

АКТИВНОСТЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ДОРСАЛЬНОГО ЯДРА ШВА НЕОБХОДИМА ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ КЕТАМИНА

© 2023 г. У. С. Дрозд^{1, 2, *}, Д. А. Ланшаков^{1, 2}, Н. Н. Дыгало^{1, 2}

¹ ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Кетамин – быстродействующий антидепрессант, вовлекает в свой терапевтический эффект серотонинергическую нейротрансмиссию. В работе исследована остававшаяся неясной зависимость этого эффекта препарата от активности серотонинергических (5-НТ) нейронов. Для этого определяли влияние кетамина на проявление депрессивно-подобного поведения крыс в тесте подвешивания за хвост на фоне оптогенетического снижения активности 5-НТ нейронов дорсального ядра шва мозга (DRN). В отличие от контрольных животных, у которых субанестетическая доза кетамина ослабляла проявление депрессивно-подобного поведения, на фоне блокады активности 5-НТ нейронов препарат не только утрачивал свое антидепрессантное действие, но и индуцировал про-депрессантное поведение. При этом, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов препятствовало вызванному кетаминотом повышению экспрессии *c-Fos* как в светочувствительных нейронах, так и в других нейронах DRN. Полученные результаты свидетельствуют, что активность 5-НТ нейронов является важным звеном быстрого терапевтического действия субанестетических доз кетамина.

Ключевые слова: кетамин, депрессивноподобное поведение, тест подвешивание за хвост, серотонин, дорсальное ядро шва, оптогенетика, *eArchT3.0*, лентивирусный вектор, белок *c-Fos*

DOI: 10.31857/S1027813323030081, EDN: YUSMKU

ВВЕДЕНИЕ

Большое депрессивное расстройство – многофакторное заболевание, характеризующееся дисфункциями нейротрансмиттерных систем мозга [1, 2]. Кетамин – один из быстродействующих антидепрессантов, эффективен в клинике даже у пациентов, страдающих депрессией, устойчивой к лечению другими препаратами [3, 4]. Антидепрессантное действие кетамина в первую очередь проявляется через антагонизм к рецепторам глутамата типа NMDAR [5, 6]. Для эффектов кетамина, связанных с NMDAR, предполагается два возможных пути действия: преимущественного ингибирования NMDAR на ГАМК-ергических интернейронах и, тем самым, растормаживания глутаматергических нейронов, или ингибирования NMDAR пирамидных нейронов, что приводит к уменьшению подавления эукариотического фактора элонгации 2 и повышению синаптической пластичности и активности этих нейронов [7–9].

В дополнение к глутаматергическим эффектам, кетамин модулирует и моноаминергическую нейротрансмиссию. Он увеличивает активность серотонинергических (5-НТ) нейронов дорсального ядра шва (DRN) [9, 10], а в префронтальной коре (PFC) повышает внеклеточный уровень 5-НТ и вызываемое им возбуждение [11, 12]. При этом стимулируются 5-НТ1А рецепторы PFC, активирующие сигнальный путь PI3K/Akt/mTORC1 [10]. Кетамин также модулирует связывание 5-НТ с его рецепторами 1В типа [13], активация которых вовлекается в действие антидепрессанта [14].

Активность DRN регулируется несколькими глутаматергическими афферентными проекциями, в том числе поступающими из PFC [10], которые контролируют выбор активного/пассивного поведенческого состояния и социальный выбор [11]. Вызванное кетаминотом повышение активности 5-НТ системы может быть опосредовано глутаматергическими проекциями медиальной префронтальной коры (mPFC) в DRN [12]. Это подтверждается тем, что локальная инъекция кетамина в DRN не оказывает антидепрессантного эффекта, в отличие от локальной инъекции этого препарата в

* Адресат для корреспонденции: 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10; e-mail: drozd@bionet.nsc.ru.

mPFC [15]. Оптогенетическая стимуляция возбуждающих афферентов от mPFC к DRN активирует 5-НТ нейроны DRN [16]. Однако такая стимуляция активирует и ГАМК-ергические нейроны DRN, которые, напротив, ингибируют 5-НТ нейроны [17]. Кетамин активирует также и холинергические нейроны педункулопонтинного ядра покрышки, дающие проекции на нейроны DRN, а повышенный уровень ацетилхолина стимулирует пресинаптические никотиновые рецепторы $\alpha 4\beta 2$, локализованные на глутаматергических нейронах DRN [18], что приводит к увеличению локального высвобождения глутамата. Активация глутаматом AMPA-рецепторов на 5-НТ нейронах DRN индуцирует высвобождение 5-НТ в mPFC [15]. Не остается сомнений что, кетамин влияет на активность 5-НТ нейронов DRN, и его антидепрессантные эффекты могут быть связаны с его действием на 5-НТ систему [12, 14–16]. Хотя блокада синтеза 5-НТ фармакологическими методами ослабляет или устраняет устойчивые поведенческие эффекты кетамина [19, 20], снижение уровня 5-НТ не влияет на острые эффекты кетамина, и лишь затрудняет развитие долговременного антидепрессантного действия [21]. Поэтому остается не ясным, является ли активация 5-НТ нейронов DRN важным звеном в цепочке быстрого антидепрессантного действия кетамина.

