

УДК 577.112:591.51:591.481

## ЭКСПРЕССИЯ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 И Vcl-xL В МОЗГЕ КРЫС ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ И ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

© 2014 г. Г.Т. Шишкина<sup>1</sup>, Т.С. Калинина<sup>1,2</sup>, В.В. Булыгина<sup>1</sup>,  
Е.В. Баблюк<sup>1</sup>, Н.Н. Дыгало<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,  
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29 сентября 2014 г. Принята к публикации 7 ноября 2014 г.

Стресс сопровождается изменением в мозге экспрессии множества генов и их белковых продуктов, однако механизмы этих изменений, а также их значение для развития или, напротив, противодействия индуцируемой стрессом депрессии остаются неясными. Имеющиеся в литературе сведения указывают на чувствительность ключевого фермента синтеза серотонина (5-НТ) в мозге триптофангидроксилазы-2 (tryptophan hydroxylase-2; TPH2) к стрессорным воздействиям, индуцирующим депрессивно-подобное состояние у животных, а также на противодействие антиапоптозного белка Vcl-xL формированию этого состояния. Для выяснения неясных взаимоотношений TPH2 и Vcl-xL в ходе развития индуцированной стрессом психопатологии в работе проведено сравнительное исследование экспрессий их генов и белков в областях локализации клеточных тел 5-НТ нейронов в течение повторяющихся стрессорных воздействий. Экспрессию генов оценивали по уровню мРНК, белков – иммуногистохимически, в клетках дорсального и медианного ядер через сутки после повторного и 14-го сеансов принудительного плавания. Обнаруженное повышение экспрессии белка Vcl-xL в 5-НТ клетках обоих ядер после повторного плавания, очевидно, направлено на экстренную защиту этих клеток от повреждающего действия стресса. Свидетельством активации этой защиты служит ассоциированное с Vcl-xL увеличение в клетках количества белка TPH2. В ходе же последующих стрессорных воздействий степень ответного повышения экспрессии Vcl-xL снижалась. Ослабленная в связи с этим защита 5-НТ нейронов сопровождалась уменьшением в них биосинтетических процессов и компенсаторной активацией гена фермента. В целом результаты являются первым свидетельством в пользу наличия в 5-НТ нейронах взаимосвязей между Vcl-xL и TPH2. Помимо потенциальной возможности влиять на предрасположенность или устойчивость организма к формированию индуцируемой стрессом депрессии, эти взаимосвязи могут лежать в основе парадоксального увеличения уровня мРНК *trh2* в ядрах шва головного мозга больных депрессией.

**Ключевые слова:** стресс вынужденного плавания, триптофангидроксилаза-2, Vcl-xL, депрессия.

### СЕРОТОНИН МОЗГА И ДЕПРЕССИЯ

Данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о важной роли серотонинергической (5-НТ) системы мозга в развитии и терапии депрессивных расстройств. Нарушение функции 5-НТ системы, преимущественно ее ослабление, многие годы рас-

сматривается в качестве одного из ключевых факторов формирования этой психопатологии (Owens, Nemeroff, 1994; Canli, Lesch, 2007), поэтому неудивительно, что наиболее употребляемые в настоящее время антидепрессанты нацелены на усиление 5-НТ сигнала путем блокады обратного захвата нейромедиатора или активации его рецепторов. Вместе с тем эффек-

тивность этих препаратов оказалась не очень высокой (Celada *et al.*, 2013), что обуславливает необходимость новых подходов к увеличению активности 5-НТ нейротрансмиссии. Ключевым ферментом синтеза серотонина специфически в центральной нервной системе является триптофангидроксилаза-2 (tryptophan hydroxylase-2, ТРН2) (Walther *et al.*, 2003), генная экспрессия которого ограничена ядрами шва головного мозга (Walther, Bader, 2003). Активация синтеза серотонина в мозге воздействием на ТРН2 может быть дополнительной возможностью терапии психоэмоциональных расстройств.

