

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук

на правах рукописи

Родный Александр Ярославович

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-HT₇ РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ НА
РЕГУЛЯЦИЮ НОРМАЛЬНОГО И ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОГО
ПОВЕДЕНИЯ И ПЛАСТИЧНОСТЬ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ
МОЗГА**

1.5.5 – физиология человека и животных
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
В. С. Наumenко

Новосибирск - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМА В ЦНС	12
1.2. ЦЕНТРАЛЬНЫЕ 5-НТ РЕЦЕПТОРЫ.....	15
1.3. 5-НТ _{1A} РЕЦЕПТОРЫ	18
1.3.1. Характеристика 5-НТ _{1A} рецепторов.....	18
1.3.2. Канонические сигнальные пути 5-НТ _{1A} рецепторов	20
1.3.3. Неканонические сигнальные пути 5-НТ _{1A} рецепторов.....	20
1.3.4. Механизмы десенситизации 5-НТ _{1A} рецепторов	22
1.3.5. Влияние 5-НТ _{1A} рецепторов на тревожность, агрессивное и депрессивное поведение	23
1.4. 5-НТ ₇ РЕЦЕПТОРЫ	24
1.4.1. Характеристика 5-НТ ₇ рецепторов	24
1.4.2. Канонические сигнальные пути 5-НТ ₇ рецепторов	26
1.4.3. Неканонические сигнальные пути 5-НТ ₇ рецепторов	26
1.4.4. Механизмы регуляции 5-НТ ₇ рецепторов	27
1.4.5. Физиологические функции, опосредуемые 5-НТ ₇ рецепторами	28
1.4.6. Роль 5-НТ ₇ рецепторов в формировании рецепторных комплексов.....	30
1.5. МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕПРЕССИИ И ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ СОСТОЯНИЙ.....	33
1.5.1. Проблема депрессивных расстройств в современном мире	33
1.5.2. Моделирование депрессии и депрессивно-подобных состояний	35
1.5.3. Модели первичной депрессии на животных.....	39
1.5.4. Модели вторичной или ятрогенной депрессии на животных	42
1.5.5. Генетические модели депрессии.....	43
1.6. ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ КАК ИНСТРУМЕНТЫ НЕЙРОБИОЛОГИИ	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ	51
2.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СЕРИИ	51
2.3. МЕТОДЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ	53
2.3.1. Поддержание клеточной линии и трансфекция.....	53
2.3.2. Нарabотка вирусных частиц.....	53
2.3.3. Первичная нейрональная культура.....	53
2.4. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ МЕТОДЫ	54
2.5. СТЕРЕОТАКСИЧЕСКИЙ МЕТОД.....	55
2.6. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ	56
2.7. ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ТЕСТЫ	57

2.7.1. Тест «открытое поле».....	57
2.6.2. Тест «принудительное плавание»	57
2.7. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ.....	58
2.7.1. Выделение общей РНК.....	58
2.7.2. Реакция обратной транскрипции.....	58
2.7.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (<i>real-time PCR</i>).....	58
2.8. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	60
2.8.1. Реактивы.....	60
2.8.2. Экстракция	60
2.8.3. Хроматографический анализ	60
2.8.4. Количественный анализ.....	61
2.8.5. Обоснование метода.....	62
2.9. ИЗМЕРЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА ПО ПРОТОКОЛУ БРЕДФОРДА	63
2.10. WESTERN-BLOT АНАЛИЗ	64
2.11. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ДАННЫХ	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	67
3.1. ОЦЕНКА РАБОТОСПОСОБНОСТИ AAV_SYN_HTR7-EGFP И AAV_SYN_EGFP ВЕКТОРНЫХ КОНСТРУКТОВ	67
3.2. СВЕРХЭКСПРЕССИЯ 5-НТ ₇ РЕЦЕПТОРА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6J.....	70
3.2.1. Поведенческие тесты.....	70
3.2.1. Уровень мРНК и белка.....	71
3.2.1. Уровень и обмен серотонина	73
3.3. СВЕРХЭКСПРЕССИЯ 5-НТ ₇ РЕЦЕПТОРА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ ASC/CSG	75
3.3.1. Поведенческие тесты.....	75
3.3.2. Уровни мРНК и белка.....	76
3.2.1. Уровень и обмен серотонина	78
3.4. СВЕРХЭКСПРЕССИЯ 5-НТ ₇ РЕЦЕПТОРА ВО ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6J.....	80
3.4.1. Поведенческие тесты.....	80
3.4.2. Уровни мРНК и белка.....	81
3.4.3. Уровень и обмен серотонина	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ВЫВОДЫ	95
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	96
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

Введение

Актуальность проблемы. Депрессивные расстройства представляют собой значительную медико-социальную проблему из-за их распространенности в индустриальном обществе, снижения качества жизни и работоспособности, а также повышенного риска сердечной недостаточности и самоубийств у пациентов с депрессией [Vazhenova et al., 2019a]. Изучение патофизиологических процессов, лежащих в основе этого расстройства, привело к укреплению понимания исключительной сложности механизмов депрессии. Несмотря на то, что этиология депрессивных расстройств остается не выясненной, уже более чем 60 лет изучение патогенеза депрессии остается сосредоточено на серотониновой системе [Dell’Osso et al., 2016].

Серотониновая система мозга (5-НТ, 5-гидрокситриптами́н), как известно, задействована в регуляции большого разнообразия физиологических процессов и форм поведения. Полифункциональность этой системы связана с существованием большого многообразия серотониновых рецепторов – на сегодняшний день у млекопитающих выделяют 14 подтипов [Pytliak et al., 2011]. Показаны достоверные различия в физиологических эффектах серотониновых рецепторов. Особое внимание нейробиологов привлекает рецептор 5-НТ_{1A}, поскольку он играет решающую роль в регуляции функционирования 5-НТ системы мозга. Рецепторы 5-НТ_{1A} подтипа играют большую роль в модулировании эффектов серотонина на настроение и поведение, а также он участвует в механизмах, лежащих в основе депрессии и действия антидепрессантов [Donaldson et al., 2014; Pirova et al., 2020].

В последнее время внимание ученых также стало концентрироваться на 5-НТ₇ рецепторах. Объясняется это тем, что для них была показана способность формировать гетеродимерные комплексы с 5-НТ_{1A} рецепторами, проявляющаяся в определенном влиянии на ауторегуляцию функциональной активности 5-НТ системы мозга. Недавнее исследование [Naumenko et al., 2014] позволяют

предположить участие гетеродимеризации рецепторов 5-НТ₇ и 5-НТ_{1A} в развитии депрессии и действии антидепрессантов. Основное скопление 5-НТ_{1A} рецепторов сконцентрировано в области ядер шва среднего мозга, где они снижают спайковую активность нейронов, уменьшая высвобождение серотонина в синаптическую щель. В физиологических условиях количество гетеродимеров в пресинаптических 5-НТ нейронах выше, чем в постсинаптических, что представляет собой механизм, ответственный за интернализацию 5-НТ_{1A} ауторецепторов. Была выдвинута гипотеза, утверждающая, что при депрессии соотношение между гомодимерами и гетеродимерами в пресинаптических 5-НТ нейронах сдвигается в сторону гомодимеров, что ведет к снижению интернализации ауторецепторов 5-НТ_{1A}, вызывая опосредованное этим рецептором ингибирование высвобождения серотонина. [Kondaurova, Vazovkina, Naumenko, 2017; Naumenko et al., 2014]. Было предположено, что искусственное увеличение количества пресинаптических 5-НТ₇ рецепторов в среднем мозге, должно вернуть соотношение между гомодимерами и гетеродимерами в сторону гетеродимеров 5-НТ₇/5-НТ_{1A}, тем самым снизив ингибирующую активность 5-НТ_{1A} рецептора. Такое воздействие, теоретически, может вызвать изменения в поведении даже в физиологических условиях.

С другой стороны, 5-НТ_{1A} рецепторы широко распространены в терминальных областях мозга, где они экспрессируются как постсинаптические гетерорецепторы и оказывают обширное влияние на различные системы мозга. Так, например, активация постсинаптических кортикальных 5-НТ_{1A} рецепторов, находящихся на телах глутаматергических пирамидальных нейронов и/или ГАМК-ергических интернейронов вызывает различные нейрхимические реакции, включая стимуляцию высвобождения дофамина во фронтальной коре [Barnes et al., 2021; Bortolozzi et al., 2010] и антидепрессантный эффект [Vry De et al., 2004]. Гетеродимеризация между 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇ рецепторами в терминальных областях мозга также представляет интерес в связи с описанными выше фактами. При увеличении уровня 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре в физиологических условиях (одна из областей локализации постсинаптических

рецепторов, которая играет большую роль в формировании сложного поведения, побуждения и мотивацию), теоретически, функциональный ответ 5-HT_{1A} рецепторов снизится, что приведет к продепрессивному эффекту.

Изучение последствий гетеродимеризации между 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторами в норме и при развитии патологии (на линии мышей ASC/ICG – генетической модели депрессии) является актуальным для понимания нейробиологических механизмов депрессии и разработки новых, более эффективных методов фармакологического воздействия.

Эксперименты на животных позволяют успешно моделировать некоторые симптомы депрессивных расстройств человека, открывая возможности для использования новейших молекулярно-генетических методов для выяснения механизмов этиопатогенеза депрессии, причин резистентности к существующим антидепрессантам, а также разработки новых методов фармакологического воздействия. Применяемые в настоящее время методы генной инженерии позволяют получить потрясающие результаты в области фундаментальных исследований. Манипулирование экспрессией определенных генов может стать перспективным направлением как для изучения сложных молекулярных механизмов различных патологий, в том числе и депрессии, так и для последующего их лечения. Существуют различные подходы для доставки целевого гена в клетку, однако векторы, основанные на гаммаретровирусах, лентивирусах, аденовирусах, аденоассоциированных вирусах (AAV) и вирусе простого герпеса, являются одними из наиболее широко используемых вирусных векторов в генной терапии [Wang, Guangping Gao, Gao, 2014]. Используемые в данном исследовании AAV обладают рядом преимуществ, таких как непатогенность, низкая иммуногенность и обеспечение длительной экспрессии генов *in vivo*, а также способность трансдуцироваться в неделящихся клетках. Такие вектора являются надежным инструментом для доставки генетического материала в клетку [Lentz, Gray, Samulski, 2012].

Степень разработанности проблемы. К настоящему времени накоплены убедительные доказательства значительного вклада 5-HT₇ рецепторов в контроль

депрессивноподобного поведения. Установлено, что как генетический нокаут 5-НТ₇ рецепторов [Guscott et al., 2005; Hedlund et al., 2005], так и фармакологическая блокада 5-НТ₇ рецепторов оказывают антидепрессивное действие. Важно, что ослабление депрессивноподобного поведения вызывают антагонисты 5-НТ₇ рецепторов химически разных групп, такие как луразидон [Cates et al., 2013; Thomas, Nagan, 2004], вортиоксетин [Long, 2019], SB-258719 [Guscott et al., 2005], амисульпирид [James et al., 2018] и JNJ-18038683 [Bonaventure et al., 2012].

Для 5-НТ₇ рецепторов, как для многих других рецепторов, сопряженных с G-белком, было обнаружено явление олигомеризации. Так, например, образование 5-НТ_{1A}/5-НТ₇ гетеродимера ослабляет функциональную активность 5-НТ_{1A} рецептора, усиливая интенсивность его интернализации, и десенситизирует 5-НТ_{1A} рецептор [Renner et al., 2012]. Особый интерес представляет возможная роль 5-НТ_{1A}/5-НТ₇ гетеродимеров в развитии патофизиологических процессов в ЦНС. Была выдвинута гипотеза [Naumenko et al., 2014], согласно которой феномен димеризации 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇ рецепторов лежит в основе более высокой чувствительности пресинаптических 5-НТ_{1A} рецепторов к продолжительной стимуляции 5-НТ при хроническом применении СИОЗС в сравнении с постсинаптическими 5-НТ_{1A} рецепторами. Образование 5-НТ_{1A}/5-НТ₇ гетеродимерного комплекса может играть существенную роль, как в процессе развития депрессии, так и механизме действия антидепрессантов и, как следствие в развитии нечувствительности к ним.

Несмотря на убедительные свидетельства участия 5-НТ₇ рецепторов в регуляции нормального и патологического поведения, роль взаимодействия этих рецепторов с другими рецепторами в регуляции функции 5-НТ системы мозга и патогенезе нарушений поведения, в том числе депрессивных расстройств, остается не вполне ясной.

Целью настоящей работы является изучение влияния экспериментально повышенной экспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга и фронтальной коре на регуляцию нормального и депрессивно-подобного

поведения, а также на функциональное состояние 5-НТ системы мозга. В рамках цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проверка работоспособности аденоассоциированных вирусных частиц, несущих уже созданную ранее в Лаборатории нейрогеномики поведения плазмиду AAV_Syn_HTR7-EGFP, обеспечивающую сверхэкспрессию 5-НТ₇ рецепторов в нейронах мыши;
2. изучение влияния сверхэкспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга у мышей линии C57Bl/6 на поведение, экспрессию ключевых элементов 5-НТ системы и метаболизм 5-НТ в структурах мозга;
3. исследование влияния сверхэкспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга у мышей линии ASC/Isq (генетической модели депрессии) на поведение, экспрессию ключевых элементов 5-НТ системы и метаболизм 5-НТ в структурах мозга;
4. изучение влияния сверхэкспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре у мышей линии C57Bl/6 на поведение и экспрессию ключевых элементов 5-НТ системы.

Научная новизна. В работе впервые было показано, что основанная на AAV сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге вызывает значительный антидепрессивный эффект у мышей линии ASC/Isq с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению и значительно снижает уровень поведенческого отчаяния у мышей линии C57Bl/6J, а также влияет на функционирование 5-НТ системы мозга у мышей этих линий. Кроме того, впервые показано, что сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора во фронтальной коре вызывает депрессивно-подобное поведение у мышей линии C57Bl/6J.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты данной работы вносят вклад в понимание роли 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇ рецепторов в новом механизме регуляции серотониновой системы мозга, связанном как с увеличением количества 5-НТ₇ рецепторов так и, вероятно, с образованием

гетеродимерных комплексов. В работе исследуется новый экспериментальный механизм, значительно повышающий уровень 5-HT₇ рецепторов в среднем мозге, что гипотетически может повысить уровень обмена серотонина ингибируя пресинаптические 5-HT_{1A} рецепторы. С другой стороны, сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре, вероятно, ингибируя постсинаптические 5-HT_{1A} рецепторы гипотетически может объяснить механизмы формирования депрессивно-подобного поведения у животных. Полученные результаты могут в дальнейшем послужить основой для разработки новых препаратов, мишенью для которых будут являться взаимодействия между рецепторами, а также дополнить программы обучения для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений.

Положения, выносимые на защиту:

Аденоассоциированный генетический конструктор успешно доставляет в клетки и обеспечивает экспрессию плазмиды pAAV_Syn_HTR7-EGFP, кодирующей 5-HT₇ рецептор, меченный флуоресцентным белком EGFP, как в первичной культуре гиппокампальных нейронов *in vitro*, так и в целевых структурах мозга мыши (средний мозг и фронтальная кора) *in vivo* и приводит к сверхэкспрессии белка 5-HT₇-EGFP.

Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в области среднего мозга вызывает значительный антидепрессивный эффект и влияет на функционирование 5-HT системы мозга как у мышей линии C57Bl/6J, так и у мышей линии ASC/лсg с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению.

Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре вызывает депрессивно-подобное поведение и понижение катаболизма серотонина у мышей линии C57Bl/6J без существенных изменений экспрессии ключевых генов серотониновой системы мозга.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов обосновывается достаточным объемом экспериментального материала с большим объемом исследованных выборок с применением современных высокотехнологичных молекулярно-генетических

методов исследования и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки результатов.

Результаты работы вошли в отчет по гранту РНФ 19-15-00025, а также были представлены и обсуждены на: 25-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века — 2022», III международная конференция «Volga Neuroscience Meeting — 2021», VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2021, VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020, 33rd. ECNP Congress 2020, VI Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2019, IBRO Reports. — 2019

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 полнотекстовых статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, а также 7 тезисных работ в сборниках материалов международных конференций.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, а также подготовке публикаций по материалам работы. Все эксперименты по изучению поведения и определению уровней экспрессии генов и белков, а также вся статистическая обработка полученных данных были проведены лично автором. В определении уровня моноаминов помогали к.б.н. Антонов Е.В. и к.б.н. Базовкина Д. В.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, д.б.н. Наumenко В. С. за общее руководство на всех этапах выполнения диссертации, а также сотрудникам лаборатории нейrogenомики поведения ИЦиГ СО РАН, которые помогали в проведении экспериментов и освоении методик: к.б.н. Кондаурова Е. М., к.б.н. Базовкина Д. В., к.б.н. Куликова Е. А., к.б.н. Ильчибаева Т. В., к.б.н. Цыбко А. С.

Структура и объем работы. Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (170 источников). Общий объем работы составляет 113 машинописных листов. Представлено 37 рисунков и 1 таблица.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Серотониновая система в ЦНС

Хотя 5-НТ был открыт более 70 лет назад, изучение серотониновой системы и ее рецепторов продолжает порождать новые биологические открытия, имеющие медицинское значение практически во всех основных системах органов, включая сердечно-сосудистую, легочную, пищеварительную, мочеполовую и нервную системы. 5-НТ и его рецепторы играют важную роль в регуляции практически всех функций мозга, а нарушение регуляции серотонинергической системы вовлечено в патогенез многих психических и неврологических расстройств [Dell'Osso et al., 2016; Deurwaerdère De, Giovanni Di, 2020; Roth, Xia, 2004]. Другие важные достижения включали последующее создание мышей с нокаутами по 5-НТ рецепторам и разработку лекарств, селективных для определенного подтипа рецепторов [Berger, Gray, Roth, 2009].

Изучение серотонина впервые началось в XX веке и развивалось по двум различным направлениям, а именно: связи серотонина с сердечно-сосудистой системой и связи энтераминна с пищеварительной системой. С 1952 года стало известно, что серотонин и энтерамин были идентичны 5-гидрокситриптамину. В 1953 году впервые показано, что серотонин содержится в головном мозге. Много серотонина обнаружили в среднем мозге и гипоталамусе, меньше - в таламусе и гиппокампе. В коре его содержание колеблется, хотя и остается сравнительно невысоким. Распределение 5-НТ является относительно однотипным у всех классов позвоночных по отделам мозга [Попова, Науменко, Колпаков, 1978]. Современная эра серотонина началась в 1957 году, когда Дж. Гаддум и З. Пикарелли представили концепцию М и D рецепторов. Согласно их концепции 5-НТ-индуцированное сокращение подвздошной кишки морской свинки опосредуется двумя различными рецепторами: нейротропным "М" рецептором, расположенным на парасимпатических ганглиях (эффект блокируется морфином и атропином; сейчас известен как 5-НТ₃ рецептор) и мускулотропным "D"

рецептором, расположенным на гладких мышцах (эффект блокируется дибензилином, лизергидом, 2-бромолизергидом и дигидроэрготамином; сейчас известен как 5-HT_{2A} рецептор). [Barnes et al., 2021; Gaddum, Picarelli, 1957].

Серотонин является биогенным моноамином, сходным с адреналином, норэпинефрином, дофамином и гистамином. Его биосинтез проходит два последовательных этапа. На первом этапе незаменимая аминокислота триптофан гидроксилируется до 5-гидрокситриптофана (5-НТР) ферментом триптофангидроксилазой (Рис. 1). Содержание триптофана в мозге довольно велико и распределена эта аминокислота в мозге равномерно. Уровень триптофана в среднем мозге, коре, стриатуме, мозжечке примерно одинаков [Попова, Науменко, Колпаков, 1978]. На втором этапе 5-НТР декарбоксилируется ферментом декарбоксилаза-L-ароматических аминокислот (катализирует также образование дофамина из L-Диоксифенилаланина и триптофана из триптамина) с образованием 5-НТ. Было установлено, что этапы гидроксирования и декарбоксилирования происходят почти мгновенно в присутствии триптофана и несмотря на то, что оба фермента необходимы для превращения триптофана в серотонин, ТТГ-2 считается ферментом, лимитирующим скорость этого процесса [Moses, 2008; Walther et al., 2003]. В состоянии покоя 5-НТ хранится в везикулах пресинаптических нейронов. При стимуляции нейронов 5-НТ высвобождается в качестве нейротрансмиттера в синаптическую щель, обратимо связываясь с постсинаптическим рецептором. Серотонин также может связываться с пресинаптическими ауторецепторами, что является фактором регуляции его синтеза и высвобождения по механизму отрицательной обратной связи. Обычно серотонин возвращается в пресинаптический нейрон с помощью мембранного 5-НТ транспортера для прекращения его действия, затем повторно упаковывается в везикулы и используется или расщепляется моноаминоксидазой до 5-гидроксииндолуксусной кислоты (Рис. 1).

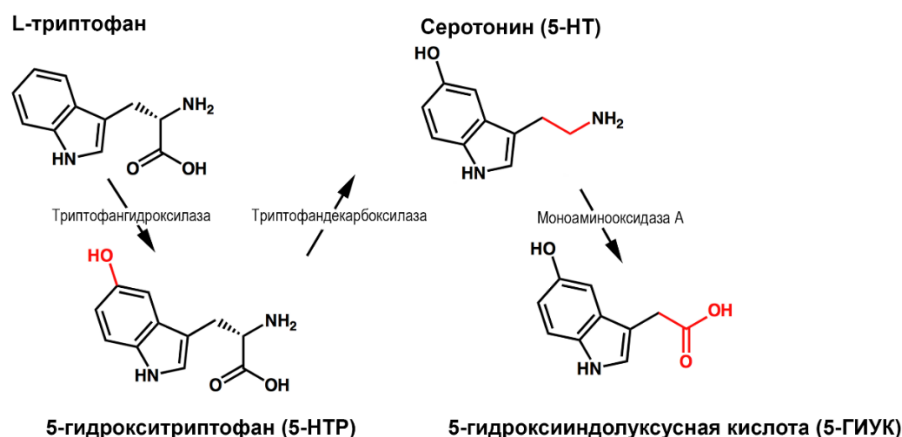


Рисунок 1. Схема синтеза и деградации серотонина.

Серотонин модулирует практически все поведенческие процессы человека. В ЦНС 5-НТ продуцируется нейронами, берущими свое начало в ядрах шва, расположенных по средней линии ствола мозга. Продуцирующие серотонин нейроны образуют самую большую и сложную эфферентную систему мозга. Самые хвостовые ядра шва иннервируют спинной мозг, а ростральные ядра шва – дорсальное ядро шва и медиальное ядро шва иннервируют большую часть остальной части ЦНС, объясняя тот факт, что почти все виды поведения, а также многие другие функции мозга регулируются серотонином [Berger, Gray, Roth, 2009] (Рис 2).

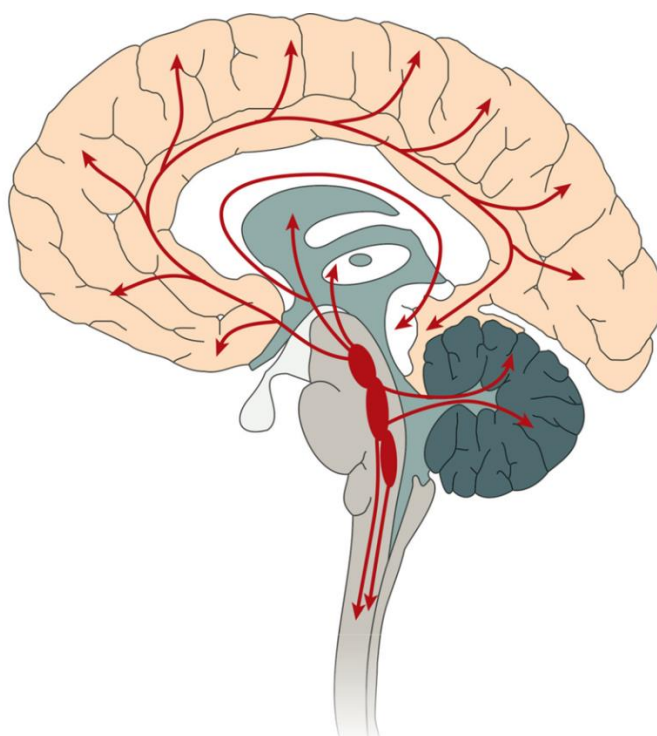


Рисунок 2. Центральные серотонинергические пути [Berger, Gray, Roth, 2009]

1.2. Центральные 5-НТ рецепторы

За последние десятилетия наши знания о рецепторах серотонина претерпели существенные изменения и связано это с внедрением методов радиолигандного связывания, разработке соединений, избирательно воздействующих на субпопуляции рецепторов, и использовании анатомических методов для выявления областей, обогащенных различными подтипами рецепторов. Относительно недавно применение методов молекулярной биологии позволило детально понять белковую структуру некоторых рецепторов серотонина. В XX веке для установления серотонинергических путей и визуализации сайтов связывания 5-НТ рецепторов применяли гистофлуоресценцию, автордиографию и иммуногистохимию, возможности которых в наше время значительно возросли, а развитие и использование современных методов позволяет все дальше углубляться в изучение 5-НТ системы мозга. [³H]ЛСД и [³H]5-НТ были первыми введенными серотонинергическими лигандами. После открытия серотонинергического компонента нескольких нейролептиков, было обнаружено, что [³H]спиперон также оказался лигандом для серотониновых рецепторов. Оригинальная работа Стива Перотка и Соломона Снайдера позволила определить рецепторы 5-НТ₁ и 5-НТ₂ типа и использовать [³H]5-НТ, [³H]ЛСД и [³H]спиперон для селективной маркировки этих рецепторов. С тех пор было открыто много других лигандов для более или менее селективной маркировки различных подтипов 5-НТ рецепторов [Palacios et al., 1990]. За последние 30 лет было идентифицировано семь различных семейств 5-НТ-рецепторов, и для некоторых из них были описаны различные субпопуляции [Pytliak et al., 2011].