В целом, несмотря на значительный объем информации о взаимодействии глутамата и 5-НТ в механизме действия кетамина, роль активации 5-НТ нейронов DRN в проявлении антидепрессантного действия этого препарата остается неясной. Для устранения этого пробела в данной работе изучали влияние оптогенетического [22], быстрого подавления активности 5-НТ нейронов DRN, в проявлении антидепрессивного действия кетамина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов были созданы лентивирусные частицы на основе плазмид, полученных от проф. Нишитани [23], при помощи трансфекции культуры клеток HEK293. Плазида TRN2-eArchT3.0-eYFP-WPRE содержит последовательность гена протонного насоса археародопсина (eArchT3.0), конъюгированного с желтым флуоресцентным белком (eYFP), экспрессия которого регулируется промотором TRN2. В качестве контроля использовалась плазида TRN2-Venus-WPRE (Venus), кодирующая зеленый флуоресцентный белок Venus. Клетки были трансфицированы смесью плазмид для сборки вирусного капсида (pPAX2 и pMD2.G) и TRN2-eArchT3.0-eYFP-WPRE либо TRN2-Venus-WPRE при помощи полиэтиленimina [24]. Вирусные частицы были выделены из культуры клеток с использованием PEG 6000, осаждены на колонках с четвертичным аммонием

(DIAPAC-TA, ЗАО БиоХимМак СТ, Россия) и сконцентрированы до титра 10^{12} частиц/мл на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-4 (Мерк, США) [25].

В экспериментах использовали взрослых, 2.5–3-месячных самцов крыс линии Wistar, весом 220–250 г. Животные содержались в виварии ИЦиГ СО РАН по 4 в клетках (40 см × 25 см × 15 см) в условиях свободного доступа к воде и корму, при 12-ч цикле свет/темнота и температуре 20–22°C. Все процедуры проводились в соответствии с Международными европейскими биоэтическими стандартами (86/609-ЕЕС), российскими правилами работы над лабораторными животными (N 267 19.06.2003) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН. Все манипуляции с животными проводились между 9 и 13 ч. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

В DRN вирусные частицы вводили стереотаксически по координатам AP = –7.7 мм, ML = 0 мм, DV = 7 мм [26]. Животных наркотизировали авертином, фиксировали в стереотаксической раме, и через небольшое отверстие в черепе, микро-шприцом нейрос (Гамильтон, США) в течение 7 мин вводили 1 мкл вирусных частиц. Разрез кожи зашивали и проводили обработку антибиотиками.

Через неделю в область DRN стереотаксически вживляли и закрепляли на черепе оптоволоконные канюли. Для этого использовали расширенное отверстие в черепе, сделанное для введения вируса, с последующей постоперационной обработкой.

Через неделю после вживления оптоволоконных канюль четверем животным из каждой группы был введен кетамин в субанестетической дозе (15 мг/кг веса тела), а четверем другим – физиологический раствор в эквивалентном объеме (0.5 мл/100 г веса тела) внутривенно. Через час после инъекции все животные подвергались оптической стимуляции в процессе теста подвешивание за хвост. Для этого оптоволоконный кабель соединяли с канюлей, после чего животных быстро подвешивали клейкой лентой за область основания хвоста на высоте 60 см от пола на 5 мин. В 1, 3 и 5 мин теста DRN облучали зеленым светом (560 нм, 1.2 мВ/мм², 20 Гц). У одной крысы группы eArchT3.0-eYFP x Кетамин оптокабель отсоединился от канюли, и животное выбыло из эксперимента. Поведение в тесте записывали на видеокамеру, и время неподвижности в тесте оценивалось экспертами, неосведомленными о принадлежности животного к группе воздействия.

Через 1 ч после теста наркотизированных авертином животных транскардиально перфузировали 1× PBS и 4% PFA. Извлеченный мозг постфиксировали 12 ч в 4% параформальдегиде, затем сутки в 30% сахарозе, после чего замораживали в геле Richard-Allan Scientific Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при температуре –70°C.

Для иммуногистохимического анализа готовились срезы толщиной 20 мкм на криотоме,

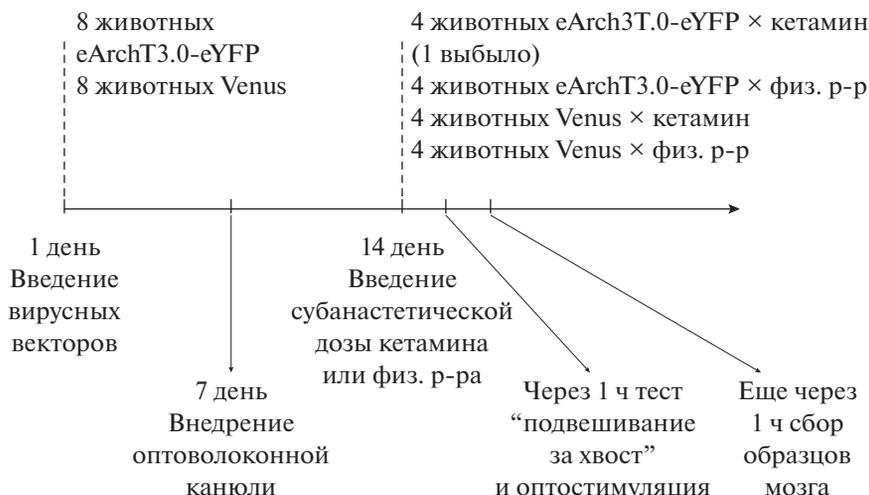


Рис. 1. Схема эксперимента.