В пользу потенциальной эффективности такого пути свидетельствуют выявленные в некоторых работах (например, Zill *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2009; Mandelli *et al.*, 2012) ассоциации аллельных вариантов гена *tph2* с симптомами болезни. Однако умеренный оптимизм относительно рассмотрения такой возможности существенно снижается отсутствием ассоциации в других исследованиях (например, Mann *et al.*, 2008). Важно, что и мета-анализ данных обширных полногеномных исследований не выявил достоверной ассоциации для наиболее распространенного депрессивного расстройства, – так называемой «большой» депрессии, – ни с одним из исследованных генетических маркеров (Ripke *et al.*, 2013).

Кроме того, вопреки установившемуся мнению о снижении содержания серотонина в мозге при депрессии, исследование депрессивных больных после суицидального исхода выявило в ряде работ парадоксальное увеличение экспрессии и гена (Bach-Mizrahi *et al.*, 2008), и белка (Boldrini *et al.*, 2005) фермента в областях локализации клеточных тел 5-НТ нейронов. Однако по данным других исследований, уровень мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва не различался между депрессивными и здоровыми людьми (Goswami *et al.*, 2010). Также не внесло ясности в понимание роли ТРН2 в психопатологии и исследование полных нокауты по гену фермента: вместо ожидаемого депрессивно-подобного поведенческого фенотипа, животные не отличались по его характеристикам от мышей «дикого» генотипа (Fernandez, Gaspar, 2012).

Для объяснения противоречия между копившимися десятилетиями свидетельствами

ключевой роли 5-НТ системы мозга в регуляции психоэмоциональных состояний и явным отсутствием прямой связи этих состояний с генетической изменчивостью фермента, вплоть до полного отсутствия *tph2* в геноме, приводят ряд аргументов. Результаты исследований нокауты по *tph2* объясняют разобщением у них в процессе развития механизмов, регулирующих поведение и уровень серотонина, а также неизменным уровнем нейрогенеза в гиппокампе (Klempin *et al.*, 2013), последнее, согласно современным представлениям, способно обеспечить нормальный психо-поведенческий фенотип (Kempermann, Kronenberg, 2003). В качестве же возможных причин повышенной экспрессии фермента синтеза серотонина в мозге депрессивных больных, исследованных после их суицида, предполагают гомеостатический ответ на дефицит индоламина у таких больных, реакцию на какие-то обстоятельства перед суицидом, а также последствия неблагоприятного протекания раннего онтогенеза. Отрицательные результаты полногеномных исследований пытаются объяснить все еще недостаточным объемом выборок, небольшим эффектом гена, а также зависимостью его проявления от взаимодействия с другими генетическими системами и со средовыми факторами (Mandelli *et al.*, 2012). Безотносительно к надежности вышеизложенных аргументов имеющиеся в настоящее время сведения, безусловно, свидетельствуют о нелинейной связи активности 5-НТ системы мозга и ее ключевого компонента – ТРН2, с психопатологией. Эта связь явно осложнена взаимодействиями с внешними для организма факторами, например, стрессорами, провоцирующими депрессивное состояние (Kendler *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2003), а также с генетическими системами организма, противодействующими повреждающим эффектам стресса на мозг.

### ТРН2 В МОЗГЕ ПРИ СТРЕССЕ

Основным источником 5-НТ иннервации структур мозга, включая и ключевые для психоэмоциональной регуляции, служат 5-НТ клетки ядер шва среднего и продолговатого мозга. Уровень 5-НТ нейротрансмиссии в мозге является важным компонентом ответа на стресс, и неадекватность этого ответа у чув-