Рецепторы серотонина распространены во всей нервной системе и на периферии и остаются одними из самых перспективных и многообещающих мишеней для разработки новых препаратов для лечения различных заболеваний, от мигрени до нервно-психических расстройств, таких как шизофрения и депрессия. В течение последних трех десятилетий были клонированы по крайней мере 14 подтипов рецепторов 5-НТ, из которых 13 являются рецепторами,

сопряженными с G-белком (GPCR; рецептор, сопряженный с G-белком; семиспиральный трансмембранный рецептор), которые являются мишенями примерно для 40% одобренных лекарственных средств, и 1 (5-HT₃ рецептор) является цис-петлевым управляемым лигандом ионным каналом, что функционально и структурно отличает его от других серотониновых рецепторов (Рис. 3). Современные кристаллографические и биохимические методики предоставили общее понимание базовой структуры и функционального механизма активации сопряженного с G-белком рецептора, а также информацию о базовой структуре и функциональном механизме активации сопряженного с G-белком рецептора. До 2022 года существовало только две кристаллические структуры рецептора для семейства серотонина, рецепторов 5-HT_{1B} и 5-HT_{2B} подтипов [15]. В 2022 году вышла статья с описанием кристаллических структур сразу трех серотониновых рецепторов вместе с их G-белками: 5-HT₄, 5-HT₆ и 5-HT₇ [Huang et al., 2022]. Полученные кристаллические структуры серотониновых рецепторов не только предоставляют довольно сложные данные по топографии рецепторов 5-HT, но также обеспечивают механистические объяснения функциональной селективности. Важно отметить, что ранее также были представлены данные о предсказанной структуре белка других 5-HT рецепторов, полученные с помощью нейронной сети *AlphaFold*, включающей в себя физические и биологические знания о структуре белка и алгоритмов глубокого обучения [Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022].

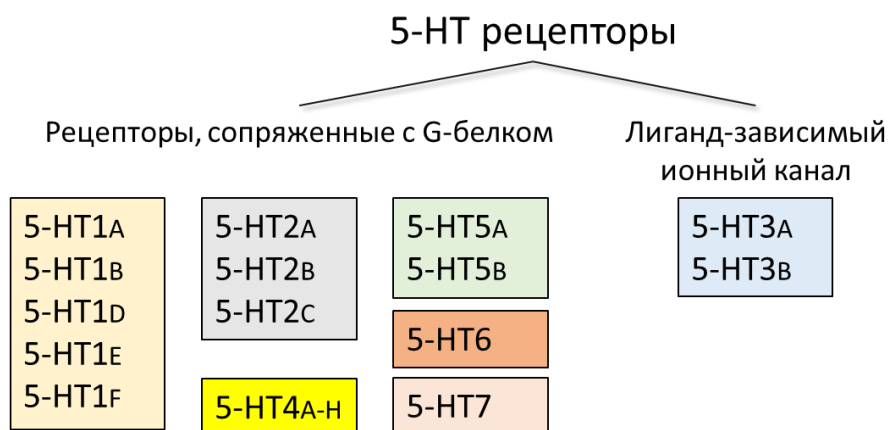


Рисунок 3. Современная классификация 5-HT рецепторов.

Из исследований распределения в головном мозге центральных серотониновых рецепторов, ясно, что каждый подтип 5-НТ рецептора имеет уникальный паттерн распределения в головном мозге и он часто перекрывается с паттернами других подтипов серотониновых рецепторов. Наличие таких паттернов распределения является четким доказательством того, что различные подтипы рецепторов 5-НТ связаны с различными функциями ЦНС, поддающимися манипуляции с использованием селективных фармакологических агентов для рецепторов серотонина. [Baganz, Blakely, 2013; Mengod et al., 2006; Sharp, Barnes, 2020]. Отдельные нейроны могут экспрессировать несколько рецепторов серотонина. Данные исследований гибридизации *in situ* подтверждают идею о том, что один постсинаптический нейрон может экспрессировать ограниченную комбинацию из, возможно, 2-3 различных подтипов рецепторов 5-НТ [Mengod et al., 2010]. Кроме того, анализ содержания мРНК серотониновых рецепторов в нейронах ядра ложа конечной полоски (BNST, bed nucleus of the stria terminalis) показал, что отдельные нейроны могут быть подразделены в соответствии с выраженной экспрессией 2-3 различных транскриптов 5-НТ рецепторов в преимущественно ингибирующих/возбуждающих комбинациях (например рецепторы 5-НТ_{1A}/5-НТ₇, 5-НТ_{1B}/5-НТ₄, 5-НТ_{1B}/5-НТ_{2A} и 5-НТ_{1A}/5-НТ_{2A} [Nazra et al., 2012]), а пирамидальные нейроны V слоя коры экспрессируют рецепторы 5-НТ_{1A} и 5-НТ_{2A}, которые оказывают противоположное влияние на активацию пирамидальных нейронов [Sharp, Barnes, 2020]. Таким образом, 5-НТ нейроны ЦНС идеально подходят для модуляции активности широкого спектра функций, что частично объясняет плеiotропные эффекты серотонина в ЦНС [Berger, Gray, Roth, 2009].

В настоящее время изучение функций серотониновой системы связано с формированием четкого понимания молекулярно-биологических механизмов действия серотонина в организме, а также с пониманием механизмов, лежащих в основе взаимодействия серотониновых рецепторов друг с другом, таких, как формирование гомо- и гетеродимерных рецепторных комплексов,

трансактивация, взаимная регуляция, и ведущих к формированию определенных функциональных ответов.

Многие коллективы исследователей по всему миру заняты исследованием функций различных типов и подтипов 5-НТ рецепторов, что объясняется широким диапазоном функций, контролируемых 5-НТ системой мозга. Среди всех известных 5-НТ рецепторов особое внимание нейробиологов привлекает рецептор 5-НТ_{1A}, поскольку он играет решающую роль в регуляции функционирования 5-НТ системы мозга. Рецепторы 5-НТ_{1A} подтипа играют большую роль в модулировании эффектов серотонина на настроение и поведение и участвуют в механизмах, лежащих в основе депрессии и действия антидепрессантов [Andrews et al., 2015; Nikiforuk, 2015; Peroutka, 1998; Pytliak et al., 2011]. Помимо этого, внимание привлекают 5-НТ₇ рецепторы из-за обнаруженной способности формировать гетеродимерные комплексы с 5-НТ_{1A} рецепторами, что определенным образом влияет на ауторегуляцию функциональной активности 5-НТ системы мозга [Renner et al., 2012].

1.3. 5-НТ_{1A} рецепторы

1.3.1. Характеристика 5-НТ_{1A} рецепторов

Рецептор 5-НТ_{1A} является наиболее широко распространенным из всех рецепторов серотонина и наиболее изученным. В ЦНС 5-НТ_{1A} рецепторы присутствуют в высокой плотности в гиппокампе, перегородке, миндалине и ядрах шва, коре головного мозга, где они опосредуют действие серотонина на страх, тревожность, стресс, депрессивное поведение, когнитивные функции [Albert, Vahid-Ansari, 2019] и прием пищи [Naumenko, Ponimaskin, Popova, 2016]. Кроме того небольших количествах они были найдены также в базальных ганглиях и таламусе [Mestikawy et al., 1991; Pytliak et al., 2011].

5-НТ_{1A} рецептор человека состоит из 422 аминокислотных остатков и имеет структуру, типичную для семиспиральных белков, а его третья внутриклеточная петля и С-конец обеспечивают связывание с G_{i/o}-белком, который при активации рецептора ингибирует аденилатциклазу и приводит к снижению уровня цАМФ и

активности протеинкиназы A [Polter, Li, 2010; Popova, Naumenko, 2013; Zifa, Fillion, 1992].

Рецепторы 5-HT_{1A} разделяются на ауто- и гетерорецепторы. Ауторецепторы располагаются пресинаптически на дендритах и теле 5-НТ нейронов в ядрах шва, а гетерорецепторы являются постсинаптическими и локализуются на дендритах и теле клетки целевых нейронов, не относящихся к серотониновым (Рис. 4) [Barnes et al., 2021].

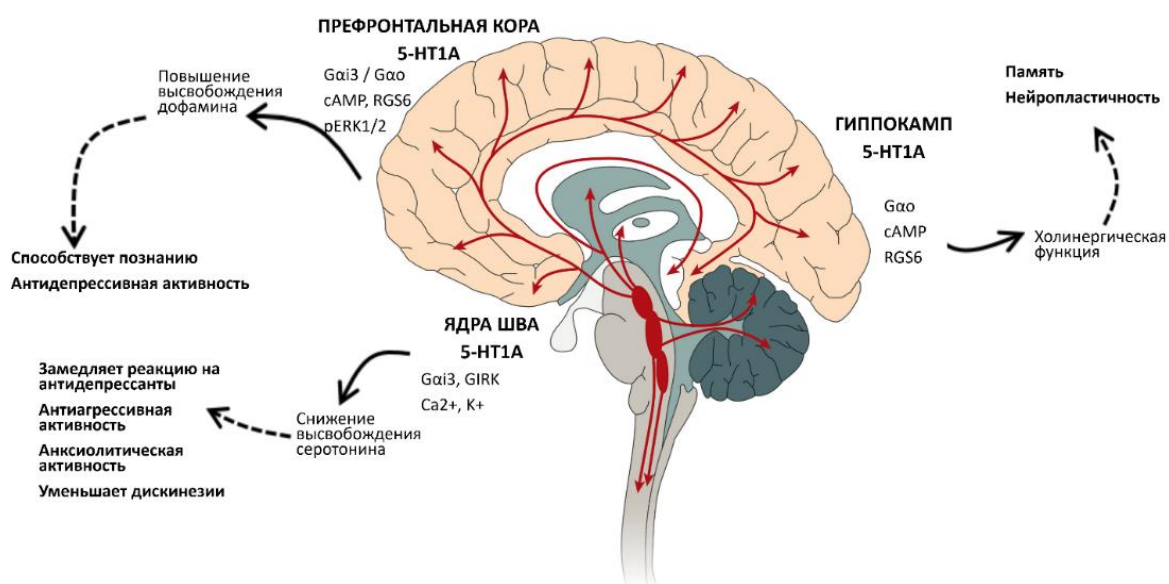


Рисунок 4. Отдельные субпопуляции 5-HT_{1A} рецепторов опосредуют определенные реакции и могут представлять собой самостоятельные терапевтические мишени. Адаптировано из [Barnes et al., 2021]

Функциональные особенности 5-HT_{1A}-рецепторов были подробно изучены. Общим выводом этих исследований является тот факт, что субпопуляции 5-HT_{1A} рецепторов, экспрессированные в различных областях мозга, демонстрируют специфические паттерны рецепторной сигнализации, оказывая различное влияние на центральные функции [Albert, Vahid-Ansari, 2019]. Эти разнообразные свойства указывают на то, что отдельные субпопуляции 5-HT_{1A} рецепторов опосредуют определенные реакции и могут представлять собой самостоятельные терапевтические мишени. Так, например 5-HT_{1A} ауторецепторы подавляют 5-НТ систему мозга – серотонин, высвобождаемый в ядрах шва, активирует

ауторецепторы 5-НТ_{1А}, которые ингибируют возбуждение 5-НТ нейронов и количество серотонина в синаптической щели снижается [Courtney, Ford, 2016; Popova, Naumenko, 2013].

1.3.2. Канонические сигнальные пути 5-НТ_{1А} рецепторов

В серотониновых нейронах мозга выявлены многочисленные сигнальные пути 5-НТ_{1А} рецептора (ауторецептора). После связывания с серотонином 5-НТ_{1А} рецептор запускает трансдукцию G-белков, в основном через субъединицы G_{αi/αo}, которая соединяется с аденилатциклазой и ингибирует ее, что приводит к снижению активности цАМФ и протеинкиназы А [Albert, Lemonde, 2004; Albert, Vahid-Ansari, 2019].

1.3.3. Неканонические сигнальные пути 5-НТ_{1А} рецепторов

Установлено, что в отличие от канонического Gi/Go-опосредованного ингибирования цАМФ, 5-НТ_{1А} рецепторы, могут конститутивно активировать аденилатциклазу в определенных условиях. В частности, при совместной экспрессии с аденилатциклазой II типа (АСII) в клетках НЕК293 5-НТ_{1А} рецепторы стимулировали цАМФ через субъединицы G_{βγ} [Albert et al., 1999]. Однако, несмотря на хорошо известное связывание рецепторов 5-НТ_{1А} с G_{αi/αo}- и G_{βγ}, это не единственные сигнальные механизмы, опосредующие нейрональную активность и различные виды поведения, регулируемые 5-НТ_{1А}-рецепторами. Помимо этого все чаще обсуждаются сигнальные пути, традиционно связанные с рецепторами факторов роста, за их связь с 5-НТ_{1А} рецепторами [Polter, Li, 2010].

Известна связь сигнальных путей 5-НТ_{1А} рецептора с сигнальными путями митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) (Рис. 5), которые играют роль в росте и выживании клеток и являются критическими регуляторами развития и пластичности ЦНС. Фосфорилирование белков с помощью ERK приводит к активации рецепторов и ионных каналов, экспрессии генов и нейропластичности [Sweatt, 2004], приводя к изменениям в поведении. Одним из примеров может являться активация транскрипции CREB, фактора транскрипции, который может иметь значение в опосредовании стресса, тревожности и депрессивного состояния

[Blendy, 2006; Polter, Li, 2010]. Его активация сигнальным путем ERK может свидетельствовать о важном влиянии ERK на поведение.

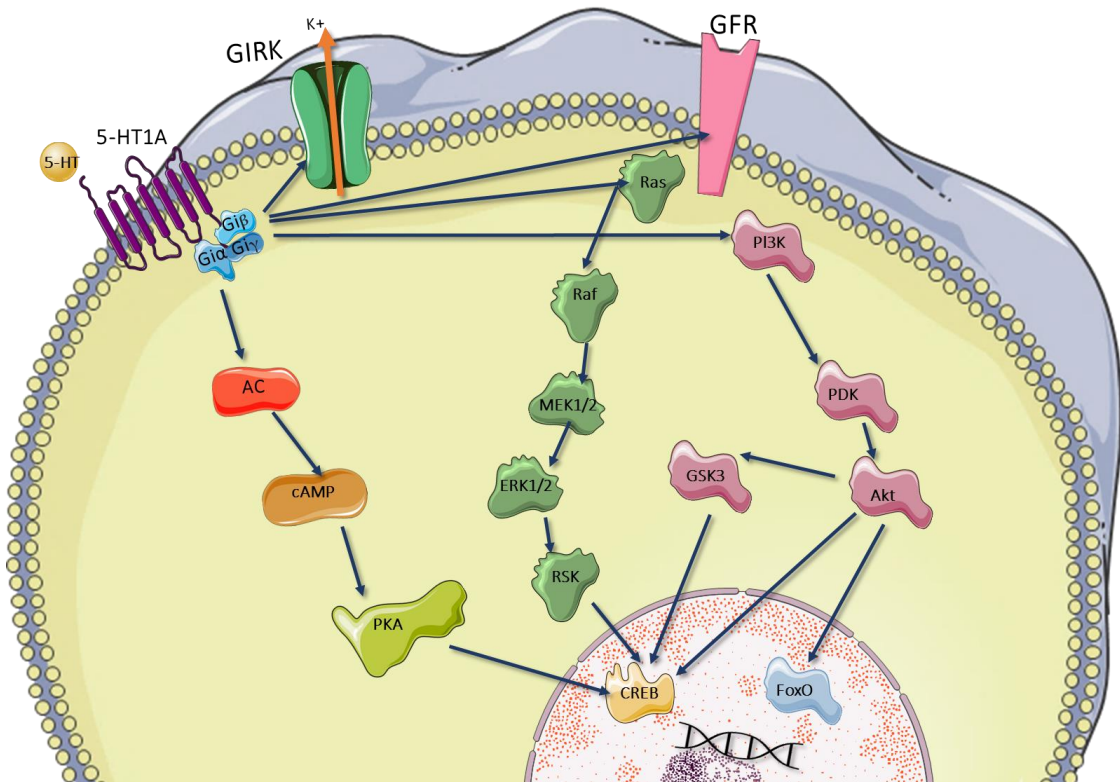


Рисунок 5. Пути передачи сигнала, регулируемые рецептором 5-НТ_{1А}. 5-НТ, серотонин; 5-НТ_{1А}, рецепторы серотонина 1А; Gi, ингибирующий белок; АС, аденилатциклаза; сАМР, циклический аденозинмонофосфат; GIRK, G-белок, связанный с калиевым каналом внутреннего выпрямления; GFR, рецептор фактора роста; PKA, протеинкиназа А; MEK1/2, MAP и ERK киназа 1/2; ERK 1/2, киназа 1/2, регулируемая внеклеточными сигналами; RSK, рибосомная киназа S6; PI3K, фосфотидилинозитол-3 киназа; PDK, фосфоинозитид-зависимая киназа; GSK3, киназа-3 гликогенсинтазы; FoxO, фактор транскрипции Forkhead boxO. Адаптировано из [Polter, Li, 2010].

Другой путь передачи сигналов, регулируемый фактором роста, путь PI3K и Akt, также может регулироваться рецепторами 5-НТ_{1А} (Рис. 5). Akt является хорошо известным регулятором выживаемости клеток, поскольку активация Akt факторами роста опосредует стимулированные инсулином реакции роста и способствует выживанию клеток при воздействии апоптотических стимулов. В головном мозге Akt все чаще признается в качестве решающего посредника в действиях нейротрофинов и нейротрансмиттеров [Polter, Li, 2010; Beaulieu, Gainetdinov, Caron, 2009; Sale, Sale, 2008]. Кроме того, потенциальной мишенью при некоторых психических расстройствах является GSK3, который

фосфорилируется и инактивируется Akt. Ингибирование GSK3 имитирует эффекты антидепрессантов, а нарушение регуляции может приводить к состояниям, схожим с проявлениями мании и депрессии [Polter, Li, 2010]. Еще одной мишенью активного Akt является фактор транскрипции Forkhead box O (FoxO), который фосфорилируется и инактивируется, экспортируясь из ядра. Известно, что мыши с дефицитом FoxO проявляют антидепрессивные и анксиолитические фенотипы поведения [Polter et al., 2009].

Сигнальные пути 5-HT_{1A} рецептора, связанные с G_{i/o}-опосредованным сигнальным путем, как и с MAPK и Akt, могут по-разному опосредовать его физиологические и поведенческие функции, а нахождение новых путей инактивации аномальной активности 5-HT_{1A} рецепторов может помочь в коррекции патологических состояний.

1.3.4. Механизмы десенситизации 5-HT_{1A} рецепторов

Известно четыре главных механизма десенситизации 5-HT_{1A} рецептора [Albert, Lemonde, 2004; Popova, Naumenko, 2013] (Рис. 6):

1. разобщение с Gi-белком, происходящее в течение секунд, включая индуцированное агонистами фосфорилирование, предотвращает передачу сигнала посредством Gi-белка;
2. интернализация рецептора – снижение плотности рецептора на плазматической мембране за счет их перемещения в цитоплазму клетки;
3. подавление/деградация рецептора после интернализации или изменений в его белковой структуре, например, путем обратимого фосфорилирования;
4. генетическая регуляция – изменения в экспрессии гена *Htr1a*, приводящие к изменению плотности рецептора и, следовательно, его функциональной активности.

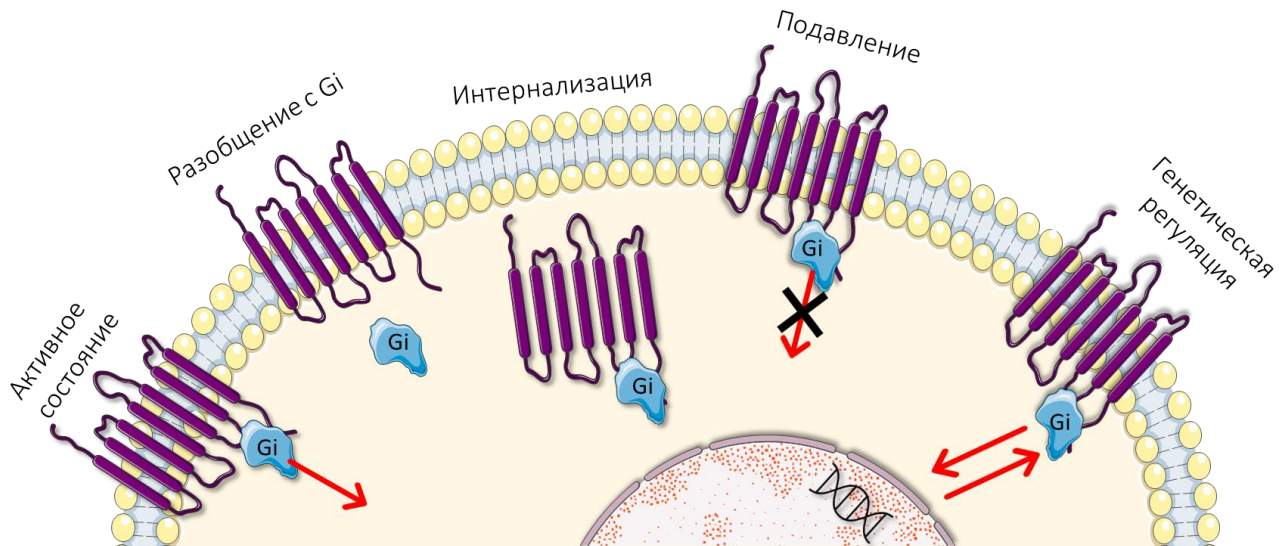


Рисунок 6. Основные пути регуляции функциональной активности 5-НТ_{1А} рецептора. Адаптировано из [Ророва, Naumenko, 2013].

Таким образом естественные механизмы десенситизации 5-НТ_{1А} рецептора могут представлять собой хорошие мишени для коррекции психических патологий.

1.3.5. Влияние 5-НТ_{1А} рецепторов на тревожность, агрессивное и депрессивное поведение

5-НТ_{1А} рецепторы играют важную роль в возникновении тревожности [Akimova, Lanzenberger, Kasper, 2009; Donaldson et al., 2014]. Было показано, что на фенотипическое проявление нормального поведения, тревоги или депрессии могут обуславливать дифференциальные нервные цепи, чувствительные к 5-НТ_{1А} рецептору на уровне фронтальной коры. Баланс между стимуляцией 5-НТ_{1А} рецепторами глутаматергических пирамидальных клеток и ГАМК-ергических интернейронов оказывает влияние на выраженность тревожного поведения [Albert, Vahid-Ansari, Luckhart, 2014]. Исследование мышей с нокаутом по 5-НТ_{1А} рецептору показало, что такие животные проявляют повышенную тревожность во многих экспериментальных условиях [Klemenhagen et al., 2006]. Более того, антагонисты 5-НТ_{1А} (буспирон, гепирон) используются для лечения тревоги и депрессии.

Антагонисты 5-НТ_{1А} рецептора и β -блокатор пиндоллол повышают эффективность селективных ингибиторов обратного захвата серотонина - СИОЗС

в лечении депрессии. Седативное действия 5-НТ_{1A} (частичных) агонистов обеспечивается в основном пресинаптическими соматодендритными 5-НТ_{1A} рецепторами (приводящими к уменьшенному высвобождению 5-НТ в концевых областях), тогда как антидепрессивное действие агонистов 5-НТ_{1A} рецепторов в первую очередь обеспечивается постсинаптическими 5-НТ_{1A} рецепторами [Ророва, Naumenko, 2013]. Нейробиология антидепрессивного действия может выглядеть следующим образом: активация пирамидальных нейронов путем стимуляции 5-НТ_{1A} рецепторов, находящихся на ГАМК-ергических интернейронах, растормаживает «антидепрессивные» пирамидальные нейроны [Albert, Vahid-Ansari, Luckhart, 2014].

Некоторые 5-НТ_{1A} агонисты проявляют антиагрессивное действие, а измерение плотности рецепторов 5-НТ_{1A} в лобной коре жертв-самоубийц показывает, что у жертв ненасильственного самоубийства (проглатывание пестицидов, передозировка наркотиков, отравление газами и удушение) максимальное число сайтов связывания было значительно выше по сравнению с контрольной группой и насильственными суицидами (повешение, прыжки с высоты, использование огнестрельного оружия или дробовика, резание и прокалывание острыми предметами, попадание под поезд или другое транспортное средство) [Pytliak et al., 2011; Ludwig, Dwivedi, 2018]. Повышенное потребление алкоголя также связано со снижением плотности 5-НТ_{1A} рецепторов в определенных областях мозга [Hensler, Ladenheim, Lyons, 2003].

