circulation.

Keywords: anti-apoptotic protein Bcl-xL, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), hippocampus, frontal cortex, forced swim test, corticosterone, adrenal glands