ствительных к неблагоприятным воздействиям индивидов может привести к депрессии. Все большее количество данных указывает на высокую чувствительность экспрессии гена *tph2* к стрессорным воздействиям (Chamas *et al.*, 2004) и вовлеченность изменяемой стрессом экспрессии в психоэмоциональные ответы (Shishkina *et al.*, 2007, 2012; Hale *et al.*, 2011; Chen, Miller, 2012, 2013; Boyarskikh *et al.*, 2013). Вместе с тем направление опубликованных после стресса изменений довольно противоречивое. Например, психосоциальный стресс в течение 5 дней приводил к снижению мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва обезьян (Betha *et al.*, 2013). Такой же эффект наблюдался у мышей после хронического, в течение 3 недель, стресса социального поражения (Boyarskikh *et al.*, 2013). Однако у взрослых крыс, перенесших в период со 2-го по 14-й дни постнатального развития ежедневное в течение 180 мин отделение от матери, уровень мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва после однократного стресса социального поражения был повышен (Gardner *et al.*, 2009). Другое стрессорное воздействие – ограничение подвижности взрослых крыс – вызывало увеличение мРНК фермента в дорсальном ядре шва как после воздействия, примененного однократно, так и в течение 3 и 7 дней (Chamas *et al.*, 2004). Противоречивость этих изменений может быть обусловлена природой и силой стрессорного воздействия, его продолжительностью, историей предшествующих воздействий и т. д. Кроме того, выявлена неодинаковая чувствительность отдельных ядер к действию стресса (Chamas *et al.*, 2004), что может маскировать эффект при их совместном анализе, например, в составе обычно анализируемых в едином образце ткани среднего или стволового отделов мозга.

Психоэмоциональные расстройства могут сопровождаться морфологическими изменениями в области 5-НТ ядер шва, например, уменьшением размера дорсального ядра у депрессивных больных (Matthews, Harrison, 2012) или снижением (на 31 %) количества нейронов в вентролатеральном субрегионе этого ядра (Baumann *et al.*, 2002). Эти морфологические изменения предполагают участие регуляторов жизнеспособности клеток, например, белков апоптоза, в эффектах стресса на 5-НТ систему, так же, как, по-видимому, и на пси-

хоэмоциональные реакции. Такое стрессорное воздействие, как длительное содержание крыс в полной темноте, приводило к ассоциированному с поведенческими симптомами депрессии увеличению апоптоза в моноаминергических нейронах, включая и 5-НТ нейроны (Gonzalez, Aston-Jones, 2008). Длительное введение антидепрессантов ослабляло проявление депрессивно-подобного состояния животных в тесте Порсолта, и это ослабление сопровождалось увеличением экспрессии Vcl-xL в стволе мозга – области локализации медианного ядра шва (Shishkina *et al.*, 2012). С целью выявления возможной взаимосвязи экспрессии Vcl-xL и TPH2 в ходе развития индуцируемой стрессом депрессии в экспериментах на взрослых самцах крыс нами были получены данные об изменении уровней мРНК и белков этих генов в дорсальном и медианном ядрах шва головного мозга.

#### **ЭКСПРЕССИЯ ТПГ-2 И VCL-XL В ДОРСАЛЬНОМ И МЕДИАННОМ ЯДРАХ ШВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО И ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА**