которые перед окрашиванием высушивали при температуре 37°C в течение 1 ч и промывали 10 мин. в PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в PBST, содержащем 1.5% бычий сывороточный альбумин (BSA) в течение часа при комнатной температуре. С первичными антителами (табл. 1) срезы инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Антитела разводили в PBST, содержащем 1.5% BSA в разведении 1 : 200. После инкубации с первичными антителами срезы промывали дважды по 15 мин в PBST и инкубировали с вторичными антителами (табл. 1) в разведении 1 : 500 в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем дважды промывали в PBST, 1 раз в PBS по 15 мин и заключали в мовеол, содержащий ядерный краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) [27].

Препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO (“Carl Zeiss”, Германия) при 20× увеличении. Анализ фотографий проводили с помощью программы QuPath [28]. Подсчитывалось количество c-Fos, eArchT3.0-eYFP/Venus и TRH2 экспрессирующих нейронов на 1 мм², а также количество коэкспрессирующих eArchT3.0-eYFP/Venus + TRH2 нейронов для оценки специфичности и эффективности экспрессии вирусных векторов, а также eArchT3.0-eYFP/Venus + c-Fos клеток для оценки влияния облучения светом на активность нейронов. В программе QuPath для этого использовалась детекция клеток по ядрам, окрашенным DAPI с последующей классификацией, осуществленной на основе подсчета зеленых и красных пикселей. Порог интенсивности для детекции пикселей и классификации был подобран для каждого типа окрашивания отдельно и применен ко всем фотографиям в выборке одинаково.

По количественным данным рассчитывалось среднее значение со стандартным отклонением от среднего. Для оценки экспрессии c-Fos в экспрес-

сирующих вектор нейронах рассчитывался процент коэкспрессирующих eArchT3.0-eYFP/Venus + c-Fos от общего числа экспрессирующих вектор клеток по формуле (количество коэкспрессирующих клеток/количество экспрессирующих c-Fos клеток) × 100%.

Для проверки нормальности данных был использован тест Колмогорова–Смирнова. Показатели поведенческого теста обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом для повторных измерений (фактор 1 – вектор, фактор 2 – кетамин), а результаты иммуногистохимического анализа оптогенетической модуляции активности нейронов чувствительной и нечувствительной к свету групп животных двухфакторным дисперсионным анализом (фактор 1 – вектор, фактор 2 – кетамин), с последующим апостериорным сравнением по Фишеру. Достоверным результат считали при $p < 0.05$. Статистические расчеты проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ депрессивноподобного поведения в тесте подвешивание за хвост выявил достоверное влияние качества вектора (фоточувствительный или нет) на время неподвижности (Вектор: $F(1, 11) = 12.681, p < 0.004$) и наличие взаимодействия факторов Вектор × Кетамин: ($F(1, 11) = 18.508, p < 0.001$). У животных с контрольным вектором наблюдалось вызванное кетамином снижение времени неподвижности, что особенно проявлялось на 2 и 3 мин теста. Оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов DRN обращало этот антидепрессантный эффект в про-депрессантный – время неподвижности в тесте подвешивание за хвост увеличивалось. Наиболее показательны первые минуты теста, в течение 1 и 3 из которых DRN освещали зеленым светом, и у животных группы “eArchT3.0 × Кетамин” проявлялся про-депрес-

Таблица 1. Антитела, использованные для иммуногистологического выявления белков

Выявляемый белок	Первичные антитела	Вторичные антитела
c-Fos	9F6, Rabbit, "Cell Signaling"	711-606-152 Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), "Jackson ImmunoResearch Laboratories"
eArchT3.0-eYFP/Venus	AB1218, "Rabbit, Abcam"	711-545-152 Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H + L), "Jackson ImmunoResearch Laboratories"
TRH2	AB1541, Sheep, "Millipore"	20095, Donkey Anti-Sheep IgG (H + L), CF568, "Biotium"

сантный эффект препарата. В течение 2-ой мин, когда освещение не проводилось, эта группа не отличалась от контрольной. К 4-ой и 5-ой мин теста антидепрессантный эффект кетамина у группы "Venus × Кетамин" нивелировался, а у животных группы "eArchT3.0 × Кетамин" про-депрессантный эффект оптогенетической стимуляции сохранялся (рис. 2).

Длительность неподвижности в каждую мин теста увеличивалась по мере его продолжительности (Мин теста: $F(4, 44) = 15.6739, p = 0.000$). Эффект кетамина также зависел от продолжительности теста (Кетамин × Мин $F(4, 44) = 3.683, p = 0.011$).