В совокупности вышеизложенные соображения указывают на то, что для фармакотерапии аффективных расстройств остаются перспективными мишенями как соматодендритные, так и постсинаптические 5-НТ_{1A} рецепторы мозга.

1.4. 5-НТ₇ рецепторы

1.4.1. Характеристика 5-НТ₇ рецепторов

Рецептор 5-НТ₇ имеет интересную историю: достаточно давно было известно, что сосудистый рецептор серотонина, вызывающий в основном релаксацию, реагировал на 5-НТ и 5-СТ (5-карбоксамидотриптамин), но он не соответствовал известным типам рецепторов 5-НТ₁ или 5-НТ₂, а также ни одному

из впоследствии клонированных рецепторов; в течение ряда лет он был известен как 5-НТ₁-подобный и оставался неисследованным, поскольку не было доступно никаких конкретных фармакологических средств. Рецептор 5-НТ₇ является одним из самых недавно идентифицированных членов семейства рецепторов 5-НТ. С момента своего первоначального открытия в 1993 году [Bard et al., 1993] он был связан с широким спектром фармакологии как в ЦНС, так и на периферии. Кроме того, нарушение регуляции передачи сигналов 5-НТ₇ связано с многочисленными заболеваниями и расстройствами. В конце концов, рецептор 5-НТ₇ был клонирован из кДНК крысы [Lovenberg et al., 1993], мыши [Plassat, Amlaiky, Hen, 1993], свиньи [Bhalla, Saxena, Sharma, 2002] и человека [Blattner et al., 2019].

Ген 5-НТ₇ рецептора *Htr7* расположен на хромосоме человека 10q23.3-q24.3, содержит открытую рамку считывания из 1335 пар оснований и кодирует белок из 445 аминокислот размером приблизительно 50 кДа с 39% - 53% гомологией с человеческими 5-НТ₁, 5-НТ₂, 5-НТ₅ и 5-НТ₆ рецепторами [Bard et al., 1993]. кДНК 5-НТ₇ рецептора мыши имеет одну длинную открытую рамку считывания на 448 аминокислот. Гомология с другими 5-НТ рецепторами низкая, наилучший результат у рецептора 5-НТ_{dro1} (42%), следующая ближайшая гомология - с рецепторами 5-НТ_{1B}, 5-НТ_{1D} и 5-НТ_{1e} [Plassat, Amlaiky, Hen, 1993]. 5-НТ₇ рецептор принадлежит к семейству рецепторов связанных с G-белком и структурно представляет из себя семиспиральный трансмембранный домен [Blattner et al., 2019]. *Htr7* ген содержит три интрона, и хотя не было показано альтернативного сплайсинга для первого интрона, локализованного на последовательности, кодирующей вторую внутриклеточную петлю рецептора, роль в альтернативном сплайсинге играет второй интрон, расположенный на последовательности, кодирующей С-концевой участок рецептора [Heidmann et al., 1998].

На сегодняшний день известно о трех функциональных человеческих изоформах 5-НТ₇ рецептора: 5-НТ_{7A}, 5-НТ_{7B} и 5-НТ_{7D}. Тем не менее не сообщалось о существенных фармакологических различиях с точки зрения активации аденилатциклазы или связывания с лигандами [Heidmann et al., 1998]. Различия в изоформах включают вариабельность уровня экспрессии, различие в

длине С-конца, различный характер индуцированной агонистом интернализации для 5-HT_{7D} по сравнению с двумя другими. Ни одна из этих особенностей не влияет на домен связывания лиганда, и поэтому три изоформы рассматриваются как взаимозаменяемые [Guthrie et al., 2005]. Молекулярное моделирование и сайт-направленный мутагенез позволили определить ключевые участки связывания лиганда и активации рецептора [Rita Impellizzeri et al., 2015], а полученная кристаллическая структура 5-HT₇ рецептора предоставила точные топографические данные о его сайтах связывания с различными функциональными молекулами [Huang et al., 2022].

1.4.2. Канонические сигнальные пути 5-HT₇ рецепторов.

Канонический сигнальный путь рецептора 5-HT₇ связан с активацией G_s-белка, повышающего активность аденилатциклазы, что приводит к продукции цАМФ, который активирует протеинкиназу А, вызывая фосфорилирование различных белков-мишеней. Изменения в состоянии фосфорилирования белков-мишеней приводит к активации множества нижестоящих сигнальных каскадов, например, Ras-зависимую и Rap1-независимую активацию нейропротективных сигнально-регулируемых киназ (ERK) и путей Akt, что в итоге может оказывать влияние на эффекторные молекулы, регулирующие клеточную подвижность и формирование цитоскелета [Blattner et al., 2019; Choi, Helfman, 2014; Guseva, Wirth, Ponimaskin, 2014] (Рис. 7).

1.4.3. Неканонические сигнальные пути 5-HT₇ рецепторов

Было показано, что 5-HT₇ рецепторы связываются не только с G_s-белком, но и с G₁₂-белком (Рис. 7). G₁₂-белки активируют несколько сигнальных путей, и их важные нижестоящие эффекторы являются членами семейства малых Rho ГТФаз (Rho, Rac и Cdc42), которые также могут модулироваться G₁₂-белок-зависимым фактором обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) [Blattner et al., 2019]. Помимо этого, G₁₂-белки способны активировать дополнительные нижележащие каскады, связанные с регулятором передачи сигналов G-белков (RGS), белками семейства эзрин-радиксин-моэзин (ERM), нерецепторными тирозинкиназами

(nRTK), протеинфосфатазами, белками, связывающими А-киназу (АКАР), белками плотных соединений и белками теплового шока (Hsp90).

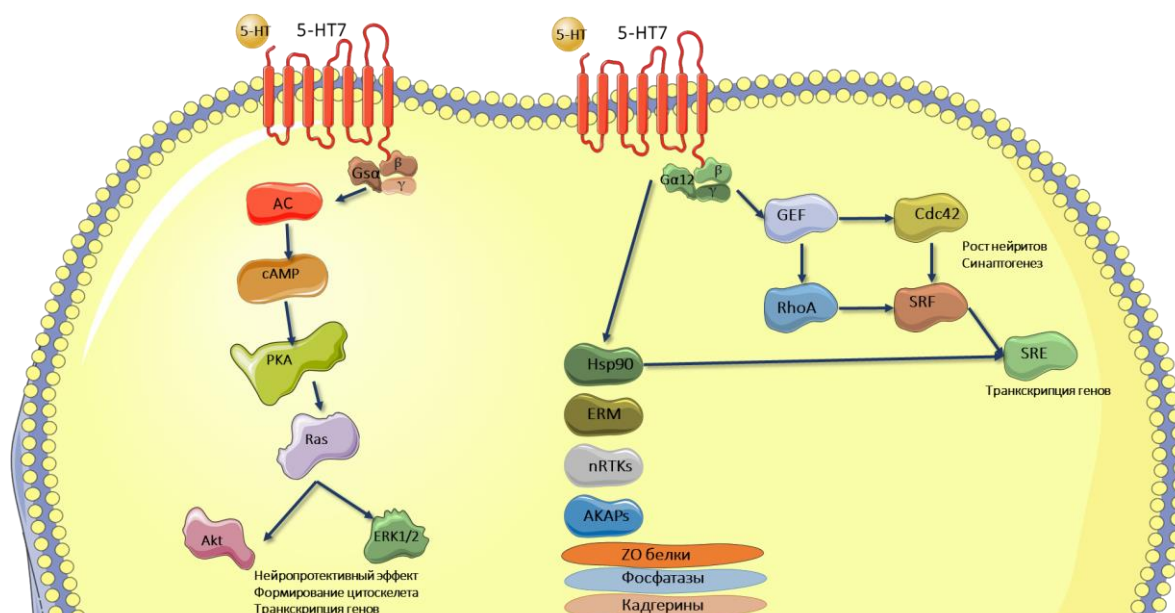


Рисунок 7. Схематическое изображение сигнальных путей, регулируемых 5-НТ₇ рецептором. Эффекты, опосредованные G_s-белком, представлены в левой части. Сводная информация о процессах передачи сигналов, опосредованных G₁₂-белком, представлена в правой части. Сокращения: АС - аденилатциклаза; сАМР - циклический аденозинмонофосфат; РКА - протеинкиназа А; ERK - киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; Akt - протеинкиназа В, Hsp90 - белок теплового шока 90; ERM - белки семейства эзрин-радиксин-моэзин; GEF - фактор обмена гуаниновых нуклеотидов; nRTK - нерцепторные тирозинкиназы; AKAPs - белки, заякоривающие А-киназу; ZO - белки плотных соединений; SRF - сывороточный фактор ответа; SRE - элемент ответа сыворотки. Адаптировано из [Guseva, Wirth, Ponimaskin, 2014] с изменениями.

Субъединица G_{α12} может также взаимодействовать с С-концевыми частями кадгеринов, что приводит к высвобождению β-катенина в цитоплазму и ядро, тем самым запуская транскрипцию генов. 5-НТ₇/G₁₂ активация является частью молекулярного каскада необходимого для роста новых синапсов, образования нейронных сетей, модулирования структурной и функциональной пластичности [Kobe et al., 2012; Speranza et al., 2017; Guseva, Wirth, Ponimaskin, 2014].

1.4.4. Механизмы регуляции 5-НТ₇ рецепторов

Рецептор 5-НТ₇ подвергается N-гликозилированию и пальмитоилированию. Рецептор N-гликозилирован на аспарагиновых участках N5 и N66, но это не влияет на связывание с агонистами. Более того, иммуноцитохимические исследования показали присутствие таких мутантов N-гликозилирования на

поверхности клеток [Gellynck et al., 2012]. Мутационный анализ показал, что цистеины, расположенные в С-концевом домене рецептора в положениях 404, 438 и 441, представляют собой основные потенциальные сайты пальмитоилирования. Мутанты с дефицитом пальмитоилирования показывают, что запускаемая агонистом активация белков G_s и G_{12} не затрагивается. Напротив, мутация Cys404 отдельно или в комбинации с Cys438/Cys441 увеличивает G_s -опосредованную конститутивную активность рецептора 5-НТ₇ (независимую от агонистов), в то время как активация белка G_{12} не изменяется. Таким образом, пальмитоилирование рецепторов 5-НТ₇ может быть прямо вовлечено в изомеризацию рецептора из неактивной в активную форму в отсутствие агонистов. Учитывая, что рецептор 5-НТ₇ связан как с белками G_s и G_{12} , динамическое пальмитоилирование может представлять собой молекулярный механизм, ответственный за селективную G_s - или G_{12} -опосредованную сигнализацию.

1.4.5. Физиологические функции, опосредуемые 5-НТ₇ рецепторами

Анатомически 5-НТ₇ рецептор с высокой плотностью находится в таламической и гипоталамической областях, дорсальном ядре шва, амигдале и ядрах перегородки. Низкие, но детектируемые уровни были также обнаружены в гиппокампе и коре головного мозга [Leopoldo et al., 2011; Thomas et al., 2002]. Авторадиографические данные выявили высокую плотность сайтов в медиальных ядрах таламуса и связанных с ними лимбических и кортикальных областях с более низкими уровнями в ядрах сенсорных реле, черной субстанции, гипоталамусе и дорсальных ядрах шва. На основании его распределения в ЦНС предполагается, что этот рецептор играет роль в регуляции сна и настроения, циркадной ритмической активности, терморегуляции, обучении и памяти [Lovenberg et al., 1993; Naumenko et al., 2014].

Первоначально отсутствие селективных агонистов и антагонистов рецептора 5-НТ₇ замедляло выяснение физиологической и патофизиологической роли рецептора, особенно из-за высокой гомологии в трансмембранных доменах 5-НТ₇ и 5-НТ_{1A} рецепторов. Более того, эти два рецептора локализованы в одних и

тех же областях ЦНС, а на клеточном уровне они могут иметь противоположные эффекты: рецептор 5-HT₇ положительно связан с аденилатциклазой, тогда как рецептор 5-HT_{1A} – отрицательно [Barnes et al., 2021].

Одной из первых физиологических функций, приписываемых 5-HT₇ рецепторам, была регуляция циркадного ритма, также известного как внутренние часы млекопитающих. Внутренние часы контролируют баланс сонливости и бодрствования в течение 24 часов и могут зависеть от внешних стимулов, таких как свет или фармакологические вещества [Rusak, Zucker, 1979].

5-HT₇ рецептор, по-видимому, играет роль в терморегуляции [Naumenko, Kondaurova, Popova, 2011], на что указывают эффекты, вызываемые селективными агонистами и антагонистами, и изменения температуры тела у мышей с нокаутом гена этого рецептора [Hannon, Noyer, 2008].

Была показана роль участия 5-HT₇ рецептора в механизмах депрессивных и тревожных расстройств, а недавние исследования фокусируются на том, что 5-HT₇ рецептор может быть очень актуальной мишенью для лечения депрессивных расстройств [Gellynck et al., 2013; Naumenko et al., 2014]. Сообщается, что селективный агонист 5-HT₇ рецептора LP-211 проявляет анксиолитические свойства [Adriani et al., 2012; Canese et al., 2015].

Как и в случае с тревогой, стресс вовлечен в развитие расстройств, связанных с депрессией. Принимая во внимание роль 5-HT₇ в симптомах депрессии, неудивительно, что данные свидетельствуют о влиянии на реакции и расстройства, связанные со стрессом, причем было показано, что блокада 5-HT₇ ослабляет различные явления, вызванные стрессом. Известно также, что стресс вызывает анальгезию, которую можно определить, как опиоидный (реализация механизмов стресса эндогенной опиоидной системой) или неопиоидный тип (реализация механизмов стресса симпатoadреналовой и/или гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой). Как показали тесты «отдергивание хвоста» и «горячая пластина», SB-269970 (высокоселективный антагонист 5-HT₇ рецепторов) блокировал анальгезию, вызванную как опиоидным, так и неопиоидным стрессом, что может свидетельствовать об участии 5-HT₇

физиологических реакциях, вызванных стрессовыми ситуациями [Blattner et al., 2019].

5-HT₇ рецепторы также могут играть роль в когнитивных функциях, обучении и памяти [Leopoldo et al., 2011], шизофрении [Roth et al., 1994], эпилепсии [Bourson et al., 1997], ощущении боли [Viguier et al., 2013], мигрени [Silberstein, 1994], злоупотребление алкоголем или наркотиками [Hauser et al., 2015], двигательной активности [Leopoldo et al., 2011].

1.4.6. Роль 5-HT₇ рецепторов в формировании рецепторных комплексов

Первоначально предполагалось, что рецепторы, связанные с G-белками, существуют и функционируют как мономерные единицы, которые взаимодействуют с соответствующими G-белками в стехиометрическом соотношении 1:1. Результаты многочисленных биохимических, структурных и функциональных исследований, полученные в течение последнего десятилетия, четко указывают на способность рецепторов, связанных с G-белком, существовать в виде олигомерных комплексов и в настоящее время широко признано, что гомо- и гетеродимеризация может представлять собой дополнительный механизм, регулирующий передачу сигналов и клеточные процессы, опосредованные взаимодействующими рецепторами [Bulenger, Marullo, Bouvier, 2005; Devi, 2001].

Олигомеризация может происходить между идентичными протомерами рецепторов (гомомеризация) или между различными рецепторами, принадлежащими к одному или разным семействам GPCR (гетеромеризация). Гетеромеризация может влиять на сигнальные пути, регулируемые протомерами рецепторов [Naumenko et al., 2014]. Для 5-HT₇ рецепторов была показана возможность формировать гетеродимеры с 5-HT_{1A} рецепторами, изменяя их функциональный ответ [Renner et al., 2012]. С функциональной точки зрения, гетеродимеризация снижает связывание G_i-белка с 5-HT_{1A} рецептором, что ослабляет опосредованную им активацию калиевых каналов, без существенных изменений в связывании 5-HT₇ рецептора с G_s-белком. Ингибирующий эффект

гетеродимеризации на GIRK-токи также проявляется в нейронах гиппокампа мыши, что позволяет предположить физиологическую значимость в естественных условиях [Barnes et al., 2021]. Также было показано, что такая гетеродимеризация способна запускать интернализацию рецептора 5-HT_{1A}, который без связи с 5-HT₇ достаточно устойчив к интернализации. Сразу после интернализации 5-HT_{1A} может активировать независимые от G-белка сигнальные пути, такие как b-аррестин-опосредованное связывание с митоген-активируемой протеинкиназой (МАРК). Поэтому в зависимости от относительного количества 5-HT_{1A} рецепторов, связанных в гетероолигомерные комплексы, серотонин может активировать различные ERK-опосредованные пути [Renner et al., 2012].

Фармакологическая блокада 5-HT₇ рецепторов, но не 5-HT_{1A} рецепторов, отменяет интернализацию как гомо-, так и гетеродимеров 5-HT₇, на основе чего можно сделать предположение, что опосредованная 5-HT₇ рецепторами сигнализация является начальным этапом, ответственным за ко-интернализацию 5-HT_{1A} рецепторов. Этот эффект дополняется тем фактом, что хроническая активация 5-HT₇ рецепторов уменьшает функциональную активность 5-HT_{1A} рецептора [Barnes et al., 2021; Kondaurova, Vazovkina, Naumenko, 2017].

5-HT_{1A} рецепторы, как известно, экспрессируются как пресинаптически (в ядрах шва), так и постсинаптически (кора, гиппокамп и т. п.). Роль ауторецептора 5-HT_{1A} в регуляции пресинаптического высвобождения 5-HT привела к возникновению гипотезы о том, что его избирательная и прогрессирующая десенсibilизация является ключевым элементом, ответственным за терапевтическое действие СИОЗС. Хотя эта гипотеза широко принята, она все же не может объяснить тот факт, что хроническое лечение СИОЗС *in vivo* приводит к преимущественной функциональной десенсibilизации только ауторецепторов 5-HT_{1A}, не затрагивая постсинаптические 5-HT_{1A} [Jolas et al., 1994]. Коллективом лаборатории нейрогеномики поведения было высказано предположение [Naumenko et al., 2014], что повышенное число пресинаптических гетеродимерных комплексов 5-HT_{1A}/5-HT₇ по сравнению с постсинаптическими

объясняет механизм ответственный за различные уровни десенситизации пре- и постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов (Рис. 8). Значение данного явления очень велико: в физиологических условиях количество гетеродимеров в пресинаптических 5-НТ нейронах выше, чем в постсинаптических, что представляет собой механизм, ответственный за интернализацию 5-НТ_{1A} ауторецепторов.

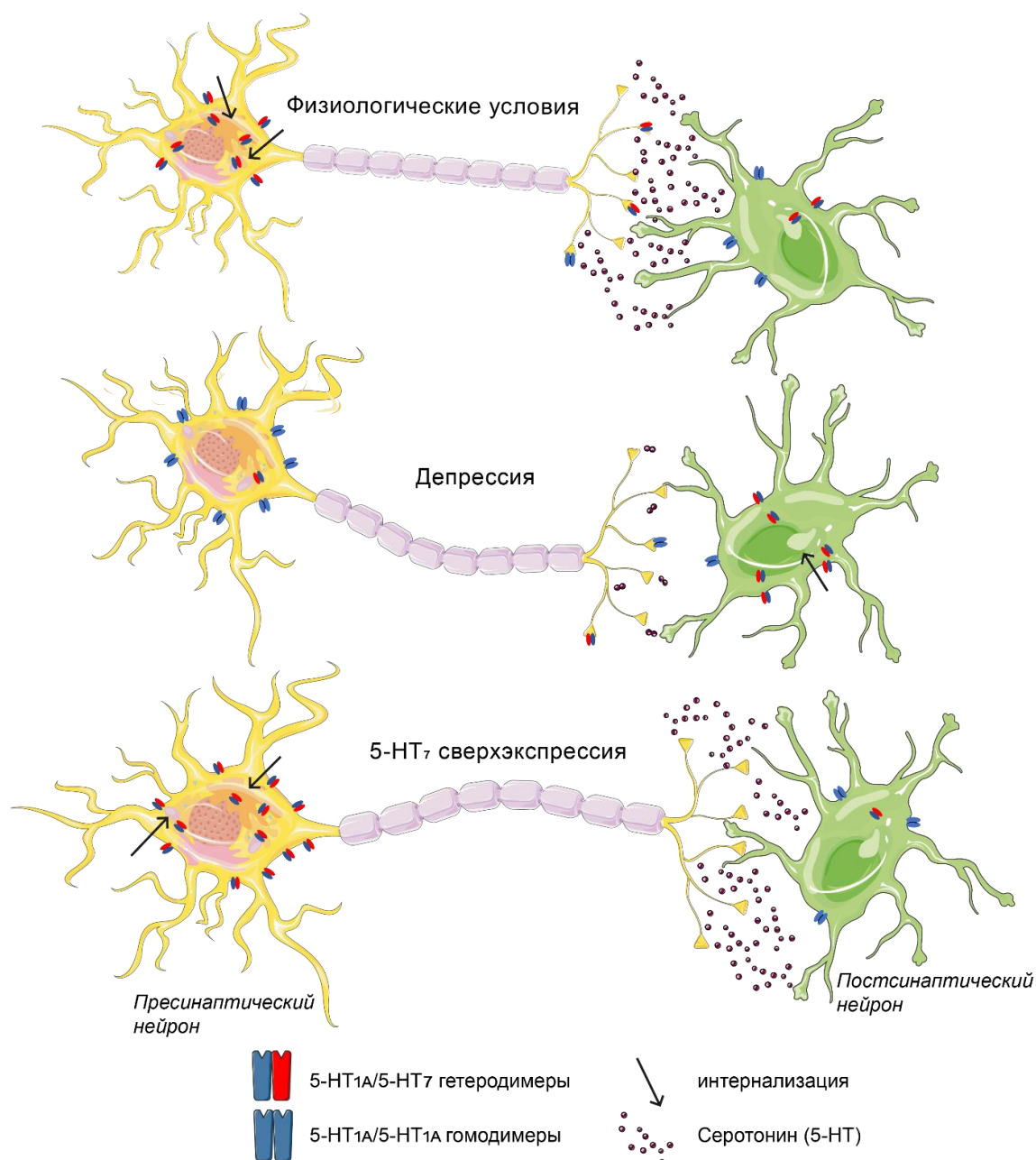


Рисунок 8. Физиологический смысл гетеродимеризации 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇ рецепторов в среднем мозге. Переведено с [Rodnyu et al., 2022].

Было предположено, что при депрессии равновесие между гомодимерами и гетеродимерами в пресинаптических 5-НТ нейронах сдвигается в сторону

гомодимеров, что ведет к снижению интернализации ауторецепторов 5-НТ_{1A}, и в итоге к опосредованному этим рецептором ингибированию высвобождения серотонина [Naumenko et al., 2014]. При искусственном повышении в среднем мозге уровня 5-НТ₇ рецепторов (проводимого в данной работе), теоретически должно повыситься количество гетеродимеров 5-НТ_{1A}/5-НТ₇, которые, ингибируя пресинаптические 5-НТ_{1A} рецепторы, вероятно, приведут к повышению 5-НТ в синаптической щели и, как следствие к антидепрессивному эффекту.

С другой стороны, при искусственном повышении во фронтальной коре уровня 5-НТ₇ рецепторов, постсинаптические 5-НТ_{1A} рецепторы, способствующие высвобождению дофамина и оказывающие антидепрессивное действие, теоретически окажутся связанными в гетеродимерные комплексы 5-НТ_{1A}/5-НТ₇ и интернализированы с потерей своей активности. Это в свою очередь должно привести к формированию у таких животных депрессивно-подобного поведения и дать нам возможность в действии наблюдать молекулярные механизмы, вызванные гетеродимеризацией исследуемых рецепторов. Кроме того, такая модель даст нам некоторые основания предполагать общность последствий гетеродимеризации 5-НТ_{1A}/5-НТ₇ рецепторов как для пресинаптических, так и для постсинаптических 5-НТ_{1A} рецепторов.

1.5. Моделирование депрессии и депрессивно-подобных состояний

1.5.1. Проблема депрессивных расстройств в современном мире

Депрессия — это распространенное и часто тяжелое психическое состояние, характеризующееся сложным синдромом аффективных, вегетативных и когнитивных симптомов, которые имеют рецидивирующее течение в течение месяцев и даже лет [Sharp, Cowen, 2011]. Депрессивный эпизод легкой степени проявляется грустью, ангедонией и чувством бесполезности, в то время как тяжелое состояние классифицируется повторяющимся намерением совершить самоубийство. Клинически при неясной патологии и непостоянном терапевтическом эффекте депрессия считается гетерогенным заболеванием [Нао et al., 2019]. Несмотря на большое разнообразие доступных антидепрессантов и альтернативных методов лечения, включая психотерапию и ряд других подходов,

таких как йога и физические упражнения, имеется огромный пробел в лечении депрессии во всем мире, когда большое количество людей, нуждающихся в помощи, не получают лечения или же оно оказывается неэффективным. Даже если большая депрессия точно диагностирована, и терапия проходит с безупречным соблюдением режима лечения, наилучшие показатели ремиссии при применении стандартных антидепрессантов составляют всего 30-40%. Депрессивные расстройства вызывают заболеваемость во всем возрастном спектре: их может быть трудно диагностировать и лечить в детском и подростковом возрасте, они осложняют лечение пациентов с хроническими заболеваниями и увеличивают общую медицинскую нагрузку у пожилых людей [Krishnan, Nestler, 2011].