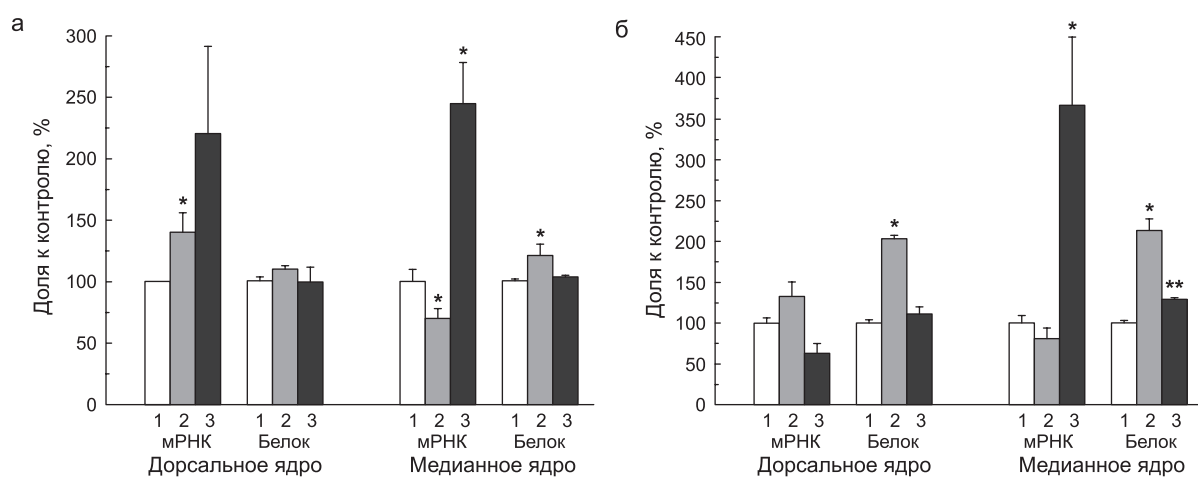
В качестве стрессорного воздействия, способного провоцировать у крыс развитие депрессивно-подобного состояния, было использовано принудительное плавание в неизбежных условиях, впервые предложенное еще в 1978 г. (Porsolt *et al.*, 1978) для преклинической оценки антидепрессантной эффективности препаратов. Это воздействие также широко используется в экспериментальных исследованиях механизмов депрессии (Cryan, Mombereau, 2004; Krishnan, Nestler, 2011; Stepanichev *et al.*, 2014). В классическом варианте для крыс принудительное плавание применяется, как правило, один раз в день в течение двух последовательных дней. После повторного воздействия обнаружено увеличение экспрессии гена *tph2* (Shishkina *et al.*, 2007) и функциональной активности 5-НТ нейронов (по *c-fos*-иммунореактивности) в дорсальном ядре шва (Drugan *et al.*, 2013). Следует отметить, что некоторые исследователи рассматривают увеличение продолжительности замирания при повторной процедуре плавания как элемент адаптивного поведения, направленного на со-

хранение жизненных сил. В этой связи недавно было обнаружено, что чем больше выражено это «адаптивное» поведение в тесте, тем в меньшей степени животное оказывалось способным противостоять эффектам последующих стрессорных воздействий на развитие другого общепринятого показателя депрессивно-подобного состояния – ангедонии (Zheng L., Zheng X., 2014). Увеличение числа плаваний усугубляет выраженность симптомов депрессивно-подобного состояния и увеличивает чувствительность к антидепрессантному действию препаратов (Mezadri *et al.*, 2011). Поэтому последовательное увеличение числа стрессорных воздействий плаванием может быть использовано в качестве экспериментальной модели, способной вскрыть важные нейробиологические механизмы чувствительности и/или устойчивости к негативным психоэмоциональным эффектам стресса. В нашей работе животные подвергались стрессу принудительного плавания один раз в день (15 мин) в течение 2 или 14 последовательных дней. Через сутки после последнего сеанса плавания в дорсальном и медианном ядрах шва анализировали экспрессию *Bcl-xL* и *TRH2* путем определения уровней их мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени и белков – методом флюоресцентной иммуногистохимии, как это

было описано в наших работах ранее (Shishkina *et al.*, 2007, 2010, 2014).

Проведенные исследования обнаружили увеличение экспрессии гена *tph2* в дорсальном ядре шва после как краткосрочного, так и хронического стресса (рис., а). При этом, однако, значительных изменений количества белка фермента в этом ядре не наблюдалось. В медианном ядре уровень мРНК *tph2* был также достоверно увеличен после хронического стресса, но в отличие от дорсального ядра снижен после повторного плавания. Количество белка фермента в медианном ядре было увеличено после повторного плавания и не отличалось от контроля после длительного стрессорного воздействия. Полученные результаты свидетельствуют о сходстве ответов гена и белка *TRH2* в дорсальном и медианном ядрах на длительный стресс и о различии ответов гена фермента в этих ядрах на непродолжительное воздействие. Рассогласование изменений экспрессии гена и белка фермента в исследованных целых ядрах шва может быть обусловлено специфическими особенностями ответов отдельных субрегионов этих ядер, что требует проведения дальнейшего анализа.