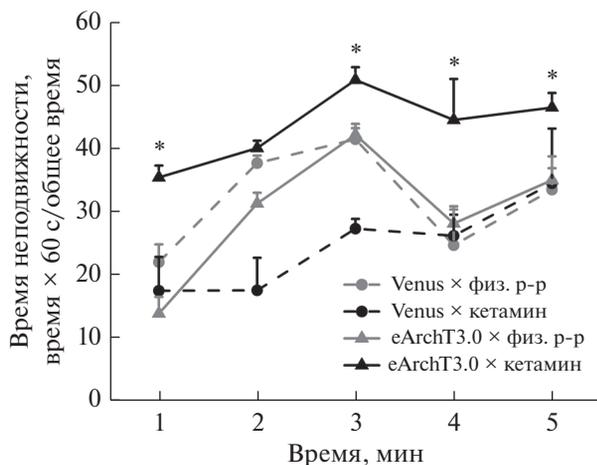


Рис. 2. Изменение времени неподвижности в течение каждой из 5 мин теста подвешивания за хвост при оптогенетическом подавлении активности 5-НТ нейронов DRN на фоне предварительного введения кетамина. Кетамин (15 мг/кг), введенный за час до теста, снижал время неподвижности у животных с контрольным вектором, но увеличивал его у животных с вектором, экспрессирующим eArchT3.0. В течение 1, 3, 4 и 5 мин теста фоточувствительные животные группы "eArchT3.0 × Кетамин" достоверно превосходили контрольных крыс "Venus × Кетамин" по продолжительности неподвижности ($n = 4$ (3 в группе "eArchT3.0 × Кетамин"), $n =$ количество животных в группе. * p от <0.05 до <0.001).

Через 2 недели после введения векторов $90.72 \pm 1.13\%$ нейронов, экспрессирующих Venus, а также $94.05 \pm 1.03\%$ нейронов, экспрессирующих eArchT3.0-eYFP, были также иммунопозитивны по TRH2. Следовательно, векторы специфически экспрессировались в 5-НТ нейронах (рис. 3). Кроме того, $42.46 \pm 2.16\%$ TRH2 позитивных нейронов экспрессировали Venus, и $41.64 \pm 2.12\%$ экспрессировали eArchT3.0-eYFP.

У животных с контрольным вектором кетамин повышал процент нейронов, экспрессирующих c-Fos среди экспрессирующих вектор Venus клеток. Однако у животных с вектором, кодирующим фоточувствительный белок, экспрессия c-Fos в клетках, иммунопозитивных по eArchT3.0-eYFP, после введения кетамина и фотостимуляции не изменялась (рис. 4а).

Количество коэкспрессирующих c-Fos + TRH2 нейронов было повышено у животных, которые получали кетамин и не были чувствительны к свету, по сравнению со всеми остальными группами. Однако у животных, активность 5-НТ нейронов DRN которых была оптогенетически подавлена, кетамин не вызывал увеличения количества коэкспрессирующих c-Fos + TRH2 нейронов (рис. 4б).

Вместе с тем, кетамин увеличивал в DRN контрольных животных количество нейронов, которые экспрессировали только c-Fos, но не вектор и/или TRH2. Однако у животных, активность 5-НТ нейронов которых была оптогенетически подавлена, такого увеличения не происходило (рис. 4в). В то же время, у животных, которым вводили физиологический раствор, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов не изменяло экспрессию c-Fos в DRN.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

За последние 20 лет кетамин привлек большое внимание из-за его быстрого антидепрессивного действия после однократной субанестетической дозы у пациентов с резистентной к лечению депрессией [2, 3]. На животных моделях было показано, что этот препарат уменьшает проявление депрессивноподобного поведения и увеличивает активность AMPAR, уровень фосфорилирован-