Депрессия резко контрастирует с другими хроническими заболеваниями, такими как сахарный диабет, где правильная комбинация лекарств в итоге может обеспечить нормогликемию и предотвратить диабетические осложнения у подавляющего большинства пациентов. Этому несоответствию между лечением депрессии и других хронических инвалидизирующих состояний было предложено несколько объяснений. Во-первых, диагноз депрессивных эпизодов ставится, когда у пациентов наблюдается определенное количество субъективных клинических симптомов (например, подавленное настроение, ангедония, изменения сна, изменения аппетита, чувство вины и т. д.) в течение 2-недельного периода. В отсутствие более объективной диагностики, такой как нейровизуализация, генетические вариации, биомаркеры или биопсии, этот элементарный подход “подсчета симптомов” создает очевидные ограничения для разработки моделей на животных, клинических испытаний и нейропсихологических исследований [Krishnan, Nestler, 2008].

В то время как симптоматическая гетерогенность депрессии (атипичная, меланхолическая, психотическая и т. д.) хорошо известна, информации об этиологических и патофизиологических различиях между этими подтипами все еще недостаточно. Испытания эффективности лекарств редко проводятся в группах, разделенных по подтипу, что увеличивает вероятность отказа от терапии

или ее неэффективности. Поскольку все доступные фармакологические методы лечения депрессии работают путем изменения моноаминергической передачи, возможно, что лечится только один тип депрессии – «чувствительный к моноаминам». Из-за высокой частоты реакции на плацебо и проблем с побочными эффектами препараты, влияющие на обмен моноаминов, по-прежнему составляют значительную долю «новых» антидепрессантов, проходящих клинические испытания. И, наконец, учитывая, что генетические, нейровизуализационные, посмертные анализы и лабораторные исследования (например, маркеры в сыворотке крови или спинномозговой жидкости) дают ограниченное представление о нейробиологии, лежащей в основе депрессии, большинство современных теорий депрессии основаны в основном на моделях заболевания на животных, которые также по своей сути ограничены [Krishnan, Nestler, 2011, 2008].

1.5.2. Моделирование депрессии и депрессивно-подобных состояний

На сегодняшний день моделирование на животных играет важную роль в изучении механизмов депрессии, а учитывая то, что приблизительно 40% случаев депрессии опосредуются наследственными факторами, существует острая проблема и необходимость выбора адекватной модели для изучения конкретных генетических факторов [Flint, Kendler, 2014].

Моделирование психических заболеваний открывает много возможностей в попытке понять условия и стимулы, способные вызывать симптомы психических заболеваний, однако такие заболевания трудно моделировать на животных. Хотя маловероятно, что сложное психическое заболевание человека может быть полностью воспроизведено на животных, именно с помощью животных моделей можно выборочно изучать поведенческие эффекты, вызванные манипуляцией факторами окружающей среды. С помощью такого моделирования мы можем получить ценные данные об этиологических факторах, предлагаемых в теоретических гипотезах об этиологии депрессивных расстройств.

Помимо изучения этиологических факторов заболеваний, также могут использоваться модели животных для изучения развития конкретных форм

поведения. Например, в случае депрессии можно смоделировать такой специфический симптом, как снижение подвижности. Это позволяет изучать определенные условия, препараты и нейробиологические манипуляции, которые могут вызывать снижение двигательной активности [Mann, 1989].

Идеальная животная модель дает возможность понять молекулярные, генетические и эпигенетические факторы, которые могут привести к депрессии. Использование моделей позволяет изучать лежащие в основе заболевания молекулярные изменения и причинно-следственную связь между генетическими изменениями или изменениями окружающей среды и депрессивными состояниями, приводя к лучшему пониманию этиологии и патофизиологии депрессии. Кроме того, требуется совершенствование животных моделей депрессии для определения новых методов терапевтического воздействия [Yan et al., 2010].

Животная модель депрессии человека должна удовлетворять следующим критериям [Anisman, Matheson, 2005; Willner, Mitchell, 2002; Willner, 1986]:

1. сходная патофизиология, поведенческие и метаболические нарушения (внешнее соответствие, *face validity*)
2. сопоставимая этиология – сходные генетические изменения, эпигенетические маркеры, повреждения мозга (концептуальное/структурное соответствие, *construct validity*)
3. сходная терапия и реакция на лечение (прогностическое соответствие, *predictive validity*).

К сожалению, депрессия является гетерогенным расстройством и многие ее основные симптомы (например, подавленное настроение или мысли о самоубийстве) практически невозможно воспроизвести на лабораторных животных. Немногие современные модели депрессивно-подобного поведения полностью соответствуют перечисленным критериям и во многих используемых моделях исследователи полагаются либо на действие известных антидепрессантов, либо на реакцию на стресс. Кроме того, в модели депрессии

животное не обязательно должно проявлять все аномалии и паттерны депрессивно-подобного поведения, связанного с депрессией [Yan et al., 2010].

У животных с депрессивно-подобным поведением существует несколько взаимодействующих молекулярных изменений. Нарушение регуляции некоторых нейромедиаторов, нейротрофических факторов и гормонов может вызвать нейробиологическое нарушение, которое может наблюдаться у пациентов с депрессивными расстройствами, например:

1. моноамины (чрезмерное употребление резерпина может привести к истощению моноаминов и вызвать депрессию у пациентов и депрессивно-подобное поведение у животных) [Belmaker, Agam, 2008];
2. ГАМК – ингибирующий нейромедиатор, снижение которого наблюдалось в вентральном гиппокампе и лобной коре животных с депрессивно-подобным поведением [Grønli et al., 2007];
3. глутамат, который является возбуждающим нейромедиатором (было обнаружено, что уровень глутамата в мозге животных с депрессией повышался в течение 24 ч и снижался в течение следующих четырех недель) [Elizalde et al., 2010];
4. кортикотропин-рилизинг-гормон и аргинин-вазопрессин, которые представляют собой два нейропептида, которые участвуют в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и вносят вклад в развитие депрессии [Holsboer, Ising, 2010];
5. BDNF, низкий уровень которого является решающим параметром в процессе моделирования депрессии у животных [Björkholm, Monteggia, 2016; Martinowich, Manji, Lu, 2007].

Помимо перечисленных выше в депрессии участвует гораздо больше молекул. Однако точные молекулярные механизмы остаются неясными, поэтому для их исследования в лабораторных экспериментах используются различные виды животных моделей депрессии.

Выделяют три общих механизма, которые используются для того, чтобы вызвать изменения в поведении, моделирующие депрессивные расстройства. Для

этого применяются либо манипуляции с нейротрансмиттерными системами биогенных аминов, либо воздействие на животных каким-либо стрессором или вмешательство в систему внутреннего подкрепления. Было также показано, что эти методы не являются взаимоисключающими – воздействия на систему вознаграждения всегда затрагивают катехоламиную систему, как и большинство стрессоров. С теоретической точки зрения особый интерес представляет использование стрессора [Mann, 1989].

В то время как такие симптомы, как чувство вины, склонность к суициду и пониженное настроение, вероятно, являются чисто человеческими чертами, другие аспекты депрессивного синдрома были воспроизведены на лабораторных животных и в нескольких случаях скорректированы с помощью лечения антидепрессантами. К ним относятся показатели ангедонии, поведенческого отчаяния и других нейровегетативных изменений, таких как изменения в режиме сна и аппетита. С эволюционной точки зрения, депрессия была предложена в качестве аналога стратегии непроизвольного поражения (*involuntary defeat strategy, IDS*), которая срабатывает, когда животное проигрывает в иерархической борьбе за ресурсы [Sloman, 2008]. Предполагается, что особенности психомоторной заторможенности, повышенного возбуждения, ангедонии и нарушений сна в условиях проигрыша в такой борьбе имеют адаптивное преимущество. Они служат для защиты проигравших от дальнейших атак и фокусируют когнитивные ресурсы на планировании путей решения сложных социальных проблем [Nesse, 2000]. Большинство, если не все, моделей депрессии на животных направлены на количественный анализ той или иной формы экспериментально вызванного поражения или отчаяния, хотя этот аспект поведения млекопитающих, скорее всего, физиологический (т. е. адаптивный), а не патологический [Krishnan, Nestler, 2011].

Современные модели депрессии на животных должны иметь определенные нарушения функционирования центральной нервной системы, характерные для депрессивных расстройств, которые нормализуются при длительном лечении антидепрессантами [Язуина et al., 2013].

1.5.3. Модели первичной депрессии на животных

Хронический мягкий стресс. Одним из основных симптомов депрессии у людей является ангедония, снижение интереса или удовольствия от повседневной деятельности. Кроме того, хронический мягкий стресс вызывает многие другие симптомы депрессии, такие как снижение сексуального, агрессивного и исследовательского поведения, а также снижение двигательной активности [Chen et al., 2010]. Кроме того, повторное предъявление одного и того же стрессора обычно приводит к адаптации, которая, однако, может быть исключена путем предъявления множества стрессоров в непредсказуемой последовательности. В соответствии с этими характеристиками многие исследователи используют животную модель хронического мягкого стресса для изучения нейробиологии депрессии, а также для выяснения новых терапевтических целей для лечения [Abelaira, Reúus, Quevedo, 2013].

Первая парадигма модель хронического мягкого стресса была введена еще в 1981 году [Katz, 1981]. Эта модель обеспечивает основу для большинства используемых в настоящее время парадигм. Первоначальные протоколы включали 3 недели воздействия электрическим током, погружение в холодную воду, иммобилизацию, изменение цикла свет/ темнота и множество других стрессоров. Эта серия стрессоров может вызвать повышение уровня кортикостероидов в плазме крови и снижение предпочтения сахарозы, что позволяет предположить, что хронический стресс может вызвать ангедонию [Fortunato et al., 2010].

Выученная беспомощность. Определенные типы депрессии у людей провоцируются стрессовыми жизненными событиями, а у испытывающих такие стрессоры уязвимых людей может развиться клиническая депрессия. В этом аспекте стресс может быть использован у животных-грызунов для моделирования подобных депрессии симптомов. Одной из хорошо проверенных моделей на животных является выученная беспомощность, при которой депрессивное состояние вызывается неконтролируемым и непредсказуемым ударом электрическим током при его пропускании через платформу или решетку, на

которой находится животное. После такого воздействия у животного снижается способность к обучению в парадигме пассивного избегания [Seligman, Beagley, 1975].

Материнская депривация. Ранний неблагоприятный жизненный опыт можно назвать одним из существенных факторов риска развития тяжелой депрессии. Ранний послеродовой период характеризуется значительной пластичностью развивающейся нервной системы, а ранняя послеродовая среда имеет решающее значение в своей способности влиять на поведение у взрослых людей. Доклинические исследования предоставили прямые доказательства того, что стресс в раннем возрасте приводит к повышенной чувствительности к стрессу и изменениям в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси на протяжении всей жизни. Среди парадигм, используемых для изучения ранних неблагоприятных жизненных событий, длительная разлука с матерью у грызунов имитирует пренебрежение или потерю родителей в раннем возрасте у людей и представляет собой один из самых мощных естественных стрессоров во время развития [Heim, Nemeroff, 2001].

Депривация сна. Сон выполняет важные гомеостатические функции, а лишение сна является стрессом, который имеет последствия как для мозга, так и для многих систем организма. Хотя лишение сна еще не является устоявшейся моделью депрессии, многие исследования показывают, что оно изменяет важные пути, связанные со стрессом [Abelaira, Reúus, Quevedo, 2013]. Обмен некоторых нейромедиаторов, таких как дофамин и серотонин, нарушается после лишения сна, что вызвано изменениями в поведении. Лишение сна на короткие или длительные периоды также влияло на экспрессию генов нескольких факторов транскрипции и генов, которые кодируют нейротрансмиттеры и белки, участвующие в метаболических процессах и клеточной пластичности [Sei et al., 2000].

Изменение фотопериода. Было показано, что изменение соотношения света/темноты может быть основой для очередной животной модели депрессии. В этой модели активные в ночное время мыши подвергаются длительному

воздействию искусственного света (22 часа в сутки) в течение 2 недель. Изучение взаимодействия между механизмами регуляции сна и бодрствования и изменениями поведения у животных может дать новое представление о депрессии [Becker et al., 2010]. Кроме того, Оцука с соавторами [Otsuka et al., 2014] показал что у лабораторных мышей C57BL/6J наблюдаются вызванные нарушением фотопериода изменения депрессивно-подобного поведения и содержания серотонина в мозге. Мыши C57BL/6J, содержащиеся в условиях короткого дня, по сравнению с мышами, содержащимися в условиях длинного дня, демонстрировали более длительное время неподвижности в тесте принудительного плавания и более низкий уровень серотонина и его предшественника L-триптофана в мозге. Похожие результаты были получены и на мышах конгенных линий с нормальной и сниженной активностью ТПГ-2 соответственно. Влияния фотопериода на двигательную, исследовательскую активность и тревожность в тесте «открытое поле» не наблюдалось. В то же время изменения фотопериода отразились на неподвижности в тесте принудительного плавания, уровне 5-НТ, 5-ГИУК, соотношении 5-ГИУК/5-НТ и уровне мРНК *Htr2a* в гиппокампе и среднем мозге. Выявлено влияние взаимодействия полиморфизма C1473G и фотопериода на уровень 5-НТ и соотношение 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе [Vazhenova et al., 2019b].

Психосоциальный стресс. Модели психосоциального стресса полностью опираются на врожденное социальное поведение. Центральная идея в таких моделях, независимо от того, применяются ли они на крысах, мышах или землеройках, заключается в том, чтобы позволить двум или более субъектам социально и физически взаимодействовать – агонистическое столкновение, так что один из них достигает доминирующего статуса (альфа), а другие остаются подчиненными (омега) [Krishnan, Nestler, 2011]. После множественных социальных поражений у грызунов наблюдается снижение социального взаимодействия, снижение исследовательского поведения и двигательной активности, ангедония (например, снижение предпочтения сахарозы и

сексуального поведения) и повышенная неподвижность, вызванная стрессом [Avgustinovich, Kovalenko, Kudryavtseva, 2005].

1.5.4. Модели вторичной или ятрогенной депрессии на животных

Вызванная резерпином модель депрессии. Многие биохимические показатели (дефицит метаболитов моноаминов, повышенная концентрация факторов воспаления, снижение уровня BDNF в сыворотке крови) оказываются измененными при возникновении депрессивных расстройств [Malki et al., 2014]. Следовательно, возможно создать модели депрессии на животных путем фармакологического изменения концентрации определенных молекул. Резерпин - алкалоид, блокирующий везикулярный транспортер моноаминов-2 (VMAT2), который увеличивает обмен моноаминов в мозге, что проявляется симптомами депрессии у грызунов. Резерпин также усиливает окислительно-восстановительный дисбаланс за счет аутоокислительного катаболизма моноаминов и окислительной деградации моноамиоксидазой, что еще больше стимулирует оксидативно-нитрозативный стресс в мозге [Khurana, Bansal, 2019].

Модель депрессии, вызванная производными ретиноевой кислоты. Изотретиноин, производное ретиноевой кислоты, используемое в качестве высокоэффективного средства для лечения тяжелых форм акне, связано с повышенным риском депрессии и самоубийства. У мышей, которым хронически вводили изотретиноин, наблюдается увеличение неподвижности в тестах принудительного плавания и подвешивания за хвост [Krishnan, Nestler, 2011].

Модель депрессии, вызванная цитокинами и нарушениями регуляции иммунной системы. Провоспалительные цитокины, такие как интерферон- α , применяются у людей для лечения некоторых заболеваний. Многие из этих рекомбинантных белков вызывают клинически значимую депрессию в качестве побочного эффекта [Loftis, Hauser, 2004]. Большое количество доклинических данных свидетельствует о двунаправленной связи между активацией иммунитета и симптомами депрессии: было показано, что определенные цитокины вызывают депрессивное поведение у грызунов и приматов [Felger et al., 2007], а некоторые модели хронического стресса вызывают значительные изменения в

функционировании иммунной системы [Miller, Maletic, Raison, 2010]. Цитокины являются медиаторами воспаления, взаимодействующими с путями, связанными с депрессией, такими как метаболизм нейротрансмиттеров, нейрональная пластичность и нейроэндокринные функции. У пациентов с клиническими проявлениями депрессии наблюдаются высокие уровни провоспалительных цитокинов (интерлейкины IL-1, IL-2, IL-6) и фактора некроза опухоли [Abelaira, Reúus, Quevedo, 2013].

Кроме перечисленных моделей выделяют также модель отмены психостимуляторов (амфетамин, кокаин) [Гарибова, Крайнева, Воронина, 2017] и модель удаления обонятельных луковиц [Fuchs, Flügge, 2006].

1.5.5. Генетические модели депрессии

Генетическая предрасположенность вносит значимый вклад в развитие депрессивных состояний у человека, а генетические модели депрессии приобретают все большую ценность [Matsunaga et al., 2017; Ushakova et al., 2019]. Для получения таких моделей обычно используют методику **генетического исключения (нокаута) генов**, кодирующих компоненты серотониновой системы (*Htr1a*, *Htr1b*, *Slc6a4*), норадренергической системы (гены рецепторов $\alpha 2A$, $\alpha 2C$), МАОА, опиатной системы, ГАМК, глутаматергической системы [Canavello et al., 2010]. Модели, полученные таким способом, являются мощным инструментом для исследования роли определенного гена в развитии депрессивных состояний, но они не всегда могут быть эффективны. Связано это с тем, что депрессия может затрагивать большое число генов и весь комплекс биохимических и поведенческих изменений, наблюдаемых при депрессии, практически невозможно воспроизвести при нокаутировании единственного гена [Valvassori et al., 2013].

Еще одним актуальным в последнее время подходом, помимо создания и использования нокаутных животных, является **выведение специальных линий**. Одной из известных линий крыс, проявляющих выраженное депрессивно-подобное поведение, является линия FSL. Примечательно, что изначально эта линия крыс была выведена как устойчивая к действию диизопропил флуорофосфата (вещество обладающее антихолинэстеразной активностью)

[Overstreet, Wegener, 2013]. Также для исследования депрессии используются линии крыс Wistar-Kyoto [Bruzos-Cidón et al., 2015], крысы, выведенные по признаку высокого (HAB – high anxiety-related behavior) и низкого уровня тревожности (LAB – low anxiety-related behavior) [Neumann et al., 2011].

Наряду с линиями крыс, используются также линии мышей, демонстрирующие депрессивно-подобное поведение, например мыши H/Rouen, которые демонстрируют поведенческое отчаяние в тесте подвешивания за хвост, сниженное предпочтение сахарозы, а также тревожность, которые купировались при хроническом лечении флуоксетином [Yacoubi El et al., 2013]. Еще одной линией мышей, с выраженным депрессивно-подобным поведением, являются мыши ASC/Icg (ASC, Antidepressant Sensitive Catalepsy). Линия мышей ASC была создана в Лаборатории нейрогеномики поведения Института цитологии и генетики СО РАН в результате длительного отбора гибридов между предрасположенной к каталепсии линией CBA/Lac и устойчивой к каталепсии линии AKR/J на высокую предрасположенность к каталепсии [Kulikov et al., 2008; Kondaurova et al., 2006]. У мышей ASC наблюдаются депрессивно-подобные изменения в классических поведенческих тестах [Bazovkina et al., 2005] и в состоянии иммунной системы [Alperina et al., 2007]. Показатели поведения и иммунной системы у этих мышей значительно улучшались после хронического введения флуоксетина [Tikhonova et al., 2013; Gevorgyan et al., 2016] или однократного интрацеребровентрикулярного введения BDNF [Naumenko et al., 2012].

1.6. Вирусные векторы как инструменты нейробиологии

Гены уже давно рассматриваются как мишени для коррекции патологий [Wirth, Parker, Ylä-Herttuala, 2013]. С момента появления технологии рекомбинантной ДНК, позволяющей создавать функциональную единицу, экспрессирующую ген, вопрос о том, как эффективно и безопасно доставить этот терапевтический агент в организм, стал основной проблемой для исследователей.

Существующие в настоящее время средства доставки генов, а именно векторы, делятся на два класса: ДНК (невирусные) векторы и вирусные векторы.

Для доставки генов в клетки-мишени нуклеиновые кислоты (НК) сами по себе, без носителя, не подходят. По периферии НК располагаются полярные группы сахарофосфатов, что придает им свойства анионов и способствует отталкиванию от отрицательно заряженной плазматической мембраны клетки. Кроме того, являясь гидрофильной, молекула НК не может преодолеть гидрофобный слой клетки-мишени. Еще одна проблема связана с коротким временем жизни РНК и ДНК в сыворотке крови. Для преодоления этих проблем и возможности доставки генов внутрь клетки уже более 40 лет совершенствуются векторные генетические конструкции [Epiranova et al., 2017].

Рекомбинантные вирусы являются высокоэффективными носителями для доставки генов *in vivo*. Вирусные векторы расширяют набор инструментов нейробиологии, включая прямую и быструю антероградную, ретроградную и транссинаптическую доставку сенсоров, репортеров, индикаторов, рекомбиназ или генных регуляторных элементов в нейроны млекопитающих. Каждый тип вируса имеет уникальные преимущества и ограничения [Chen et al., 2019].

Генная терапия становится жизнеспособным вариантом для клинического вмешательства в значительной степени благодаря успеху и безопасности нынешнего поколения векторов на основе вирусов. В целом вирусные векторы оказались более эффективными при доставке генов *in vivo*, чем синтетические векторы на основе наночастиц и липосом, ведь при большинстве заболеваний целью является трансдукция как можно большего числа пораженных клеток [Choudhury et al., 2017].

Большое число различных вирусов было исследовано для доставки генов или онколитической противоопухолевой терапии, хотя каждый вирусный тип имеет уникальные преимущества и ограничения. К наиболее часто используемым в клинических испытаниях относятся ретровирусные векторы, поксвирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы на основе

вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1) и аденоассоциированные векторы (AAV) [Davidson, 2000].

Аденоассоциированные вирусные векторы являются относительно недавним дополнением к этому списку вирусных векторов, но стали одним из наиболее успешных для терапии неврологических расстройств. В настоящее время они являются наиболее часто используемыми вирусными векторами для исследований центральной нервной системы и будут в центре внимания в данной работе.

Природные AAV — это безоболочечные парвовирусы с представленным одноцепочечной ДНК геномом. Они трансдуцируют делящиеся и неделящиеся клетки млекопитающих и часто обнаруживаются в качестве загрязнителей в образцах крови и тканей. Чтобы инфицировать клетку, AAV прикрепляется к клеточной мембране, рецепторные лиганды на поверхности вирусного капсида различаются в зависимости от серотипа и позволяют капсидам связываться с различными рецепторами на поверхности клетки хозяина (Рис. 9).

После связывания с рецептором вирус подвергается рецептор-опосредованному эндоцитозу и дальнейшему переносу в область ядра с помощью эндосом. Затем AAV выходит из поздней эндосомы или лизосомы и перемещается в ядро, где вирион сбрасывает оболочку. Двухцепочечная ДНК продуцируется из одноцепочечной ДНК вируса с помощью полимеразы клетки-хозяина. Геном двухцепочечного вектора сохраняется в виде стабильных кольцевых и/или конкатемерных внехромосомных эписом [Haggerty et al., 2020] (Рис. 9).

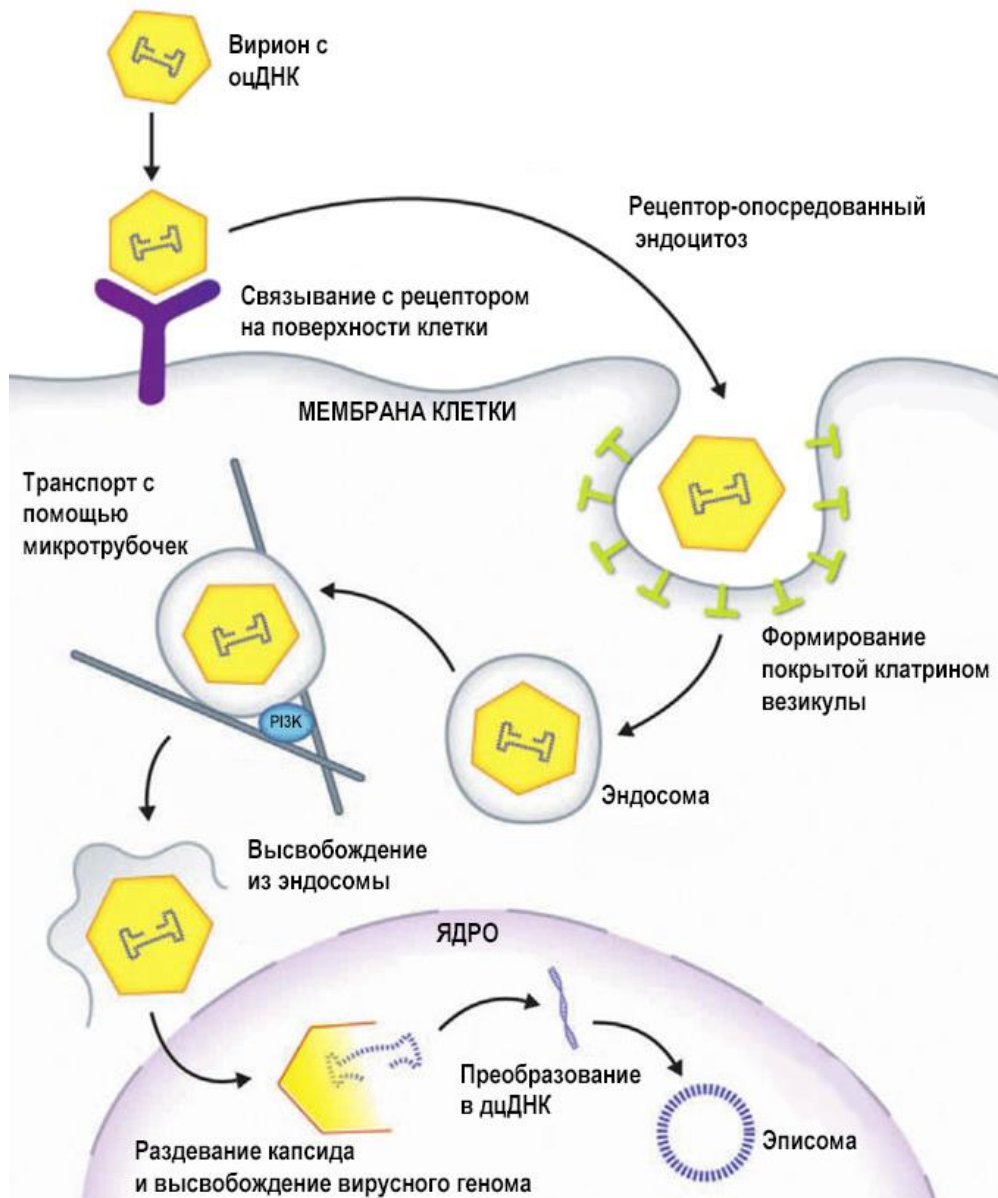


Рисунок 9. Механизм трансдукции аденоассоциированного вируса, пояснение в тексте. Адаптировано из [Davidson, 2000].