Экспрессия гена *bcl-xl* в дорсальном ядре шва демонстрировала тенденцию к увеличению



**Рис.** Экспрессия генов и белков *TRH2* (а) и *Bcl-xL* (б) после стресса принудительного плавания.

1 – контроль (нестрессированные животные), 2 – после двух дней стресса, 3 – после стресса в течение 14 дней. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем, \*\*  $p < 0,05$  по сравнению с двухдневным воздействием.

**Fig.** Gene and protein expression of *TRH2* (a) and *Bcl-xL* (b) after the forced swim stress.

1 – control (unstressed animals), 2 – after the second stress, 3 – after stress for 14 days. \*  $p < 0,05$  vs. an appropriate control; \*\*  $p < 0,05$  vs. the second stress.

( $p < 0,069$ ) после непродолжительного воздействия, но к снижению ( $p < 0,065$ ) – после длительного воздействия (рис., б). В медианном ядре непродолжительный стресс не влиял на экспрессию гена *bcl-xl*, в то время как длительное воздействие достоверно увеличивало экспрессию антиапоптозного фактора. Уровень белка Vcl-xL был достоверно увеличен в обоих ядрах после непродолжительного воздействия. После двухнедельного принудительного плавания количество антиапоптозного белка в медианном ядре продолжало оставаться повышенным, хотя и в значительно меньшей степени по сравнению с двухдневным воздействием, в то время как в дорсальном ядре содержание Vcl-xL после двух недель не отличалось от уровня у контрольных нестрессированных животных.

Характер индуцированных стрессом изменений экспрессии антиапоптозного белка, а именно повышение уровня белка Vcl-xL, обнаруженное после повторного плавания, может быть проявлением экстренного адаптивного ответа, направленного на защиту нейронов, в том числе и серотонинергических, от повреждающего действия стресса. Острые стрессорные воздействия, среди которых и принудительное плавание, как было показано, индуцируют в мозге гибель клеток (Heine *et al.*, 2004). Определенным свидетельством положительного действия Vcl-xL на 5-HT нейроны после повторного плавания могут служить достоверное увеличение в это время уровня белка TPH2 в нейронах медианного ядра и небольшая тенденция к такому увеличению, хотя и не достигающему уровня достоверности, в дорсальном ядре. В процессе повторяющихся плаваний ответ белка Vcl-xL на стресс снижается, что может сопровождаться уменьшением защитного эффекта и, возможно, явиться причиной ослабления активности 5-HT нейронов и, соответственно, 5-HT нейротрансмиссии в ключевых для психоэмоциональной регуляции структурах мозга. В этих условиях для поддержания базального уровня белка фермента, по крайней мере, в клеточных телах нейронов, очевидно, необходимо повышение активности системы его синтеза. Достоверное увеличение уровня мРНК  *tph2* в обоих исследованных ядрах может быть показателем такой компенсаторной активации 5-HT системы. Хотя представленная гипотеза

нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке, она предлагает первый реальный механизм парадоксального увеличения экспрессии гена  *tph2* (Bach-Mizrachi *et al.*, 2008) и уровня его белка (Boldrini *et al.*, 2005) в ядрах шва депрессивных больных.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнение работы поддержано грантами РФФИ (№ 12-04-01102-а и № 13-04-40014Н13), средствами бюджетного проекта VI.53.2.2, а также грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bach-Mizrachi H., Underwood M.D., Tin A., Ellis S.P., Mann J.J., Arango V. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides // *Mol. Psychiatry*. 2008. V. 13. No. 5. P. 507–513.
- Baumann B., Bielau H., Krell D., Agelink M.W., Diekmann S., Wurthmann C., Trübner K., Bernstein H.G., Danos P., Bogerts B. Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders // *Psychol. Med*. 2002. V. 32. No. 1. P. 93–103.
- Bethea C.L., Phu K., Reddy A.P., Cameron J.L. The effect of short-term stress on serotonin gene expression in high and low resilient macaques // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2013. V. 44. P. 143–153.
- Boldrini M., Underwood M.D., Mann J.J., Arango V. More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides // *Brain Res*. 2005. V. 1041. No. 1. P. 19–28.
- Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Downregulation of serotonergic gene expression in the Raphe nuclei of the midbrain under chronic social defeat stress in male mice // *Mol. Neurobiol*. 2013. V. 48. No. 1. P. 13–21.
- Canli T., Lesch K.P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition // *Nat. Neurosci*. 2007. V. 10. No. 9. P. 1103–1109.
- Celada P., Bortolozzi A., Artigas F. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research // *CNS Drugs*. 2013. V. 27. No. 9. P. 703–716.
- Chamas F.M., Underwood M.D., Arango V., Serova L., Kasir S.A., Mann J.J., Sabban E.L. Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei // *Biol. Psychiatry*. 2004. V. 55. No. 3. P. 278–283.
- Chen G.L., Miller G.M. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet*. 2012. V. 159B. No. 2. P. 152–171.
- Chen G.L., Miller G.M. Tryptophan hydroxylase-2: an emerg-

- ing therapeutic target for stress disorders // *Biochem. Pharmacol.* 2013. V. 85. No. 9. P. 1227–1233.
- Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 9. No. 4. P. 326–357.
- Drugan R.C., Hibl P.T., Kelly K.J., Dady K.F., Hale M.W., Lowry C.A. Prior cold water swim stress alters immobility in the forced swim test and associated activation of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus // *Neuroscience.* 2013. V. 253. P. 221–234.
- Fernandez S.P., Gaspar P. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion // *Neuropharmacology.* 2012. V. 62. No. 1. P. 144–154.
- Gardner K.L., Hale M.W., Oldfield S., Lightman S.L., Plotsky P.M., Lowry C.A. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus // *Neuroscience.* 2009. V. 163. No. 4. P. 991–1001.
- Gonzalez M.M., Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. No. 12. P. 4898–4903.
- Goswami D.B., May W.L., Stockmeier C.A., Austin M.C. Transcriptional expression of serotonergic regulators in laser-captured microdissected dorsal raphe neurons of subjects with major depressive disorder: sex-specific differences // *J. Neurochem.* 2010. V. 112. No. 2. P. 397–409.
- Hale M.W., Shekhar A., Lowry C.A. Development by environment interactions controlling tryptophan hydroxylase expression // *J. Chem. Neuroanat.* 2011. V. 41. No. 4. P. 219–226.
- Heine V.M., Maslam S., Zareno J., Joëls M., Lucassen P.J. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible // *Eur. J. Neurosci.* 2004. V. 19. No. 1. P. 131–144.
- Kempermann G., Kronenberg G. Depressed new neurons – adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression // *Biol. Psychiatry.* 2003. V. 54. No. 5. P. 499–503.
- Klempin F., Beis D., Mosienko V., Kempermann G., Bader M., Alenina N. Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. No. 19. P. 8270–8275.
- Kendler K.S., Karkowski L.M., Prescott C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression // *Am. J. Psychiatry.* 1999. V. 156. No. 6. P. 837–841.
- Kessing L.V., Agerbo E., Mortensen P.B. Does the impact of major stressful life events on the risk of developing depression change throughout life? // *Psychol. Med.* 2003. V. 33. No. 7. P. 1177–1184.
- Krishnan V., Nestler E.J. Animal models of depression: molecular perspectives // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2011. V. 7. P. 121–147.
- Mandelli L., Antypa N., Nearchou F.A., Vaiopoulos C., Stefanis C.N., Serretti A., Stefanis N.C. The role of serotonergic genes and environmental stress on the development of depressive symptoms and neuroticism // *J. Affect. Disord.* 2012. V. 142. No. 1–3. P. 82–89.
- Mann J.J., Currier D., Murphy L., Huang Y.Y., Galfalvy H., Brent D., Greenhill L., Oquendo M. No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover // *J. Affect. Disord.* 2008. V. 106. No. 1/2. P. 117–121.
- Matthews P.R., Harrison P.J. A morphometric, immunohistochemical, and *in situ* hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide // *J. Affect. Disord.* 2012. V. 137. No. 1/3. P. 125–134.
- Mezadri T.J., Batista G.M., Portes A.C., Marino-Neto J., Lino-de-Oliveira C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants // *J. Neurosci. Methods.* 2011. V. 195. No. 2. P. 200–205.
- Owens M.J., Nemeroff C.B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter // *Clin. Chem.* 1994. V. 40. No. 2. P. 288–295.
- Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. No. 4. P. 379–391.
- Ripke S., Wray N.R., Lewis C.M. *et al.* A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium // *Mol. Psychiatry.* 2013. V. 18. No. 4. P. 497–511.
- Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress // *Psychopharmacology (Berl)*. 2014. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00213-014-3718-8
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression // *Behav. Brain Res.* 2010. V. 213. No. 2. P. 218–224.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // *Neuropharmacology.* 2012. V. 62. No. 1. P. 177–183.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect // *Neuroscience.* 2007. V. 150. No. 2. P. 404–412.
- Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers // *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014:932757.
- Tsai S.J., Hong C.J., Liou Y.J., Yu Y.W., Chen T.J., Hou S.J., Yen F.C. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009. V. 33. No. 4. P. 637–641.
- Walther D.J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 66. No. 9. P. 1673–1680.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // *Science.* 2003.