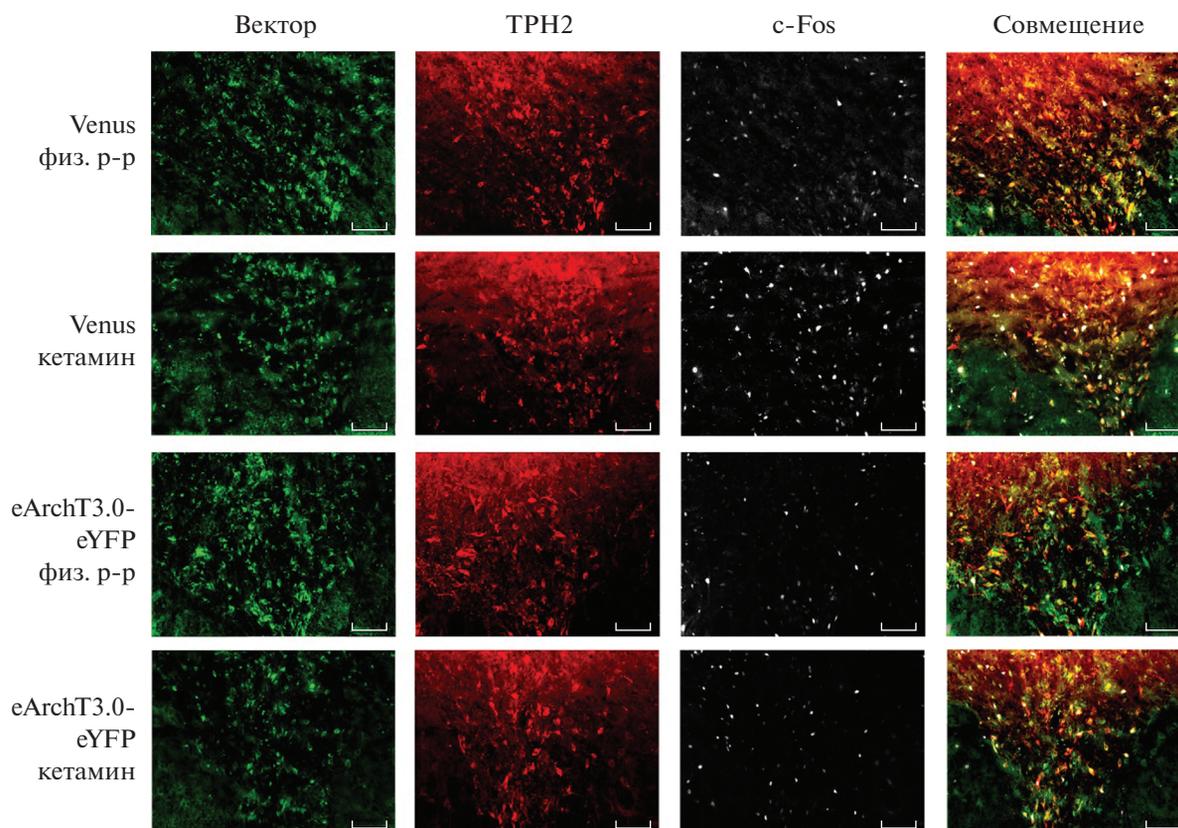


Рис. 3. Экспрессия c-Fos и векторов в нейронах, экспрессирующих триптофангидроксилазу-2 (TPH2) после оптогенетического ингибирования 5-НТ нейронов DRN в тесте подвешивания за хвост после предварительного введения субанестетической дозы кетамина. Векторы специфично экспрессировались в 5-НТ нейронах. Кетамин увеличивал экспрессию c-Fos в нейронах DRN, оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов, предупреждало это повышение. Шкала 100 мкм.

ного mTOR и экспрессию BDNF [7]. Кроме того, многие исследования подчеркивали участие 5-НТ нейротрансмиссии в механизме действия кетамина [12, 14–16].

Действительно, в нашем эксперименте субанестетическая доза кетамина ожидаемо снижала депрессивноподобное поведение у животных с функционально активными 5-НТ нейронами DRN во время теста подвешивание за хвост. Напротив, у животных с оптогенетически заторможенной активностью этих нейронов наблюдалась увеличение времени неподвижности по сравнению с контрольными группами. В других исследованиях фармакологическая блокада синтеза 5-НТ параклорфенилаланином [19, 20] предотвращала антидепрессантное действие кетамина в тесте принудительного плавания, но в нашем исследовании кратковременное подавление активности серотонинергических нейронов при помощи оптогенетики привело к превращению эффекта кетамина в про-депрессантный и/или седативный. Важно отметить, что наблюдался некоторый накопительный эффект оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов по мере продолжительности теста подвешивание за хвост у животных с предваритель-

ным введением кетамина, что может быть связано с кинетикой археародопсина, который является протонной помпой [29], и/или режимом освещения.

Системное введение кетамина активирует глутаматергические проекции из PFC идущие в DRN [10]. AMPAR в DRN находятся как на 5-НТ-, так и на ГАМК-ергических нейронах [30]. 5-НТ — и ГАМК-ергические нейроны в DRN получают сигналы как друг от друга, так и из других областей мозга, причем, как возбуждающие, так и тормозные [30]. Конечный эффект на активность нейронов, очевидно, зависит от баланса возбуждающих и тормозных сигналов. В тоже время, неясно, влияют ли глутаматергические проекции mPFC непосредственно на 5-НТ нейроны или через ГАМК-ергические интернейроны, локализованные в DRN. Не исключено также, что в ответ на кетамин вовлекаются не все, а только определенная группа 5-НТ нейронов в DRN, которые имеют проекции в mPFC [12]. Возможно, поэтому неизбирательное ингибирование активности 5-НТ нейронов в DRN в наших опытах могло привести к обращению антидепрессантного действия кетамина в седативный.