Природный AAV2 – единственный человеческий вирус, способный целенаправленно интегрироваться в хромосому 19 человека, однако в рекомбинантных AAV все гены, необходимые для интеграции, удаляются [Chen et al., 2019] (Рис. 10). Интересующий ген в AAV векторе фланкируется инвертированными концевыми повторами (ITRs). Генетическая последовательность между ITRs упаковывается и доставляется в целевую клетку частицами AAV. Из-за ограниченной емкости вируса генетическая последовательность между ITRs продумывается экономично и рационально. Часто плазида несет гены, которые позволяют оптимизировать экспрессию

целевого гена, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE, Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) Posttranscriptional Regulatory Element) и/или сигнал полиаденилирования гормона роста (человеческий hGHpA, бычий bGHpA или мышинный mGHpA). Наличие WRRE последовательности способствует экспрессии генов и повышает конечный вирусный титр во время трансдукции [Klein et al., 2006]. Сигналы полиаденилирования также повышают титр вируса и улучшают экспрессию целевого гена в нейронах. Однако эти элементы могут быть вырезаны из вектора, если необходимо разместить более крупный целевой ген в ущерб снижению титра вируса и уровня экспрессии [Choi et al., 2014].

В культурах нейронов экспрессия рекомбинантного AAV проявляется через 3-4 дня. В культурах срезов мозга *ex vivo* гены, доставленные AAV, экспрессируются на 7-14 дни. Экспрессия до оптимального уровня *in vivo* после стереотаксической микроинъекции AAV в мозг мыши может занять 3-4 недели [Chen et al., 2019].

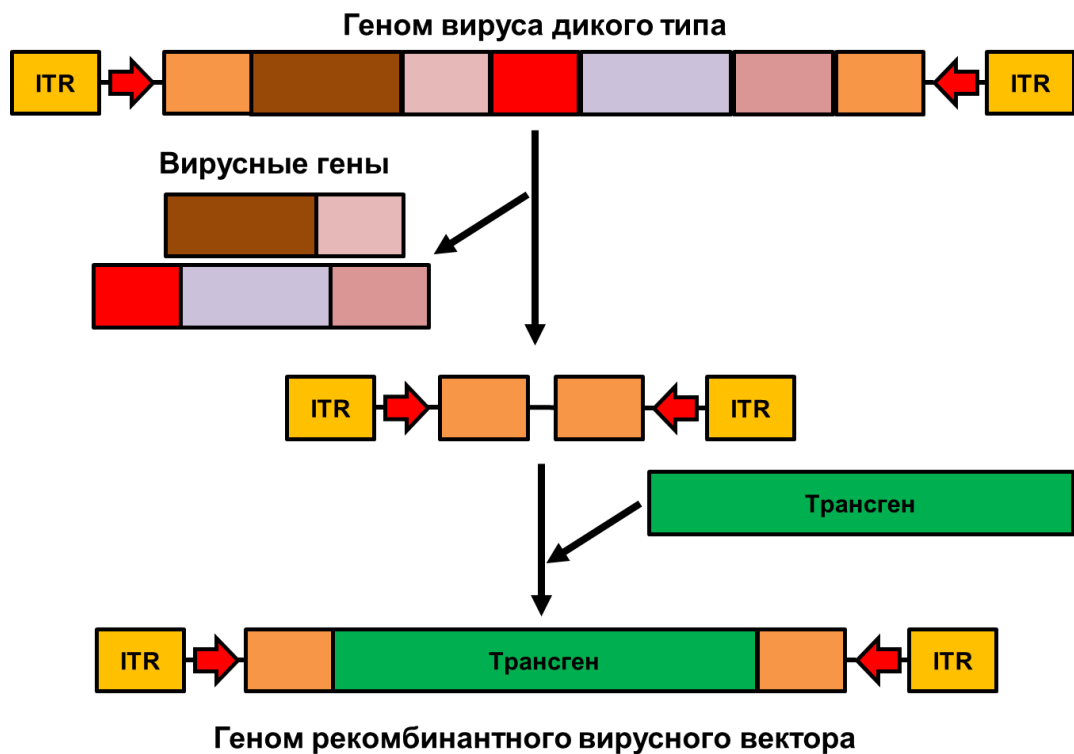


Рисунок 10. Создание вирусного вектора. Удаление большинства вирусных генов создает пространство для добавления трансгена и снижения вирулентности. Адаптировано из [Wang, Guangping Gao, Gao, 2014].

Векторы AAV близки к идеальному вектору для генной терапии ЦНС, поскольку они:

1. могут опосредовать перенос генов, как в митотические, так и в постмитотические клетки;
2. являются нейротропными после прямой инфузии в паренхиму головного мозга [Davidson, 2000];
3. могут стабильно существовать в эписомальном состоянии с низким уровнем геномной интеграции [McCarty et al., 2009];
4. не проявляют патогенности или цитотоксичности;
5. обладают малой иммуногенностью, в основном гуморальной [Bessis, GarciaCozar, Boissier, 2004];
6. могут быть изготовлены с высокими титрами (10^{13} – 10^{14} частиц на мл, в зависимости от способа получения) и с высокой чистотой [Choudhury et al., 2017].
7. не встраивают доставляемые гены в хромосомы клеток хозяина, не вызывают инсерционные мутации и сохраняются эписомально в качестве конкатемеров [Chen et al., 2019].

Однако существенным ограничением AAV векторов является их небольшая емкость упаковки (4.5 кБ для одноцепочечных векторов, 2.4 кБ для самодополняющихся векторов), что накладывает серьезные ограничения на размер целевого гена [Benskey et al., 2019].

Было показано, что AAV векторы обеспечивают стабильную экспрессию трансгена в мозге мыши в течение более 6 месяцев [Lentz, Gray, Samulski, 2012] и более 6 лет у приматов и 8 лет у собак в других тканях [Vandamme, Adjali, Mingozzi, 2017].

Недавние исследования указывают на значительную роль гетеродимеризации рецепторов 5-HT₇ и 5-HT_{1A} в развитии депрессии и действии антидепрессантов. Ранее было высказано предположение, что изменение

соотношения гомо- и гетеродимеров 5-HT_{1A}/5-HT_{1A} в пресинаптических нейронах в сторону гомодимеров может являться одной из причин депрессии [Naumenko et al., 2014]. Следовательно, искусственное увеличение количества рецепторов 5-HT₇ в пресинаптических терминалях может восстановить физиологическое соотношение гетеродимеров и гомодимеров, что приведет к антидепрессивному эффекту. С другой стороны, в постсинаптических терминалях такая гетеродимеризация нежелательна, поскольку 5-HT_{1A} гетерорецепторы оказывают обширное положительное влияние на ряд нейропсихофармакологических эффектов. Теоретически, гетеродимеризация между 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторами в терминальных областях мозга приведет к ухудшению психического состояния организма. Для проверки обеих гипотез была использована плаزمид AAV_Syn_HTR7-EGFP, которая вводилась в средний мозг мышей линий C57Bl/6J и ASC/Icg (генетическая модель депрессии) и во фронтальную кору мышей линии C57Bl/6J.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальные животные

Исследования проводили в виварии конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Опыты проводились на взрослых самцах (возраст 8 недель, вес 24 ± 2 г) мышей линии C57Bl/6J и инбредной линии ASC/IsG. Мыши содержались в пластиковых клетках размером $40 \times 30 \times 15$ см в стандартных условиях (температура 20–22 °С, относительная влажность 50–60%, с регулируемым световым режимом (12 ч света и 12 ч темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Содержание экспериментальных животных и все процедуры выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”; “National Research Council © 2011 National Academy of Sciences” (США). Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

2.2. Экспериментальные серии

Было проведено три серии экспериментов. В первую очередь работа конструктора была проверена на стандартной линии мышей C57Bl/6J. Опытной группе в область ядер шва вводился конструктор, кодирующий 5-HT₇ с EGFP, в качестве контроля отдельной группе мышей аналогичным образом вводился аденоассоциированный вирус, несущий плазмиду, кодирующую EGFP. Мыши в течение 5 недель содержались в стандартных условиях, затем проводились поведенческие тесты, после которых выполнялось выведение животных из эксперимента. Далее на льду выделялись средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора для измерения уровней экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов, 5-HTT и ТПГ-2, с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот анализа, а также хроматографического анализа для определения уровней 5-HT и 5-ГИУК. Две партии мышей участвовало в этом этапе: в первой (15 мышей) партии были

проведены поведенческие тесты, ПЦР и Вестерн-блот анализ, вторая партия (19 мышей) была взята для ВЭЖХ.

Второй этап работы заключался в проверке эффектов от введения в область ядер шва среднего мозга конструкта AAV_Syn_HTR7-EGFP на мышей линии ASC с генетически детерминированным депрессивно-подобным поведением. Опытной группе вводился конструкт, кодирующий 5-HT₇ с EGFP, в качестве контроля отдельной группе мышей аналогичным образом вводился аденоассоциированный вирус, несущий плазмиду, кодирующую EGFP. Мыши в течение 5 недель содержались в стандартных условиях, затем проводились поведенческие тесты, после которых проводилось выведение из эксперимента путем декапитации с предварительным CO₂ наркозом. Далее на льду выделялись средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора для измерения уровней экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов, 5-HTT и ТПГ-2, с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блота, а также измерения уровней 5-HT и 5-ГИУК с помощью ВЭЖХ. Во втором этапе также участвовало две партии мышей: 19 мышей для поведенческих тестов, ПЦР и Вестерн-блота и 17 мышей для ВЭЖХ.

Третья серия экспериментов включала в себя введение опытной группе мышей линии C57Bl/6J в область фронтальной коры конструкта, кодирующего 5-HT₇ с EGFP, в качестве контроля отдельной группе мышей аналогичным образом вводился аденоассоциированный вирус, несущий плазмиду, кодирующую EGFP. Мыши в течение 5 недель содержались в стандартных условиях, затем проводились поведенческие тесты, после которых выполнялось выведение животных из эксперимента. Далее на льду выделялись средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора для измерения уровней экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов, 5-HTT и ТПГ-2, с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блот анализа. В третьей экспериментальной серии также было две партии мышей: в первой (20 мышей) партии были проведены поведенческие тесты, ПЦР и Вестерн-блот анализ, вторая партия (16 мышей) была взята для ВЭЖХ.

2.3. Методы клеточной биологии

2.3.1. Поддержание клеточной линии и трансфекция

Клетки НЕК 293FT субкультивировали в среде DMEM (Модифицированная по Дульбекко среда Игла) (Sigma, Германия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США), 1% GlutaMAX (Gibco США) и 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Клетки инкубировали при 37°C при 5% CO₂. Клетки пересеивали при 70% конфлюэнтности и среду обновляли каждые 2–3 дня. Клетки НЕК 293FT трансфицировали плазмидами с использованием полиэтиленимина (PEI, Polysciences, 23966-2, Германия), следуя инструкциям производителя.

2.3.2. Нарботка вирусных частиц

Упаковка рAAV_Syn_HTR7-EGFP или рAAV_Syn_EGFP в аденоассоциированные вирусные частицы была выполнена путем котрансфекции с плазмидами AAV-DJ и pHelper (Cell Biolabs, Inc., США) в клетках НЕК-293FT [Wirth et al., 2013]. Вирусные частицы собирали через 48 часов в соответствии с протоколом, описанным ранее [Grimm, Kay, Kleinschmidt, 2003]. Количество полученных вирусных частиц определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени с системой праймеров (F 5'-cctggttgctgtctctttatgagg-3'; R 5'-tgacaggtggtggcaatgc-3'). Серию разведений исходной плазмиды известной концентрации использовали в качестве стандарта для определения количества вирусных частиц. Оба AAV вектора, использованные в этом исследовании, имели одинаковые геномные титры (10⁸ вирусных частиц на 1 мкл).

2.3.3. Первичная нейрональная культура

Культуры нейронов гиппокампа получали из мышей C57BL/6J на 18 эмбриональный день в соответствии с оптимизированным протоколом для нейронов гиппокампа мышей [Kobe et al., 2012]. Гиппокампы выделяли и подвергали ферментативной обработке трипсином (Sigma, Германия) в течение 20 минут. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 1000 об/мин в

течение 3 минут. Затем диссоциированные нейроны ресуспендировали в среде DMEM (Sigma, Германия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, США) и помещали на 18-миллиметровые покровные стекла, покрытые 0.1 мг/мл поли-D-лизина (Sigma-Aldrich, Германия). После 1 часа инкубации при 37°C добавлялась среда Neurobasal-A (Gibco, США), которая содержала 20 мМ GlutaMAX (Gibco, США), добавку B-27 (Gibco, США) и 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина (Sigma-Aldrich, Германия). Культуры поддерживали при 37°C в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂. Половину среды заменяли каждые три дня. Трансдукцию клеток проводили на 9-й день *in vitro* с AAV векторами.

2.4. Генно-инженерные методы

Плазмиды AAV_Syn_HTR7-EGFP и AAV_Syn_EGFP были сконструированы д.б.н. В. С. Науменко с помощью генно-инженерных методов (Рис. 11). Плазида AAV_Syn_HTR7-EGFP кодирует 5-HT₇ рецептор (на основе кДНК канонического транскрипта *Htr7-202*) под синапсиновым промотором и обеспечивает экспрессию *Htr7* гена, а также EGFP, необходимого для контроля эффективности экспрессии плазмиды в нейронах млекопитающих. Плазида AAV_Syn_EGFP кодирует ген EGFP под промотором синапсина и в данной работе выступает в качестве контрольной плазмиды. Полученные аденоассоциированные вирусы при интрацеребральном введении способны трансдуцировать нейроны мыши *in vivo*.

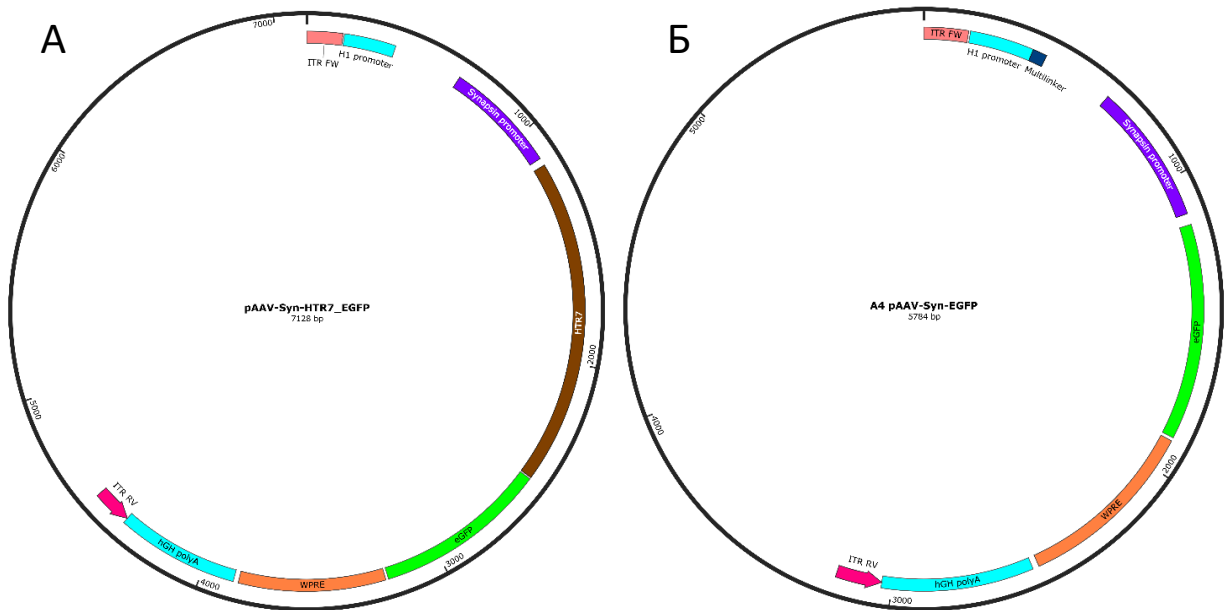


Рисунок 11. Карта плазмиды (А) AAV_Syn_HTR7-EGFP и (Б) AAV_Syn_EGFP.

2.5. Стереотаксический метод

Аденоассоциированный вирус, несущий плазмиду AAV_Syn_HTR7-EGFP или AAV_Syn_EGFP, вводился в средний мозг/фронтальную кору мозга мышей. Для этого вирус разводился в буфере, содержащем 150 мМ NaCl и 10 мМ Tris (pH 7.4) до концентрации 10^8 вирусных частиц в микролитре. Для наркотизации животных использовалась смесь 2,2,2-трибромэтанола и 2-метил-2-бутанола в отношении 1:1 объемом 400 мкл (Sigma, США). Скальп мыши разрезали и в черепе иглой проделывали отверстие для последующей инъекции. Плазмиды медленно вводились мышам с использованием стереотаксической установки (TSE Systems, Германия) и шприца Гамильтона согласно следующим координатам:

а) для среднего мозга: AP: -3 мм, L: -2.0 мм, DV: +4 мм, угол введения 38 градусов, поворот 40 градусов, ось Y (135) (Рис. 12А).

б) для фронтальной коры: AP+1.5; L+/-1; DV +1 (Рис. 12Б).

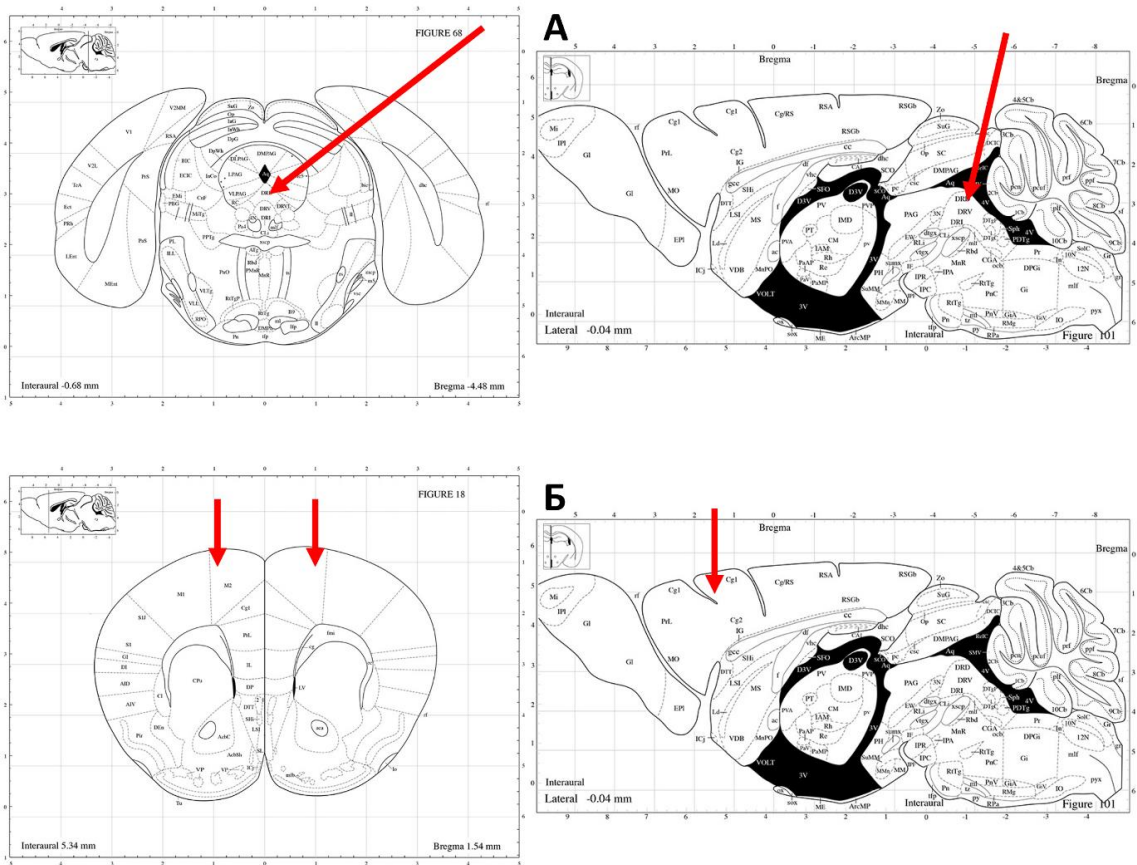


Рисунок 12. Атлас мозга мыши по Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin, фронтальный и сагиттальный срезы, стрелками отмечена точная область инъекции в ядра шва среднего мозга (А) и фронтальную кору (Б).

После инъекции иглу оставляли на месте еще 5 мин, чтобы свести к минимуму вытекание раствора вируса при удалении иглы. Объем вводимой в средний мозг жидкости составлял 1 мкл.

2.6. Флуоресцентная микроскопия

Через 5 недель после инъекции AAV в средний мозг или фронтальную кору мышам под анестезией выполняли транкардиальную перфузию 20 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) и 20 мл 4% раствора параформальдегида. Головной мозг удаляли и затем фиксировали 4% параформальдегидом в течение 5 часов и погружали в 30% сахарозу в PBS на два дня. Последовательные срезы размером 20 мкм делали с помощью криотома (Thermo Scientific, Германия). Срезы обрабатывались 5% ослиной сывороткой (Sigma-Aldrich, Germany) и 0.1% раствором Triton X-100 в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре для блокирования неспецифического связывания. Затем в течение ночи при 22 °C

проводилась инкубация с кроличьими моноклональными антителами против ТПГ-2 (1:1000, Abscam), разведенным в PBS. После промывания срезов в PBS, на 1 час при комнатной температуре наносились вторичные ослиные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor® 594. Ядра клеток окрашивали раствором бис-бензимида (краситель Hoechst 33258, 5 мкг/мл в PBS; Sigma-Aldrich, Германия). Затем срезы монтировали под покровное стекло, используя среду Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, США) с последующим микроскопическим анализом с использованием микроскопа Zeiss Axio Imager с 2.5-, 20- и 40-кратными воздушно-иммерсионными объективами.

2.7. Поведенческие тесты

2.7.1. Тест «открытое поле»

Для теста «открытое поле» использовалась круглая арена (40 см в диаметре), окруженная белой пластиковой стеной (25 см высотой) и освещенная через матовый и полупрозрачный пол двумя 12 Вт галогеновыми лампами, расположенными на 40 см ниже пола арены. Мышь помещалась рядом со стеной, после чего поведение животного регистрировалось в течение 5 мин с помощью цифровой видеокамеры (Sony, Япония), расположенной на расстоянии 80 см от арены. Арену мыли после каждого теста. Видеопоток с камеры был проанализирован покадрово с помощью оригинального программного обеспечения *EthoStudio* [Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008]. Автоматически измерялись длина пути (горизонтальная активность) и процент времени нахождения в центре арены (исследовательская активность) [Thompson, Grabowski-Boase, Tarantino, 2015].

2.6.2. Тест «принудительное плавание»

Мышь помещалась в прозрачный стеклянный цилиндр диаметром и высотой 30 см, наполненный водой $t=25$ °C. После двухминутного периода адаптации, в течение четырех минут автоматически регистрировалась подвижность, а также вручную регистрировалась неподвижность животного с помощью оригинального программного обеспечения *EthoStudio*. Для расчёта

уровня подвижности программа измеряет скорость изменения силуэта животного, которая определялась как количество пикселей, связанных с животным, измененных между двумя соседними кадрами [Khotskin et al., 2019; Kulikov et al., 2010].