V. 299. No. 5603. P. 76.  
Zheng L., Zheng X. Integration of animal behaviors under stresses with different time courses // *Neural Regen Res.* 2014. V. 9. No. 15. P. 1464–1473.  
Zill P., Baghai T.C., Zwanzger P., Schüle C., Eser D., Rup-

precht R., Möller H.J., Bondy B., Ackenheil M. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 9. No. 11. P. 1030–1036.

## TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 AND BCL-xL IN THE RAT RAPHE NUCLEUS AFTER ACUTE AND CHRONIC FORCED SWIM STRESS

G.T. Shishkina<sup>1</sup>, T.S. Kalinina<sup>1,2</sup>, V.V. Bulygina<sup>1</sup>, E.V. Babljuk<sup>1</sup>, N.N. Dygalo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Stressful events induce changes in the expression of numerous genes and their protein products in the brain. However, the mechanisms mediating these changes, as well as their significance for the development of stress-induced depression or for coping with stress, remain obscure. Evidence for the sensitivity of tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), the rate-limiting enzyme of the serotonin (5-HT) pathway, to stress is concisely reviewed, as well as the neuroprotective function of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain. The aim of our experiments was to investigate the gene and protein expression of TPH2 and Bcl-xL in the dorsal (DRN) and median (MRN) raphe nuclei during repeated stress events. Gene (RT PCR) and protein (immunohistochemistry) expression was assessed 24 hours after the second and fourteenth forced swim sessions. The increase in TPH2 protein expression observed after the second swim stress exposure might reflect the protective action of Bcl-xL. During the subsequent stressful events, the stress-induced increase in Bcl-xL expression decreased. This effect was associated with the weakening of serotonergic neuron function evidenced by the compensatory activation of the TPH2 gene expression without TPH2 protein increase. Thus, short- and long-term forced swimming resulted in qualitatively different alterations in brain expression of TPH and Bcl-xL, suggesting their specific roles during acute and chronic stages in the development of stress-induced psychopathology. These changes may constitute a component of the mechanisms underlying elevated *tph2* gene expression in depressed patients.

**Key words:** forced swim stress, tryptophan hydroxylase-2, Bcl-xL, depression.