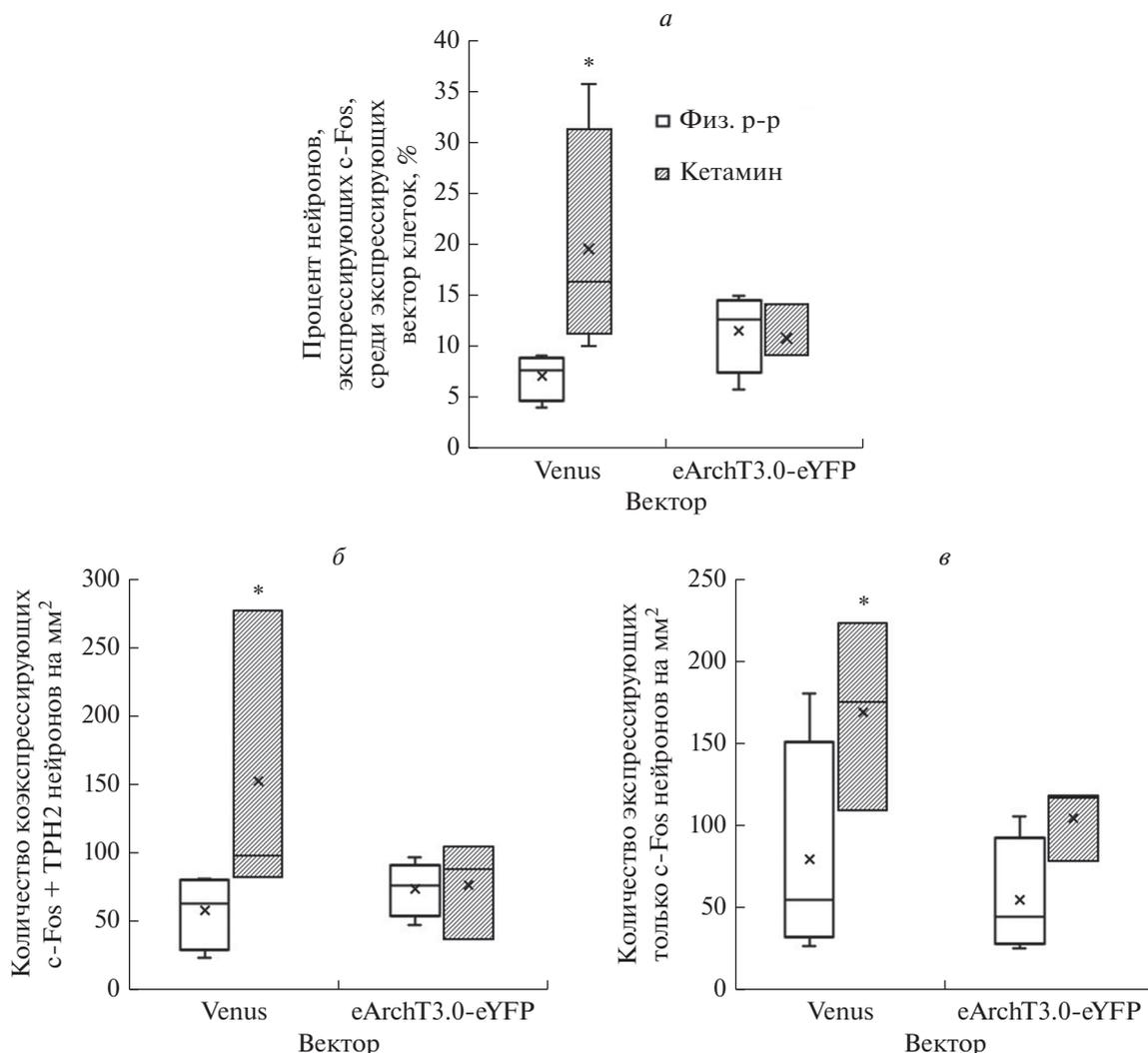


Рис. 4. Изменение экспрессии белка раннего ответа *c-Fos* в нейронах DRN после теста подвешивание за хвост после предварительного введения субанестетической дозы кетамина: *а* – изменение экспрессии *c-Fos* в нейронах DRN, экспрессирующих оптогенетический вектор eArchT3.0-eYFP или контрольный вектор Venus; *б* – изменение экспрессии *c-Fos* в экспрессирующих TRH2 нейронах DRN; *в* – изменение количества экспрессирующих только *c-Fos*, но не вектор и/или TRH2 нейронов DRN. ($n = 4$ (3 в группе “eArchT3.0 × Кетамин”), $n =$ количество животных в группе * <0.05 по сравнению с группой “Venus × физиологический раствор”).

Кроме того, оптогенетическое воздействие предотвращало вызванное кетамином увеличение экспрессии белка раннего ответа *c-Fos*. Ранее уже было показано, что кетамин увеличивает экспрессию *c-Fos* в 5-НТ нейронах DRN [31, 32], однако в нашем исследовании обнаружено, что увеличение экспрессии *c-Fos* после введения кетамина происходит не только в 5-НТ, но и в нейронах, которые не экспрессируют TRH2. Более того, лишь около 42% 5-НТ нейронов экспрессировали светочувствительный белок eArchT3.0-eYFP, но подавление активности этой части нейронов было достаточно для того, чтобы предупредить вызванное кетамином увеличение экспрессии *c-Fos* не только в экспрессирующих вектор клетках, но и в других нейронах DRN. Ранее было показано,

что кетамин не влияет на выброс 5-НТ или активность 5-НТ1А ауторецепторов в DRN [33]. В тоже время, увеличение количества *c-Fos*-позитивных нейронов DRN не являющихся 5-НТ нейронами, может свидетельствовать в пользу вовлечения в механизм действия кетамина взаимодействий в пределах DRN между 5-НТ- и ГАМК-ергическими нейронами, что заслуживает внимания и требует дальнейшего изучения.

Важным аспектом является, что поведение в тесте подвешивание за хвост и экспрессия *c-Fos* в DRN не изменяются после оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов этого ядра у животных, которым вводили физиологический раствор. Ингибирующее активность нейронов оптогенетическое воздействие снижало экспрес-

сию c-Fos в eArchT3.0-eYFP-позитивных 5-НТ нейронах DRN наркотизированных животных [34], но у активно бодрствующих животных такой эффект не наблюдался.