2.7. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

2.7.1. Выделение общей РНК

Общую РНК экстрагировали тризолом по протоколу производителя (Invitrogen, США). Осадок РНК растворялся в воде, обработанной диэтилпиноксикарбонатом с добавлением ДНКазы по протоколу производителя (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о.е./мл). Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре (Nanodrop, США). РНК была разведена водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при -80 °С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [Naumenko et al., 2008; Науменко, В., 2006].

2.7.2. Реакция обратной транскрипции

Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2.25 мкМ стерильного 1 М КСl в объёме 16 мкл, денатурирована при 94°С в течение 5 мин на амплификаторе "БИС" М-120 (БИС-Н, Россия), затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Бисан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (рН 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4 мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М MnCl₂ (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпиноксикарбонатом. Полученная смесь (конечным объёмом 31 мкл) была инкубирована при 41°С в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20°С [Kulikov et al., 2005].

2.7.3. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR)

Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (Табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе

данных

EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании “Биосан” (Россия). 1 мкл кДНК смешивали с 2.5 мкл ПЦР буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2.5 мкл 2.5 mM dNTP, 2.5 мкл 25 mM MgCl₂, 2.5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0.2 мкл Taq ДНК-полимеразы и стерильной воды до конечного объема 20 мкл. При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов «Синтол» (Москва, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System (Roche, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94°C, 1 цикл; 10 сек при 94°C, 30 сек при соответствующей температуре отжига (Табл. 1), 30 сек при 72°C, 40 циклов. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах C_t (значение порогового цикла) – lg P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2*, выполняющей функцию внутреннего стандарта [Kulikov et al., 2005; Naumenko et al., 2008; Науменко, В., 2006].

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	T _{отж.} , °C	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Htr1a</i>	F 5'-ctgtgacctgtttatcgccctg-3' R 5'-gtagtctatagggtcggtgattgc-3'	62	200
<i>Htr7</i>	F5'-ggctacacgatctactccaccg-3' R5'-cgcacactcttcacctccttc-3'	65	198
<i>rPol2</i>	F 5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R 5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	60	194

<i>Tph2</i>	F 5'-cattcctcgcacaattccagtcg-3' R 5'- cttgacatattcaactagacgctc -3'	61	239
<i>Slc6a4</i>	F 5'-cgctctactacctcatctcctcc-3' R 5'- gtctgggcgaagtagttgg -3'	63	101

2.8. Хроматографический анализ

2.8.1. Реактивы

5-гидроксииндолуксусная кислота, изопреналин, серотонин ($\geq 98\%$ HPLC, Sigma-Aldrich, США); метанол (HPLC-grade, Fisher Chemical, США); фосфат калия однозамещенный (Sigma-Aldrich, США); ортофосфорная кислота, гидроксид натрия (ХЧ, «Химмед», Россия); динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США); хлорная кислота (Riedel de Haen, Германия); натрий 1-октансульфонат (Sigma-Aldrich, США); вода типа I, очищенная с помощью системы Direct-Q3R (Millipore, Франция), удельное сопротивление 18.2 МΩ/см при 25°C.

2.8.2. Экстракция

Структуры головного мозга мышей гомогенизировали на ледяной бане в 200 мкл 0,6 М хлорной кислоты, содержащей изопреналин (внутренний стандарт) в концентрации 200 нг/мл. Для осаждения белка гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при 4°C. Осадок хранили при -20 °C для дальнейшего количественного определения белка согласно протоколу Бредфорда. Супернатант разводили ультрачистой водой в 2 раза и фильтровали на мембране с диаметром пор 22 мкм. Полученный экстракт использовали для хроматографического анализа.

2.8.3. Хроматографический анализ

Измерения проводили с помощью модульной системы хроматографического анализа (Shimadzu Corporation, США), оснащенной градиентным насосом на четыре растворителя (LC-20AD) с вакуумным дегазатором (DGU-20A5R) и блоком для автоматизированного ввода пробы с петлей объемом 100 мкл (SIL-20A).

Элюирование проводили в изократическом режиме в течение 15 минут. Элюент состоял из 90% 50 мМ фосфатного буферного раствора при pH 3.9 и 10% метанола в присутствии 0,3% натрий 1-октансульфоната. Скорость подачи элюента составляла 1 мл/мин. Разделение веществ происходило на аналитической колонке (Luna, Phenomenex, США) C₁₈ (длина × внутренний диаметр 100 × 4.6 мм) с размером частиц сорбента 5 мкм. Колонка была защищена предколонкой C₈ (длина × внутренний диаметр 12.5 × 4.6 мм, 5мкм). Колонка была термостатирована при 40°C. Использовались следующие реактивы: норадреналин, диоксифенилуксусная кислота, дофамин, 5-гидроксииндолуксусная кислота, изопреналин, гомованилиновая кислота, серотонин (≥ 98% HPLC, Sigma-Aldrich, США); метанол (HPLC-grade, Fisher Chemical, США); фосфат калия однозамещенный (Sigma-Aldrich, США); ортофосфорная кислота, гидроксид натрия (ХЧ, «Химмед», Россия); динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma-Aldrich, США); хлорная кислота (Riedel de Haen, Германия); натрий 1-октансульфонат (Sigma-Aldrich, США); вода типа I, очищенная с помощью системы Direct-Q3R (Millipore, Франция), удельное сопротивление 18.2 МΩ/см при 25°C.

Биогенные амины детектировали на электрохимическом детекторе DECADE II (стеклоуглеродная проточная ячейка VT-03 длиной 3 мм) (Antec, Нидерланды) при установленном потенциале +0,7 В относительно потенциала хлорсеребряного электрода сравнения. Сигнал детектора снимался интегратором CBM-20A (Shimadzu Corporation, США) и обрабатывался в программе Labsolutions (Shimadzu). Предел количественного определения - 20 пг в пробе при отношении сигнал-шум 5:1.

2.8.4. Количественный анализ

Расчет содержания моноаминов проводили по формуле:

$$Q_x = d \times \frac{S_x \times C_{in}}{S_{in}} \times \frac{1}{RRF_x} \times v,$$

где S_x - площадь пика исследуемого вещества в хроматограмме пробы; S_{in} - амплитуда пика внутреннего стандарта в хроматограмме пробы; C_{in} -

концентрация внутреннего стандарта в пробе (нг/мл); RRF_x (relative response factor) - относительный фактор отклика; d – кратность разведения; v – объем экстрактора при гомогенизации.

Величину RRF_x вычисляли индивидуально для каждого исследуемого вещества. Для расчета RRF_x выполняли по 4 измерения стандартных растворов исследуемых веществ с концентрацией 5, 10, 25, 50, 100 и 200 нг/мл. RRF_x выражается соотношением:

$$RRF_x = \frac{RF_x}{RF_{in}} = \frac{S_{\bar{x}}}{C_{\bar{x}}} \times \frac{C_{\bar{in}}}{S_{\bar{in}}},$$

где RF_x – фактор отклика моноамина; RF_{in} – фактор отклика внутреннего стандарта; $S_{\bar{x}}$ – площадь пика моноамина в хроматограмме стандартных растворов; $S_{\bar{in}}$ – площадь пика внутреннего стандарта в хроматограмме стандартных растворов; $C_{\bar{x}}$ – концентрация вещества в стандартных растворах (нг/мл); $C_{\bar{in}}$ – концентрация внутреннего стандарта в стандартных растворах (нг/мл).

2.8.5. Обоснование метода

Время удерживания исследуемых веществ было постоянным (отклонение <1%). Пик каждого исследуемого вещества разрешался с соседними пиками на уровне базовой линии (Рис. 13). Размытие пиков было незначительным - tailing factor <1.2. Эффективность колонки была не менее 13000 тарелок. При хроматографическом анализе стандартных растворов с концентрацией 5, 10, 25, 50, 100 и 200 нг/мл для каждого исследуемого вещества установлена линейная зависимость между его концентрацией в растворе и площадью соответствующего пика на хроматограмме (Рис. 13).

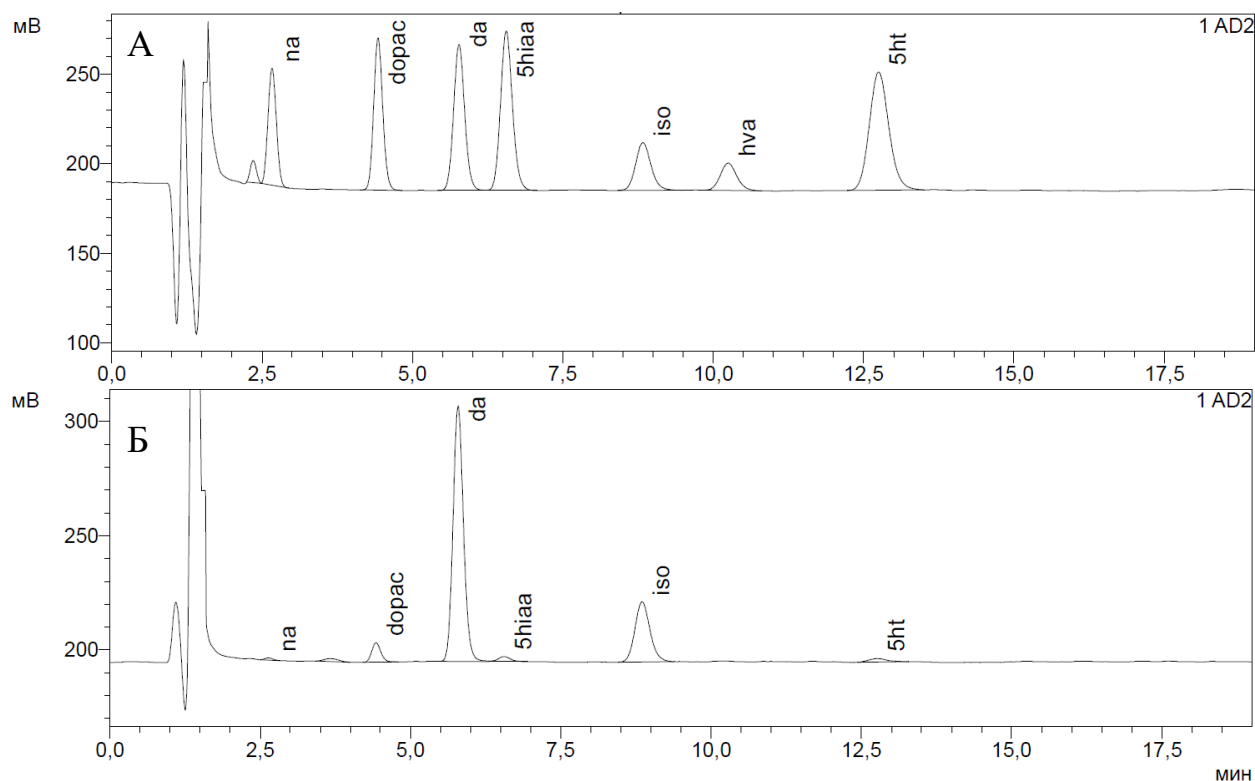


Рисунок 13. А. Хроматограмма смеси стандартов. na – норадреналин, dopac – диоксифенилуксусная кислота, da – дофамин, 5hiaa – 5-гидроксииндолуксусная кислота, iso – изопреналин, hva – гомованилиновая кислота, 5ht – серотонин. Количество каждого вещества, нанесенного на колонку – 2 нг. Б. Пример хроматограммы реальной пробы (стриатум).

2.9. Измерение общего белка по протоколу Бредфорда

Измерение белка по протоколу Бредфорда проводили следующим образом: к осадку белка прибавляли 1 мл 0.1 М NaOH, растворяли белок при 37°C и встряхивании (1000 rpm на термошейкере). Реактив Бредфорда (Bio-rad Laboratories Ltd., США) разводили в соотношении 1:4 mQ H₂O. Затем добавляли по 195 мкл разведенного реактива Бредфорда в лунки плашки, образцы белка вносили в лунки в двух повторах. После планшет центрифугировали в течение 1 минуты и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре MultiScan при длине волны 595 нм. Для построения калибровочной кривой использовались стандарты с содержанием белка (БСА, бычий сывороточный альбумин) в следующих концентрациях: 1000 мкг/мл, 800 мкг/мл, 600 мкг/мл, 400 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл.

2.10. Western-Blot анализ

Для выделения мембранной и цитозольной фракций белка структуры мозга (средний мозг, фронтальная кора, гиппокамп) гомогенизировали в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH 7.2; 1 мМ EDTA; 5мМ бета-меркаптоэтанола; и ингибиторы протеаз (Thermo Scientific, США) при концентрации, рекомендованной производителем. Гомогенат центрифугировали на скорости 500 g 15 минут при 4°C, затем отбирали надосадочную жидкость и центрифугировали ее на скорости 20000 g в течение часа при 4°C. Супернатант отбирали в чистую пробирку (цитозольная фракция). Осадок, оставшийся в пробирке (мембранная фракция) ресуспендировали в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH7.2; 1 мМ EDTA; 300 мМ сахарозы, 5мМ бета-меркаптоэтанола и ингибиторы протеаз. Концентрацию белка определяли с помощью BCA метода, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Затем все пробы разводили до равной концентрации (2 мг/мл) с Лэмбли буфером, содержащим 62 мМ Трис-HCl, pH 6.8, 10% сахарозы, 2% SDS, 5% β-меркаптоэтанол и денатурировали с помощью нагрева в течение 15 минут при 42°C.

Для разделения белковых фракций использовался метод вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Для этого использовали 10% разделяющий гель и 5% концентрирующий гель. На дорожку наносили 10 мкг белка и разгоняли при 100 В до входа проб в разделяющий гель, затем напряжение увеличивали до 180 В. Для электрофореза использовали трис-глициновый буфер (pH 8.3). В качестве маркера использовали смесь Precision Plus Protein Kaleidoscop Standards (Bio-rad Laboratories Ltd., США).

Белки переносили с помощью полусухого электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-rad Laboratories Ltd., США) в течение 2 часов при силе тока 0.5 А и напряжении 25 В. Для переноса использовали коммерческий буфер Bio-rad (Bio-rad Laboratories Ltd., США).

После переноса белка на нитроцеллюлозную мембрану, её блокировали 5% сухим обезжиренным козьим молоком, разведенном в TBS-T буфере (Tris Bufferd

Saline с 0,1% Tween 20, Santa Cruz, США), в течение часа при комнатной температуре. Затем для иммунодетекции использовали следующие первичные антитела: поликлональные кроличьи анти-5-HT_{1A} рецептор (56 кДа, разбавление 1:1000; Abcam ab85615, Abcam, Великобритания), моноклональные кроличьи анти-5-HT₇ рецептор (54 кДа, разбавление 1:500; abcam ab128892, Abcam, Великобритания), моноклональные анти-GAPDH, конъюгированные с пероксидазой хрена (37 кДа, разбавление 1:500; sc-47724; Santa Cruz Biotechnology Inc., США) при 4°C на ночь и вторичные козы анти-кролик IgG-HRP (разбавление 1:10000; sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc., США). Отмывали мембрану 5×5 мин буфером TBS-T, добавляли вторичные козы поликлональные антитела IgG-HRP, направленные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:10000 для 5-HT_{1A} и 1:15000 для 5-HT₇, sc-2004, Santa Cruz, США), и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Повторяли отмывку мембраны. Связанные антитела визуализировались с помощью ECL набора Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, США), в соответствии с инструкцией производителя, и гельдокументирующей системы C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, США). Полученное изображение денситометрировали и количественно оценивали содержание белка при помощи программы *ImageStudio*. Экспрессию белка нормировали на экспрессию GAPDH, которая конститутивна для мозга, и выражали в относительных единицах по отношению к контрольной группе.

2.11. Статистический анализ и представление данных

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.1.0 для Windows. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0.05$. Результаты представлены в виде скрипичных диаграмм с медианой (сплошная линия), межквартильным размахом (пунктирные линии) и максимальным и минимальным значением выборки.

Двусторонний t-критерий Стьюдента применялся для определения статистического различия между двумя группами. ANCOVA применялась для

оценки зависимости подвижности в тесте «принудительное плавание» от повышенной двигательной активности в тесте «открытое поле», если оба теста выявляли достоверное различие (для эксперимента с ASC/Isq).

Распределение данных контролировалось на нормальность с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для поиска и исключения выбросов из анализа использовался тест Диксона, который указывал на один или, максимум, два выброса в каждом случае (для проверки, является ли минимальное значение выбросом, максимальное значение выбросом, либо минимальное или максимальное значение выбросами).

Уровень экспрессии гена *Htr7* представлен в логарифмической шкале. Для уровней мРНК экспрессия гена представлена как количество копий кДНК по отношению к 100 копиям кДНК гена *rPolIII*. Для уровней белка экспериментальная группа представлена в виде процента от контрольной группы, которая установлена на уровне 100.

Глава 3. Результаты

3.1. Оценка работоспособности AAV_Syn_HTR7-EGFP и AAV_Syn_EGFP векторных конструкций

В предварительном эксперименте работа вирусного конструкта AAV_Syn_HTR7-EGFP была проверена в первичной культуре гиппокампальных клеток мыши. На микрофотографиях отчетливо видно накопление флюоресцентного белка EGFP в телах нейронов, что показывает экспрессию целевой плазмиды в нейрональных клетках. (Рис. 14).

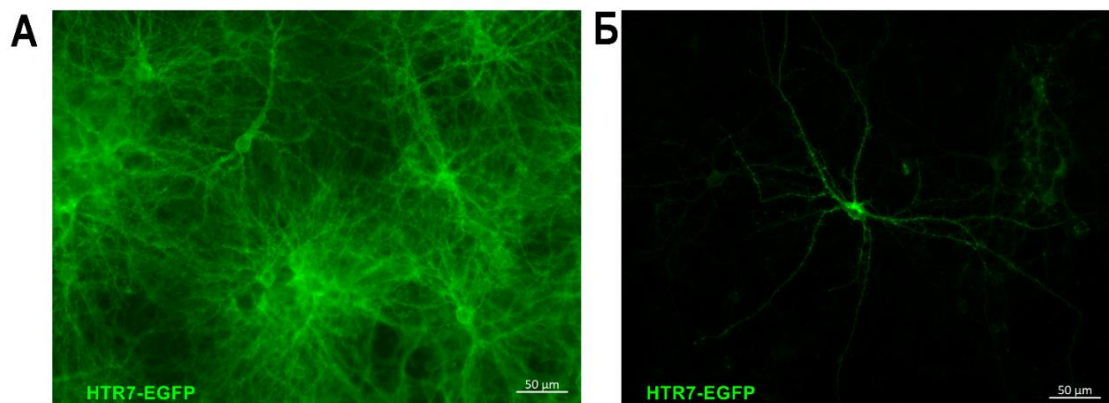


Рисунок 14. Микрофотографии плотно (А) и слабо (Б) засаженной первичной культуры гиппокампальных клеток мыши, обработанных AAV_Syn_HTR7-EGFP.

Место введения вирусного конструкта *in vivo* подтверждено микроскопией. В первую очередь была показана экспрессия плазмиды AAV_Syn_EGFP, которая вводилась мышам контрольной группы. На микрофотографиях можно наблюдать свечение зеленого флюоресцентного белка EGFP. Для подтверждения экспрессии плазмиды в серотониновых нейронах ядра дорсального шва вместе со всеми нейронами в месте инъекции было проведено иммуногистохимическое исследование, включающее окрашивание серотониновых нейронов антителами против ТПГ-2 (Рис. 15).

Затем была показана экспрессия плазмиды AAV_Syn_5-HTR7-EGFP, которая вводилась мышам опытной группы. На микрофотографиях срезов головного мозга мышей линии C57Bl/6J можно наблюдать флюоресценцию

рецептора 5-HT₇, связанного с EGFP, в области среднего мозга (Рис. 16). Также было подтверждено наличие серотониновых нейронов среди трансфицированных плазмидой AAV_Syn_5-HT₇-EGFP (Рис. 17 и 18).

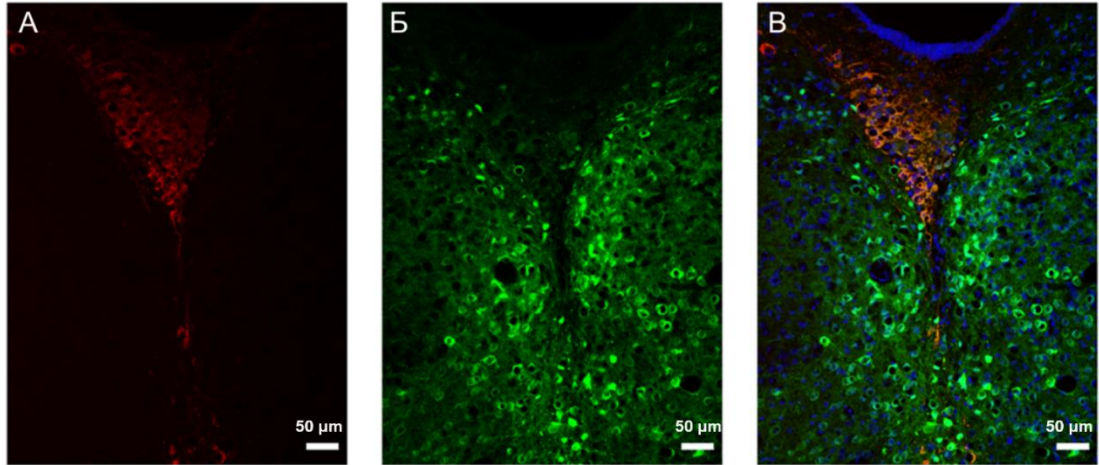


Рисунок 15. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области среднего мозга после инъекции AAV_Syn_EGFP. А) серотониновые нейроны, окрашенные антителами против ТПП-2; Б) зеленый флуоресцентный белок EGFP; В) Hoechst 33258 + 5-HT₇-EGFP + ТПП-2. Размер шкалы А, Б, В = 50 мкм

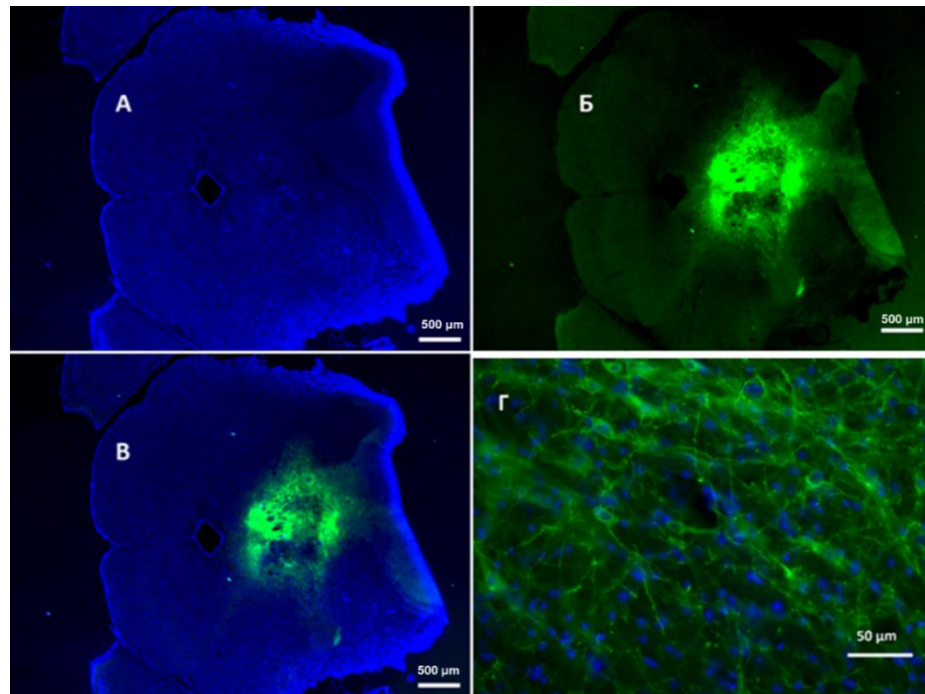


Рисунок 16. Микрофотографии срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области ядер шва среднего мозга после инъекции AAV_Syn_HTR7-EGFP. А) окраска ядер красителем Hoechst 33258; Б) 5-HT₇ рецептор меченый EGFP; В) Hoechst 33258+ 5-HT₇-EGFP, размер шкалы А, Б, В = 500 мкм; Г) увеличенное изображение, Hoechst 33258+ 5-HT₇-EGFP, размер шкалы = 50 мкм.

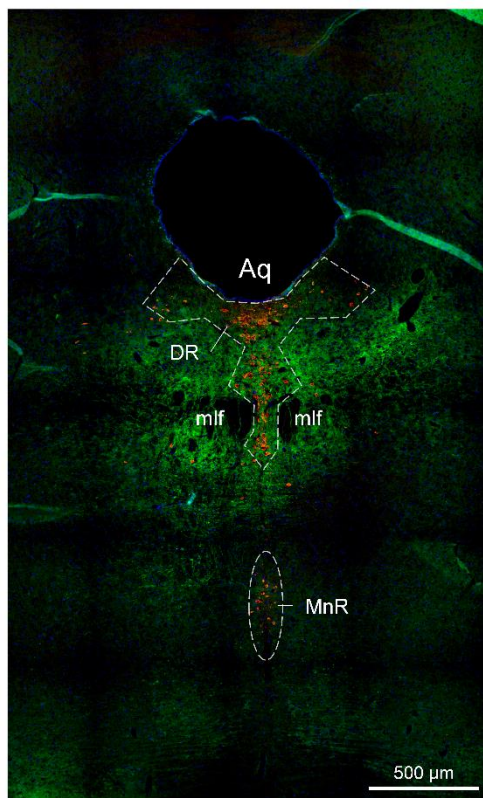


Рисунок 17. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области ядер шва среднего мозга после инъекции AAV_Syn_HTR7-EGFP, совмещенное крупное изображение, Hoechst 33258 + 5-HT7-EGFP + ТПГ-2. Размер шкалы = 500 мкм.