Ранее другая группа исследователей обнаружила, что ингибирование 5-НТ нейронов DRN с помощью того же вектора, что и в нашем исследовании, не влияла на время неподвижности в тесте принудительного плавания. Блокада активности этих нейронов повышала тревожность крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, но не в тесте открытого поля [24]. Напротив, оптогенетическая активация 5-НТ нейронов DRN [24] или возбуждающих проекций mPFC-DRN [16] вызывала в тесте подвешивание за хвост антидепрессантно-подобный эффект. Однако торможение этих проекций также вызывало антидепрессантный эффект в модели социального поражения, что авторы связывали с вовлечением в ответ ГАМК-ергических нейронов [17]. Некоторая противоречивость данных, очевидно, связана с особенностями поведенческих моделей, вызывающих реакции избегания или замирания в зависимости от условий теста. Сложные взаимодействия в сети глутамат-, ГАМК- и 5-НТ нейронов, участвующих в модуляции поведенческого ответа на кетамин [35], также могут способствовать вариативности результатов.

Известно, что разрядная активность нейронов DRN меняется в зависимости от изменения поведения в тесте подвешивание за хвост [36]. Нейроны DRN, экспрессирующие транспортер 5-НТ, были активны, когда животное находилось в домашней клетке, независимо от того, двигалось оно или нет, но во время теста подвешивание за хвост разрядная активность этих нейронов была высокой в мобильных состояниях и низкой в неподвижных состояниях. В тоже время часть экспрессирующих паравалбумин ГАМК-ергических нейронов DRN активны во время периодов неподвижности, тогда как другая их часть не активна [37]. Другими словами, существуют сложные нейронные сети с участием подтипов локальных тормозных нейронов, которые участвуют в регуляции баланса возбуждения и торможения в DRN, которые еще плохо изучены. Наши результаты показывают, что оптогенетическое подавление активности 5-НТ нейронов DRN изменяет действие кетамина на поведение в тесте подвешивание за хвост и экспрессию белка c-Fos, но не влияет на эти показатели контрольных животных, что указывает на вероятную тонкую регуляцию сложных взаимодействий между нейронами DRN в обеспечении ответов на ситуации, вызывающие проявления борьбы или отчаяния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые показана ключевая роль активности 5-НТ нейронов DRN в проявлении быстрого антидепрессантного эффекта кетамина

и потенциальная вовлеченность нейронов других нейротрансмиттерных систем DRN в этот эффект. Обращение антидепрессантного действия субанестетической дозы препарата в седативный при блокаде активности 5-НТ нейронов качественно расширяет спектр возможных эффектов кетамина и требует дальнейшего изучения. Полученные данные дополняют имеющиеся сведения о механизме действия кетамина необходимые для разработки следующего поколения более эффективных антидепрессантов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Naoya Nishitani, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto, Japan за любезно предоставленные плазмиды TRN2-eArchT3.0-eYFP-WPRE и TRN2-Venus-WPRE.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0002.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shishkina G.T., Dygalo N.N.* // Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I.P. Pavlova. 2010. V. 60. № 2. P. 138–152.
2. *Liu B., Liu J., Wang M., Zhang Y., Li L.* // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2017. V. 11. P. 305.
3. *Pham T.H., Gardier A.M.* // Pharmacology & Therapeutics. 2019. V. 199. P. 58–90.
4. *Krystal J.H., Abdallah C.G., Sanacora G., Charney D.S., Duman R.S.* // Neuron. 2019. V. 101 № 5. P. 774–778.
5. *Yang C., Yang J., Luo A., Hashimoto K.* // Translational Psychiatry. 2019. V. 9. № 1. P. 280.
6. *Zanos P., Moaddel R., Morris P.J., Riggs L.M., Highland J.N., Georgiou P., Pereira E.F.R., Albuquerque E.X., Thomas C.J., Zarate C.A., Jr.* // Pharmacological Reviews. 2018. V. 70. № 3. P. 621–660.
7. *Miller O.H., Moran J.T., Hall B.J.* // Neuropharmacology. 2016. V. 100. P. 17–26.
8. *Nosyreva E., Szabla K., Autry A.E., Ryazanov A.G., Monteggia L.M., Kavalali E.T.* // Journal of Neuroscience. 2013. V. 33. № 16. P. 6990–7002.
9. *Gerhard D.M., Pothula S., Liu R.J., Wu M., Li X.Y., Girgenti M.J., Taylor S.R., Duman C.H., Delpire E., Piccirotto M., Eric S., Wohleb E.S., Duman R.S.* // The Journal of Clinical Investigation. 2020. V. 130. № 3. P. 1336–1349.
10. *Fukumoto K., Iijima M., Funakoshi T., Chaki S.* // Neuropharmacology. 2018. V. 137. P. 96–103.
11. *Ago Y., Tanabe W., Higuchi M., Tsukada S., Tanaka T., Yamaguchi T., Igarashi H., Yokoyama R., Seiriki K., Ka-*