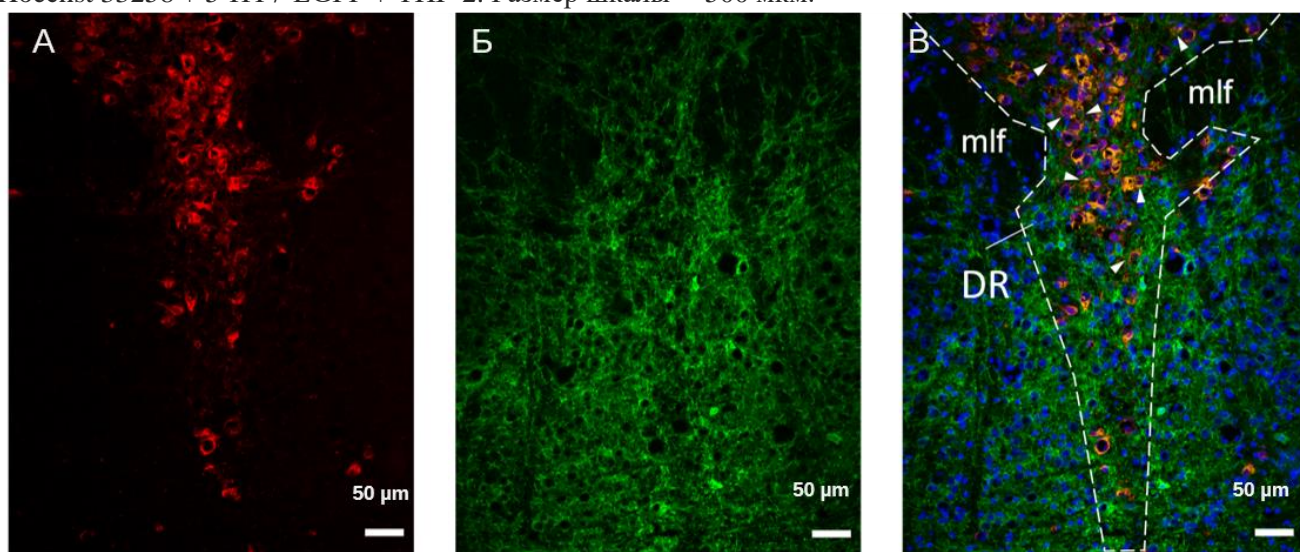


Рисунок 18. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области ядер шва среднего мозга после инъекции AAV_Syn_HTR7-EGFP. А) серотониновые нейроны, окрашенные антителами против ТПГ-2; Б) зеленый флуоресцентный белок EGFP; В) Hoechst 33258 + 5-HT7-EGFP + ТПГ-2, стрелками отмечены нейроны с двойным окрашиванием + 5-HT7-EGFP + ТПГ-2. Размер шкалы А, Б, В = 50 мкм

На микрофотографиях срезов головного мозга мышей линии C57Bl/6J можно наблюдать свечение зеленого флуоресцентного белка EGFP (плазида AAV_Syn_EGFP) (Рис. 19А) и флуоресценцию рецептора 5-HT₇, связанного с

EGFP (плазмида AAV_Syn_5-HTR7-EGFP), в области фронтальной коры после инъекции генетического конструкта в данную структуру мозга (Рис. 19Б).

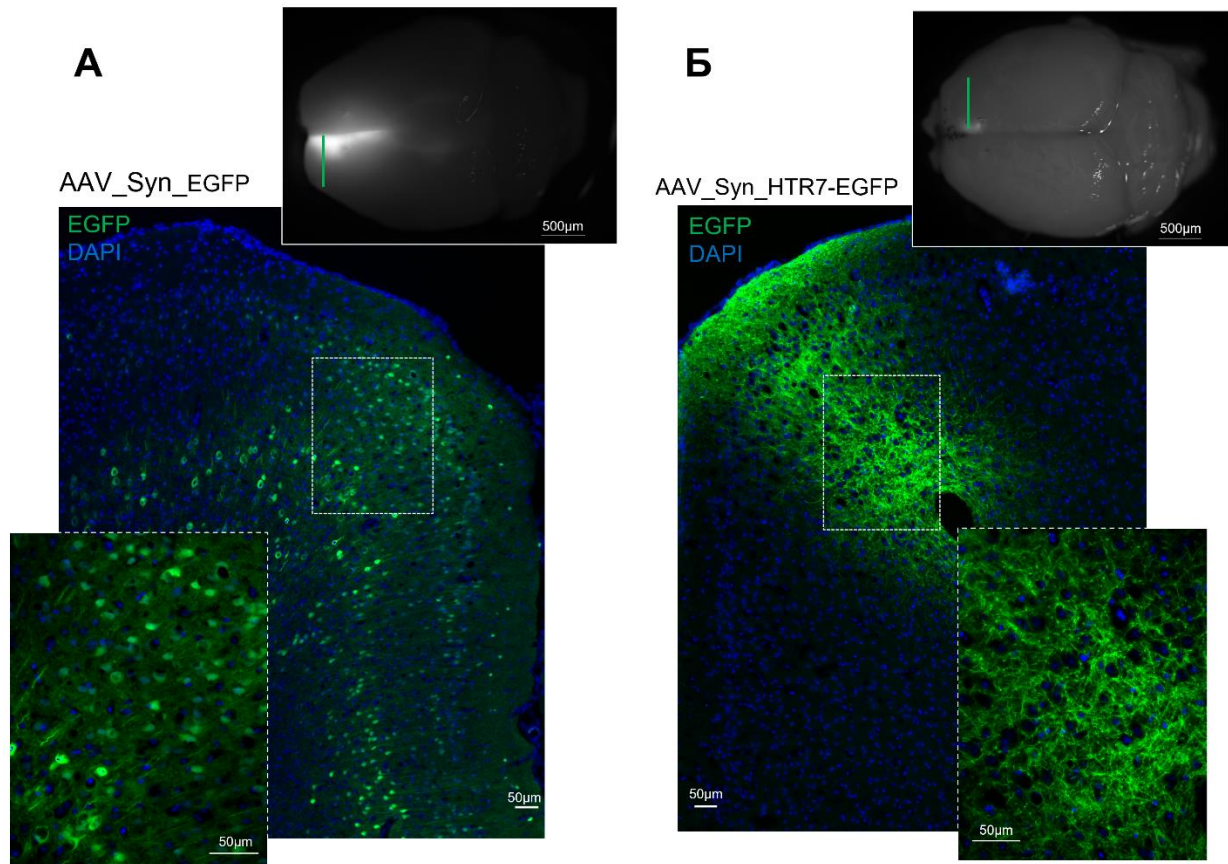


Рисунок 19. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области фронтальной коры после инъекции А) AAV_Syn_EGFP и Б) AAV_Syn_HTR7-EGFP. Окраска ядер красителем Hoechst 33258 и зеленый флюоресцентный белок EGFP.

3.2. Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге у мышей линии C57Bl/6J

3.2.1. Поведенческие тесты

Введение AAV_Syn_HTR₇-EGFP в область ядер шва среднего мозга привело к увеличению подвижности ($t_{11}=3.037$, $p<0.05$) и снижению неподвижности ($t_{11}=2.526$, $p<0.05$) опытной группы (5-НТ₇-EGFP) в тесте «принудительное плавание» по сравнению с контрольными животными. При этом различий в пройденном пути ($t_{12}=1.648$, $p>0.05$) и доле времени, проведенного в центре арены ($t_{12}=1.469$, $p>0.05$), в тесте «открытое поле» не обнаружено (Рис. 20).

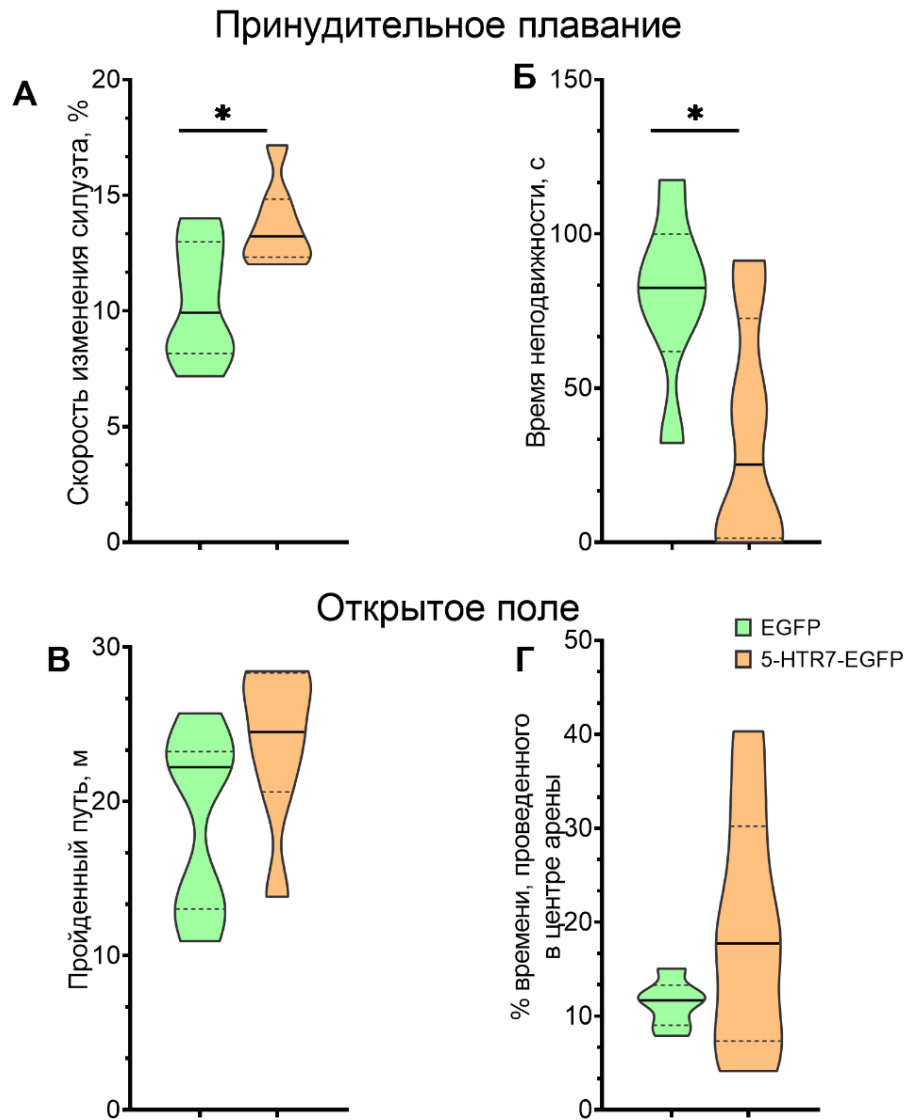


Рисунок 20. Подвижность (А) и время неподвижности (Б) животных в тесте «принудительное плавание»; локомоторная (В) и исследовательская (Г) активность животных в тесте «открытое поле» * $p < 0.05$.

3.2.1. Уровень мРНК и белка

У мышей опытной группы уровень мРНК 5-НТ₇ рецептора был значительно повышен в среднем мозге ($t_{10}=3.602$, $p < 0.01$) и фронтальной коре ($t_{11}=2.663$, $p < 0.05$) по сравнению с контрольными животными, в отличие от гиппокампа, где не было обнаружено никаких эффектов на экспрессию *Htr7* ($t_{11}=1.861$, $p > 0.05$). Вирусный конструкт вызвал сверхэкспрессию мРНК 5-НТ₇ рецептора почти в 100 раз по сравнению с контролем (Рис. 21А). Искусственный белок 5-НТ₇ рецептора был обнаружен в среднем мозге благодаря антителам против EGFP, которые детектируют EGFP метку на химерном белке 5-НТ₇-EGFP с массой 79 кДа (Рис. 21Б). Обнаружить рецептор на этом молекулярном весе с помощью широкого

диапазона антител против 5-HT₇ рецептора не удалось ($t_{10}=1.395$, $p>0.05$ для среднего мозга; $t_{10}=0.853$, $p>0.05$ для фронтальной коры; $t_9=0.157$, $p>0.05$ для гиппокампа). Нами были протестированы антитела 4 разных производителей, а Демирева Е. Ю. с коллегами [Demireva et al., 2019] протестировали 10 коммерчески доступных антител к 5-HT₇ рецептору, чтобы подтвердить отсутствие этого рецептора у созданных ими крыс с нокаутом 5-HT₇^(-/-) и ни одно из антител не выявило потерю сигнала в тканях по 5-HT₇ рецептору. Таким образом, детекция химерного белка 5-HT₇-EGFP с помощью антител против белка EGFP стала единственным технически возможным подтверждением сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора в мозге мышей экспериментальной группы.

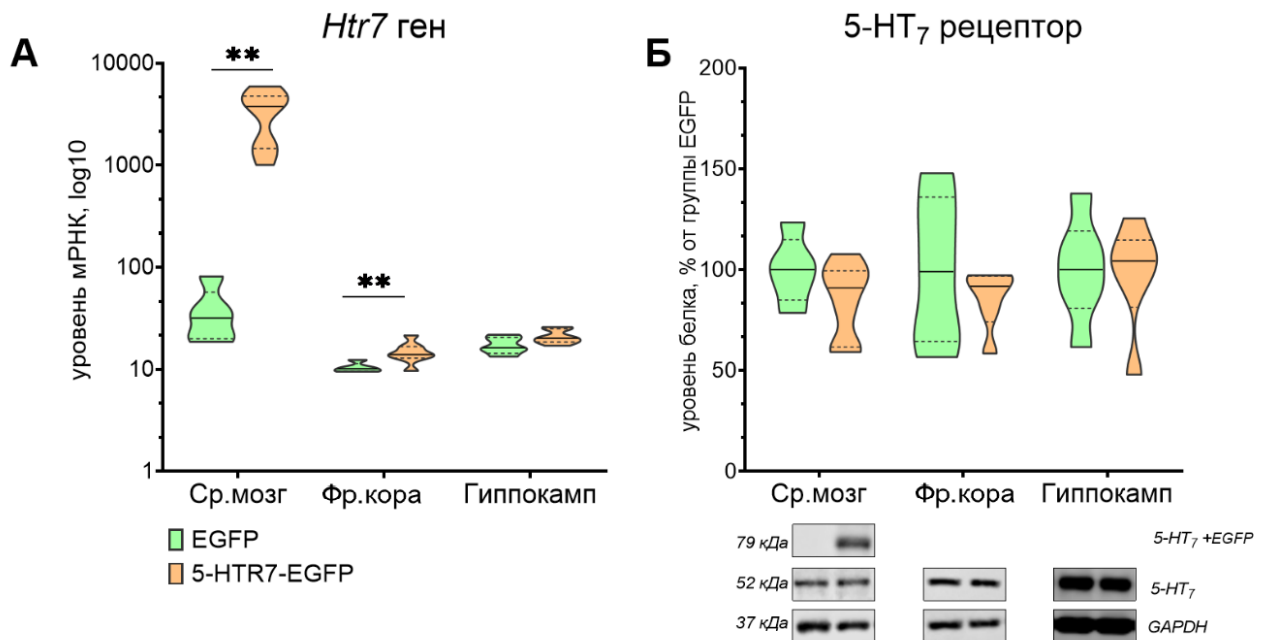


Рисунок 21. (А) Уровень мРНК гена 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе, логарифмическая шкала; (Б) Уровень белка 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. ** $p<0.01$.

Уровень мРНК 5-HT_{1A} рецептора был снижен во фронтальной коре ($t_{11}=3.355$, $p<0.01$) (Рис. 22А). В то же время уровень белка был достоверно снижен в среднем мозге ($t_9=2.242$, $p=0.051$) (Рис. 22Б). Уровень мРНК гена *Htr1a* в среднем мозге ($t_{11}=0.497$, $p>0.05$) и в гиппокампе ($t_9=2.048$, $p>0.05$), а также уровень белка 5-HT_{1A} рецептора в гиппокампе ($t_{10}=0.789$, $p>0.05$) и фронтальной коре ($t_8=0.579$, $p>0.05$) не изменились.

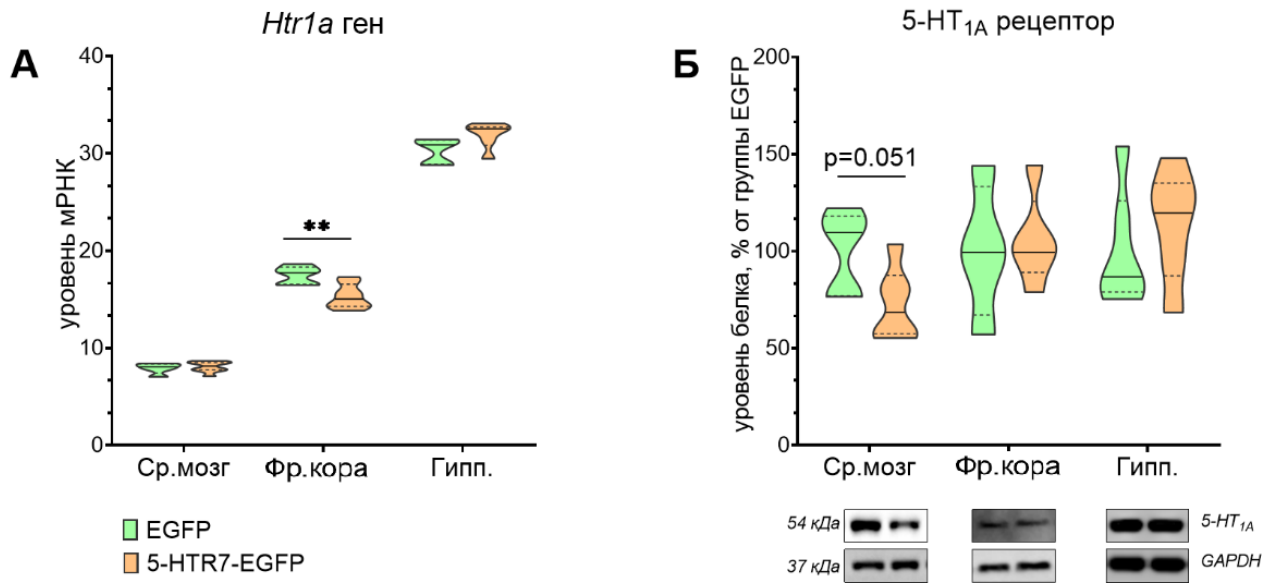


Рисунок 22. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ_{1А} рецептора и (Б) уровень белка 5-НТ_{1А} рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. ** $p < 0.01$.

Никаких достоверных различий не было найдено в уровнях мРНК (Рис. 23А) ТПГ-2 ($t_{11}=0.992$, $p > 0.05$) и 5-НТТ ($t_{11}=0.652$, $p > 0.05$) и белка ($t_{11}=0.296$, $p > 0.05$ и $t_{11}=0.802$, $p > 0.05$, соответственно) (Рис. 23Б) в среднем мозге.

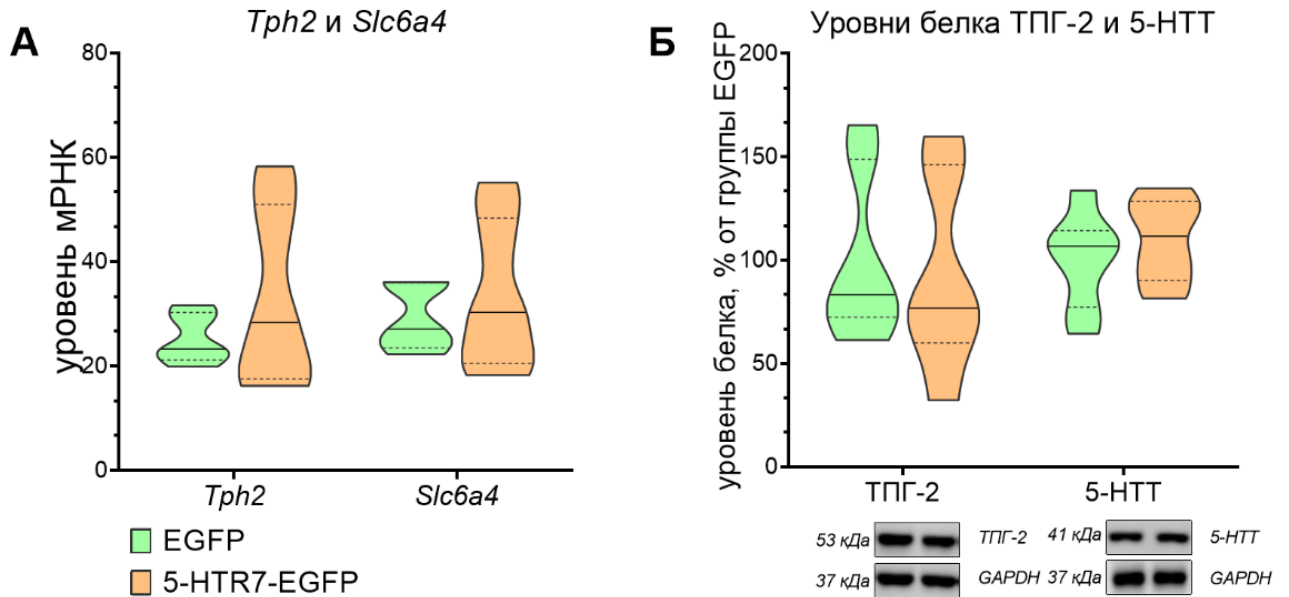


Рисунок 23. (а) Уровни мРНК генов *Trh2* и *Slc6a4*, и (Б) уровни белка ТПГ-2 и 5-НТТ в среднем мозге.

3.2.1. Уровень и обмен серотонина

Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге значительно повысила коэффициент метаболизма 5-НТ в среднем мозге ($t_{16}=2.508$, $p < 0.05$). При этом

достоверных различий по 5-НТ ($t_{16}=1.282$, $p>0.05$) и его метаболиту 5-ГИУК ($t_{16}=0.432$, $p>0.05$) найдено не было (Рис. 24).

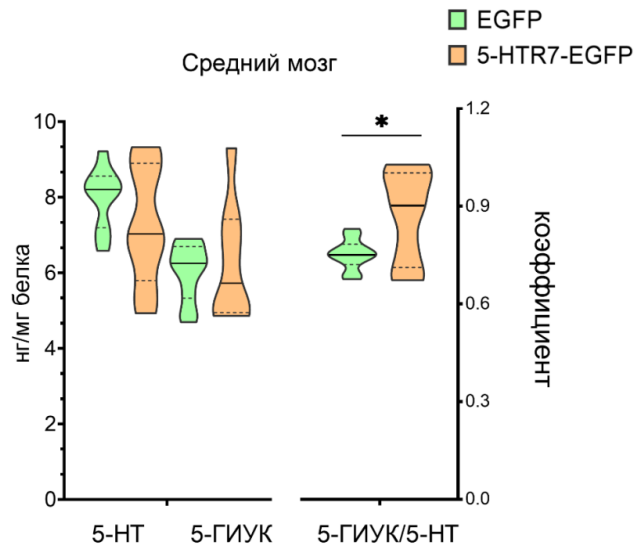


Рисунок 24. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в среднем мозге. * $p<0.05$.

Во фронтальной коре коэффициент метаболизма серотонина также был повышен на фоне сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецептора ($t_{16}=2.89$, $p<0.01$), уровень 5-НТ достоверно снизился ($t_{16}=2.480$, $p<0.05$), а уровень 5-ГИУК остался без изменений ($t_{16}=0.516$, $p>0.05$) (Рис. 25).

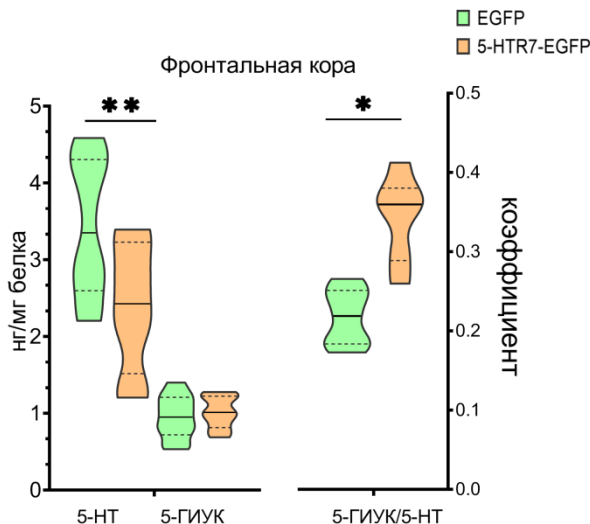


Рисунок 25. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ во фронтальной коре. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

В гиппокампе на фоне сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге никаких изменений ни по 5-НТ ($t_{16}=0.632$, $p>0.05$), ни по 5-ГИУК ($t_{16}=0.904$,

$p > 0.05$), ни по их соотношению 5-ГИУК/5-НТ ($t_{16} = 1.746$, $p > 0.05$) выявлено не было (Рис. 26).