- sai A., Nakazawa T., Nakagawa S., Hashimoto K., Hashimoto H. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2019. V. 22. № 10. P. 665–674.
12. López-Gil X., Jiménez-Sánchez L., Campa L., Castro E., Frago C., Adell A. // ACS Chemical Neuroscience. 2019. V. 10. № 7. P. 3318–3326.
 13. Tiger M., Veldman E.R., Ekman C.J., Halldin C., Svenningsson P., Lundberg J. // Translational Psychiatry. 2020. V. 10. № 1. P. 159.
 14. Du Jardin K.G., Liebenberg N., Cajina M., Müller H.K., Elfving B., Sanchez C., Wegener G. // Frontiers in Pharmacology. 2018. V. 8. P. 978.
 15. Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2014. V. 17. № 8. P. 1321–1326.
 16. Warden M.R., Selimbeyoglu A., Mirzabekov J.J., Lo M., Thompson K.R., Kim S.Y., Adhikari A., Tye K.M., Frank L.M., Deisseroth K. // Nature. 2012. V. 492. P. 428–432.
 17. Challis C., Beck S.G., Berton O. // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2014. V. 8. P. 43.
 18. Kinoshita H., Nishitani N., Nagai Y., Andoh C., Asaoka N., Kawai H., Shibui N., Nagayasu K., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2018. V. 21. № 3. P. 305–310.
 19. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. // Psychopharmacology. 2014. V. 231. № 11. P. 2291–2298.
 20. Du Jardin K.G., Liebenberg N., Müller H.K., Elfving B., Sanchez C., Wegener G. // Psychopharmacology. 2016. V. 233. P. 2813–2825.
 21. Gigliucci V., O'Dowd G., Casey S., Egan D., Gibney S., Harkin A. // Psychopharmacology. 2013. V. 228. № 1. P. 157–166.
 22. Fakhoury M. // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2021. V. 106. P. 110094.
 23. Nishitani N., Nagayasu K., Asaoka N., Yamashiro M., Andoh C., Nagai Y., Kinoshita H., Kawai H., Shibui N., Liu B., Hewinson J., Shirakawa H., Nakagawa T., Hashimoto H., Kasparov S., Kaneko S. // Neuropsychopharmacology. 2019. V. 44. № 4. P. 721.
 24. McClure C., Cole K.L., Wulff P., Klugmann M., Murray A.J. // JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2011. № 57. P. e3348.
 25. Шабурова Е.В., Ланшаков Д.А. // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 5. С. 89–97.
 26. Paxinos G., Watson C. // The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, 1998.
 27. Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // Neurobiology of Disease. 2016. V. 91. P. 1–9.
 28. Bankhead P., Loughrey M.B., Fernández J.A., Dombrowski Y., McArt D.G., Dunne P.D., McQuaid S., Gray R.T., Murray L.J., Coleman H.G., James J.A., Salto-Tellez M., Hamilton P.W. // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 1. P. 1–7.
 29. Krol A., Lopez-Huerta V.G., Corey T.E., Deisseroth K., Ting J.T., Feng G. // Frontiers in Neural Circuits. 2019. V. 13. P. 4.
 30. Pham T.H., Mendez-David I., Defaix C., Guiard B.P., Tritschler L., David D.J., Gardier A.M. // Neuropharmacology. 2017. V. 112. P. 198–209.
 31. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. // Neuropsychopharmacology. 2016. V. 41. № 4. P. 1046–1056.
 32. Dolzani S.D., Baratta M.V., Moss J.M., Leslie N.L., Tilden S.G., Sorensen A.T., Watkins L.R., Lin Y., Maier S.F. // Eneuro. 2018. V. 5. № 1.
 33. Hernández-Vázquez F., Garduño J., Hernández-López S. // Reviews in the Neurosciences. 2019. T. 30. № 3. С. 289–303.
 34. Drozd U.S., Lanshakov D.A. // Интегративная физиология. 2020. Т. 1. № 2. С. 144–146.
 35. Li Y.F. // Pharmacology & Therapeutics. 2020. V. 208. P. 107494.
 36. Seo C., Guru A., Jin M., Ito B., Slezzer B.J., Ho Y.Y., Wang E., Boada C., Krupa N.A., Kullakanda D.S., Shen C.X. // Science. 2019. V. 363. № 6426. P. 538–542.
 37. Zhou L., Liu D., Xie Z., Deng D., Shi G., Zhao J., Bai S., Yang L., Zhang R., Shi Y. // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2022. V. 16. P. 200.

Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurons Activity Is Necessary for the Manifestation of the Antidepressant Effect of Ketamine

U. S. Drozd^{a, b}, D. A. Lanshakov^{a, b}, and N. N. Dygalo^{a, b}

^a Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Mechanisms of the ketamine antidepressant effects observed in humans and laboratory animals are not fully understood. To further clarify the role of the brain serotonergic (5-HT) activity in the drug antidepressant action, optogenetic inhibition of 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus (DRN) was applied. In control animals, a subanesthetic dose of ketamine alleviated their depressive-like behavior in the tail suspension test. Inhibition of 5-HT neurons abolished the drug effect and moreover, a sedative response to ketamine was found under these conditions. Furthermore, optogenetic suppression of the activity of 5-HT neurons prevented the increase in c-Fos expression induced by ketamine both in light-sensitive neurons and in other DRN neurons. The data emphasize the key role of 5-HT neuron activity in the rapid ketamine antidepressant effect.

Keywords: ketamine, depressive-like behavior, tail suspension test, 5-HT, dorsal raphe nucleus, optogenetics, eArchT3.0, lentiviral vector, c-Fos protein