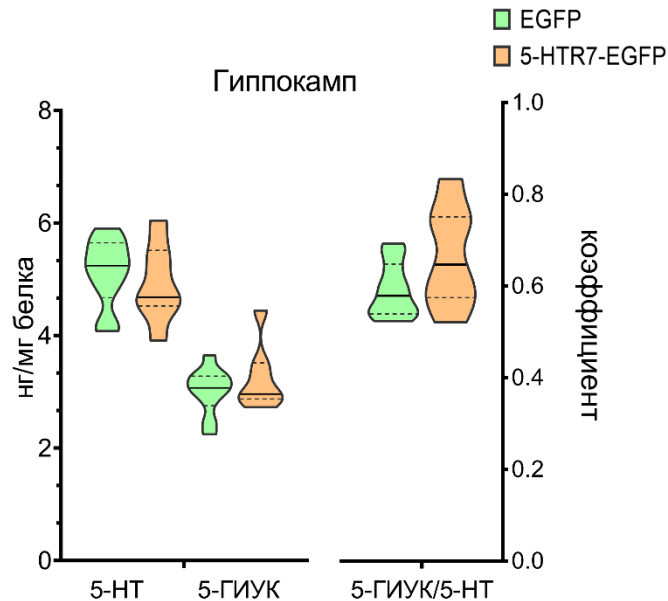


Рисунок 26. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе.

3.3. Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге у мышей линии ASC/Is_g

3.3.1. Поведенческие тесты

В тесте «принудительное плавание» введение AAV_Syn_HTR7-EGFP в средний мозг достоверно повысило подвижность ($t_{16} = 2.317$, $p < 0.05$) (Рис. 27А) и снизило время неподвижности ($t_{17} = 3.709$, $p < 0.01$) (Рис. 27Б) мышей линии ASC/Is_g. Пройденный путь, отражающий локомоторную активность, в тесте «открытое поле» также значительно увеличился у опытной группы по сравнению с контрольными животными ($t_{16} = 2.464$, $p < 0.05$) (Рис. 27В), а доля времени, проведенного в центре не изменилась ($t_{17} < 1$) (Рис. 27Г). Чтобы понять, влияет ли повышенная локомоторная активность в тесте «открытое поле» на повышенную подвижность в тесте «принудительное плавание», был применен ковариационный анализ, где в качестве ковариаты был установлен пройденный путь. В таком случае опытные мыши все еще демонстрируют достоверно повышенный уровень подвижности в тесте «принудительное плавание» по сравнению с контрольными животными ($F_{1,14} = 5.678$, $p < 0.05$).

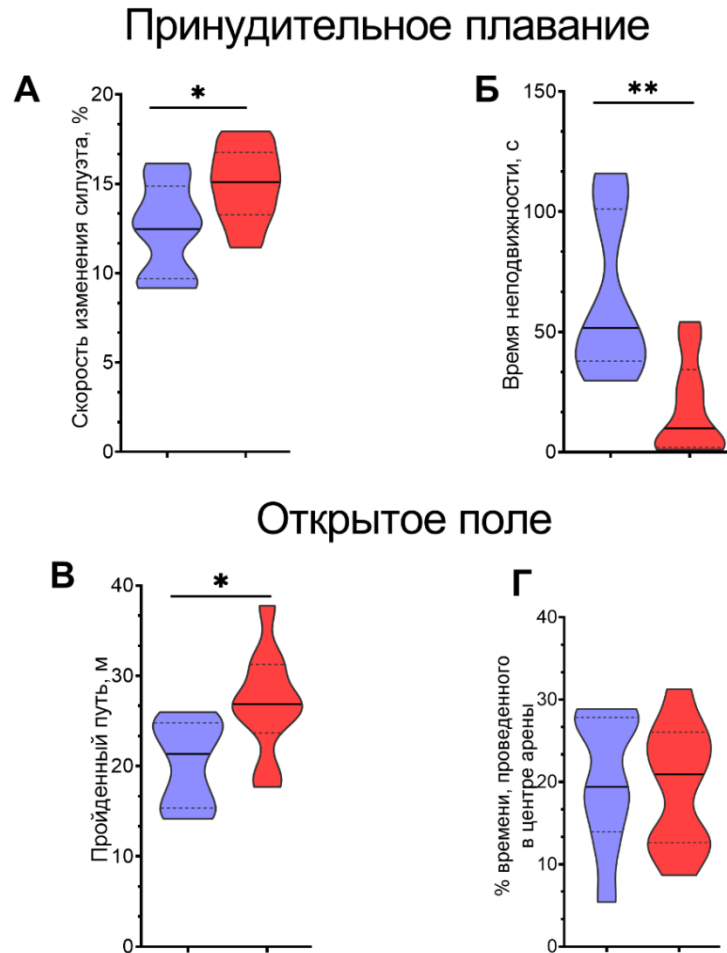


Рисунок 27. Подвижность (А) и время неподвижности (Б) животных в тесте «принудительное плавание»; локомоторная (В) и исследовательская (Г) активность животных в тесте «открытое поле» у мышей линии ASC/Icg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3.2. Уровни мРНК и белка

Уровень мРНК 5-НТ₇ рецептора значительно повысился в среднем мозге ($t_{10}=3.601$, $p < 0.01$) и снизился в гиппокампе ($t_{15}=2.461$, $p < 0.05$), в то время как никаких изменений во фронтальной коре не было обнаружено ($t_{13}=0.137$, $p > 0.05$) на фоне введения AAV_Syn_HTR7-EGFP в средний мозг мышей ASC/Icg (Рис. 28А). Как и в случае с мышами C57Bl/6J, наличие искусственного 5-НТ₇ рецептора было показано с помощью антител против EGFP, в то время как антитела против 5-НТ₇ не выявили никаких различий в среднем мозге ($t_{14}=0.013$, $p > 0.05$), фронтальной коре ($t_{10}=0.422$, $p > 0.05$), и гиппокампе ($t_{10}=0.216$, $p > 0.05$) (Рис. 28Б).

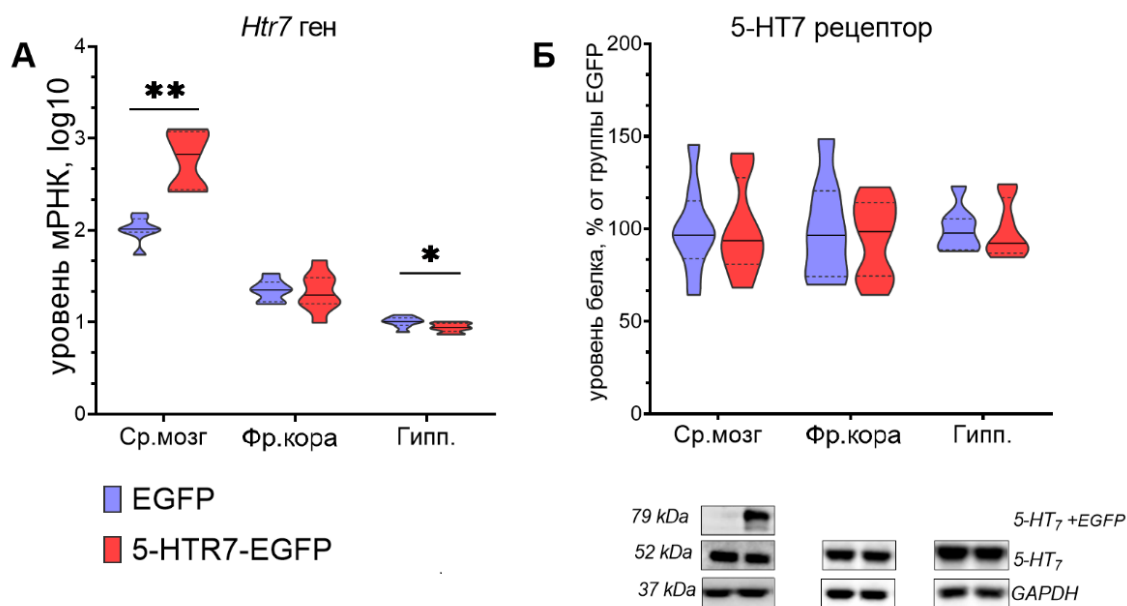


Рисунок 28. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе, логарифмическая шкала; (Б) Уровень белка 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

У экспериментальных животных уровень мРНК 5-НТ_{1A} рецептора был снижен в гиппокампе ($t_{15}=2.189$, $p < 0.05$), а в среднем мозге ($t_{10}=1.321$, $p > 0.05$) и фронтальной коре ($t_{13}=0.352$, $p > 0.05$) различий найдено не было (Рис. 29А). Уровень белка 5-НТ_{1A} рецептора остался без изменений в среднем мозге ($t_{12}=0.511$, $p > 0.05$), фронтальной коре ($t_{12}=1.457$, $p > 0.05$) и гиппокампе ($t_{11}=0.789$, $p > 0.05$) (Рис. 29Б).

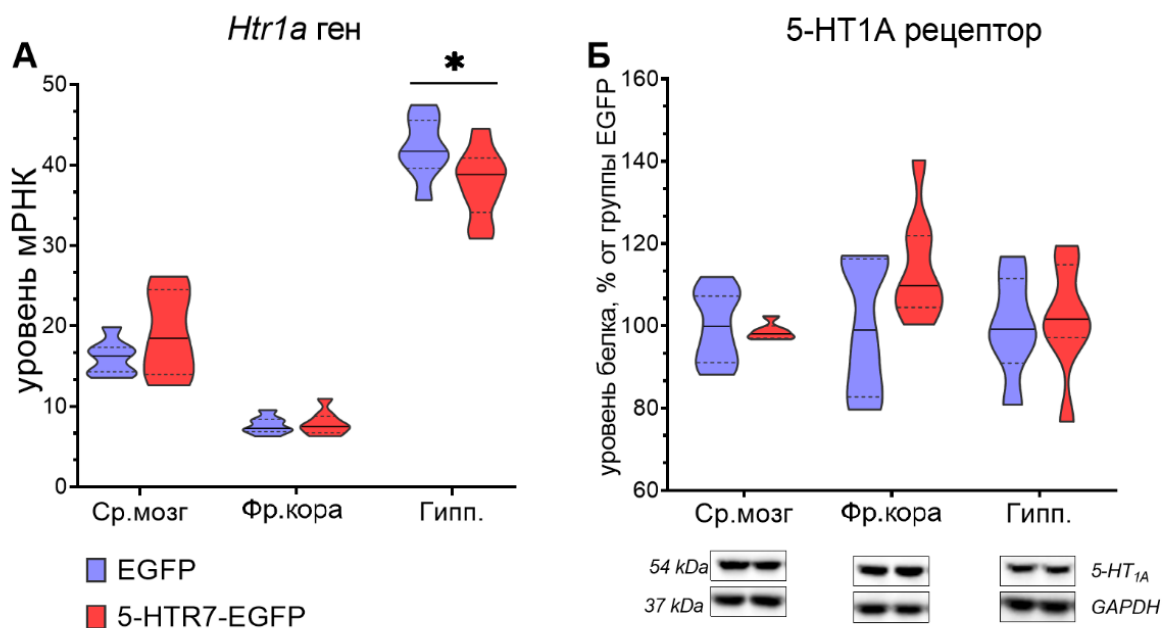


Рисунок 29. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ_{1A} рецептора и (Б) уровень белка 5-НТ_{1A} рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе мышей линии ASC/Icg. * $p < 0.05$.

Также никаких различий по уровням мРНК (Рис. 30А) генов *Tph2* ($t_{10}=1.106$, $p>0.05$) и *Slc6a4* ($t_{10}=0.58$, $p>0.05$) и уровням белков (Рис. 30Б) ТПГ-2 ($t_{12}=0.212$, $p>0.05$) и 5-НТТ ($t_{14}=0.379$, $p>0.05$) в среднем мозге найдено не было.

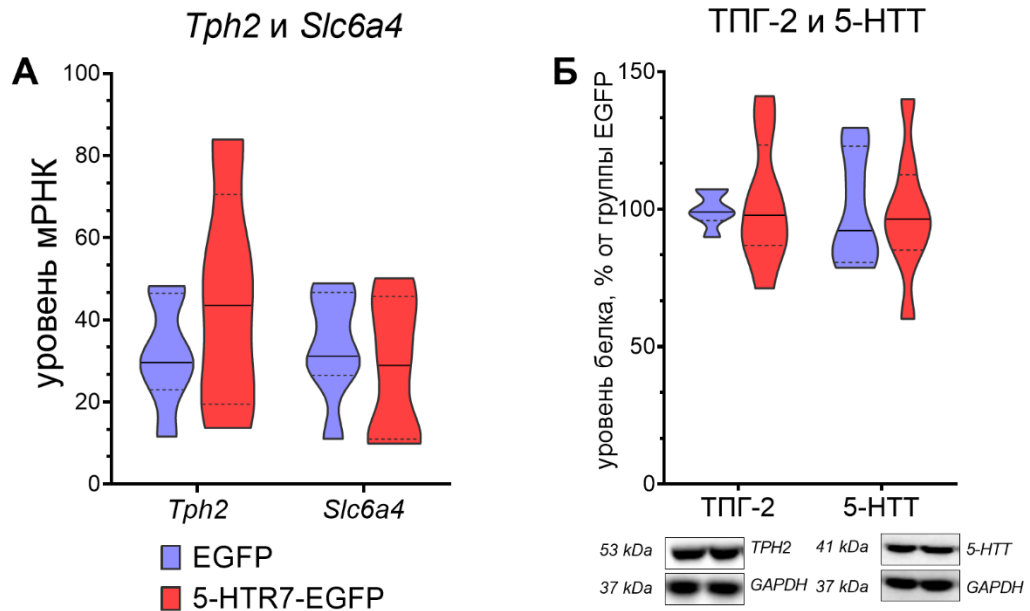


Рисунок 30. (А) Уровни мРНК генов *Tph2* и *Slc6a4* и (Б) уровни белка ТПГ-2 и 5-НТТ в среднем мозге.

3.2.1. Уровень и обмен серотонина

Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге значительно повысила коэффициент метаболизма 5-НТ в среднем мозге ($t_{13}=4.317$, $p<0.001$), хотя никаких различий по 5-НТ ($t_{15}=1.193$, $p>0.05$), и его метаболиту 5-ГИУК ($t_{15}=1.921$, $p>0.05$) не было обнаружено (Рис. 31).

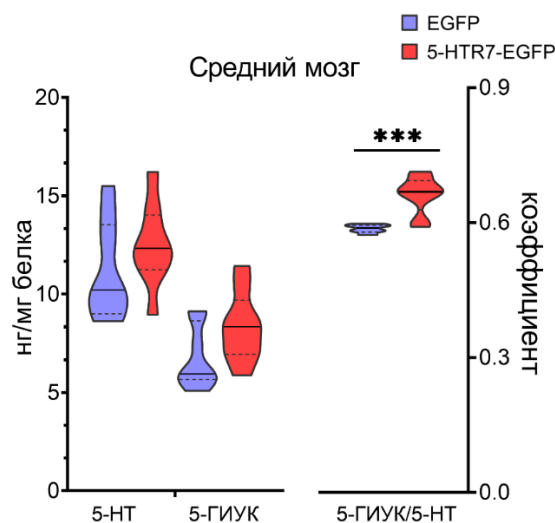


Рисунок 31. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в среднем мозге. *** $p<0.001$.

Во фронтальной коре коэффициент метаболизма серотонина также был повышен на фоне сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора ($t_{14}=2.105$, $p=0.052$), уровень 5-HT достоверно не изменился ($t_{14}=0.769$, $p>0.05$), а уровень 5-ГИУК повысился ($t_{15}=2.594$, $p<0.05$) (Рис. 32).

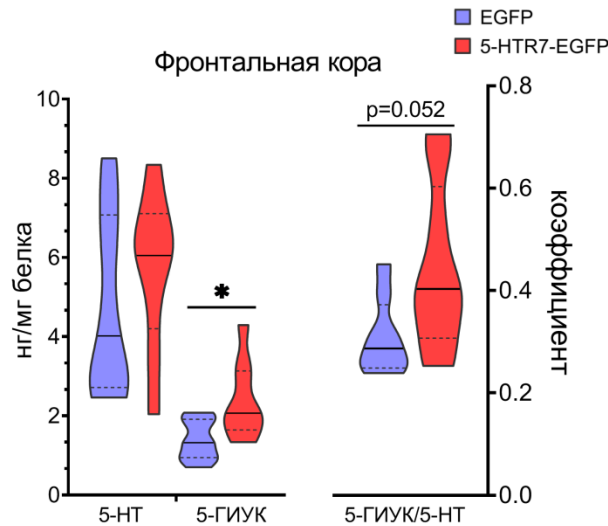


Рисунок 32. Уровень 5-HT, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-HT во фронтальной коре. * $p<0.05$.

В гиппокампе на фоне сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора в среднем мозге также повысился коэффициент метаболизма 5-HT ($t_{15}=3.758$, $p<0.01$), уровень 5-HT достоверно не изменился ($t_{14}=0.769$, $p>0.05$), а уровень 5-ГИУК повысился ($t_{15}=4.273$, $p<0.001$) (Рис. 33).

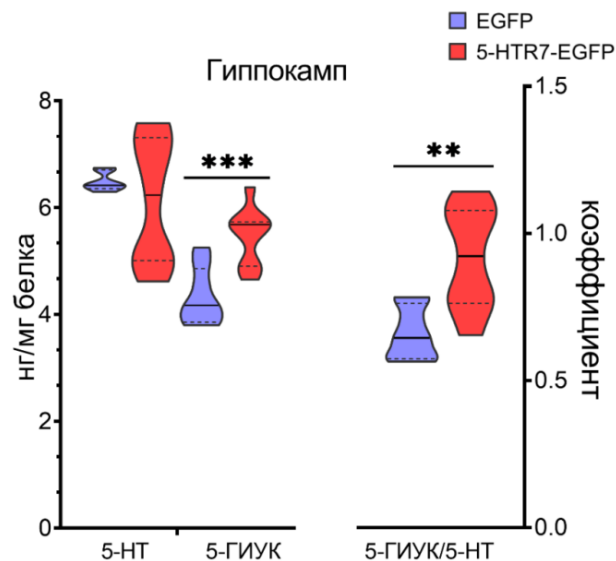


Рисунок 33. Уровень 5-HT, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-HT в гиппокампе. * $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.4. Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре у мышей линии C57Bl/6J

3.4.1. Поведенческие тесты

Введение AAV_Syn_HTR7-EGFP в область фронтальной коры у мышей из группы 5-HT7-EGFP в тесте «принудительное плавание» привело к достоверному снижению подвижности ($t_{17}=3.957$, $p<0.01$) (Рис. 34А), в то время как время неподвижности мышей не изменилось ($t_{18}=1.003$, $p>0.05$) по сравнению с контрольными животными (Рис. 34Б). При этом различий в пройденном пути ($t_{18}=0.846$, $p>0.05$) и доле времени, проведенного в центре арены ($t_{18}=1.066$, $p>0.05$), в тесте «открытое поле» не обнаружено (Рис. 34В,Г).

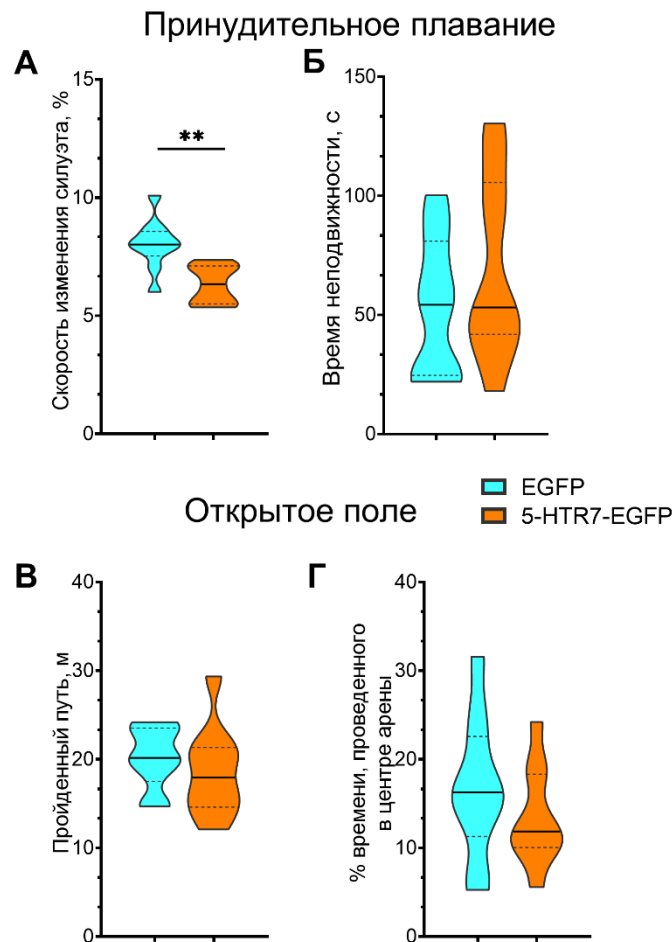


Рисунок 34. Подвижность (А) и время неподвижности (Б) животных в тесте «принудительное плавание»; локомоторная (В) и исследовательская (Г) активность животных в тесте «открытое поле». ** $p<0.01$.

3.4.2. Уровни мРНК и белка

На фоне введения AAV_Syn_HTR7-EGFP во фронтальную кору мышей C57Bl6/J уровень мРНК гена 5-HT₇ рецептора значительно повысился во фронтальной коре ($t_{16}=3.398$, $p<0.01$), в то время как никаких изменений в среднем мозге и гиппокампе не было обнаружено ($t_{17}=0.465$, $p>0.05$) (Рис. 35А). Как и в случае с двумя предыдущими сериями экспериментов, наличие искусственного 5-HT₇ рецептора было показано с помощью антител против EGFP, в то время как антитела против 5-HT₇ не выявили никаких различий в среднем мозге ($t_{16}=0.078$, $p>0.05$), фронтальной коре ($t_{16}=0.054$, $p>0.05$), и гиппокампе ($t_{16}=0.128$, $p>0.05$) (Рис. 35).

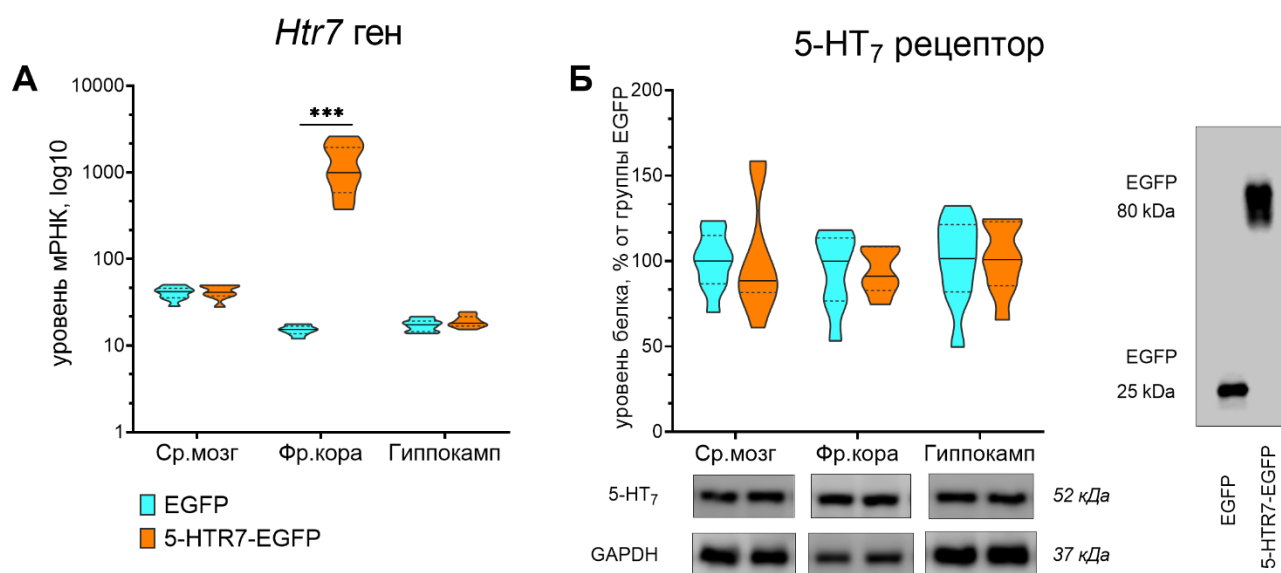


Рисунок 35. (А) Уровень мРНК гена 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе, логарифмическая шкала; (Б) Уровень белка 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе и хемилюминесцентный сигнал EGFP во фронтальной коре. ** $p<0.01$.

Не было обнаружено достоверных различий по уровню мРНК 5-HT_{1A} рецептора фронтальной коре ($t_{17}=0.043$, $p>0.05$), в среднем мозге ($t_{17}=0.707$, $p>0.05$) и гиппокампе ($t_{17}=0.622$, $p>0.05$) (Рис. 35А). Уровень белка 5-HT_{1A} рецептора также остался без изменений в среднем мозге ($t_{15}=0.971$, $p>0.05$), фронтальной коре ($t_{16}=0.897$, $p>0.05$) и гиппокампе ($t_{16}=1.109$, $p>0.05$) (Рис. 35Б).

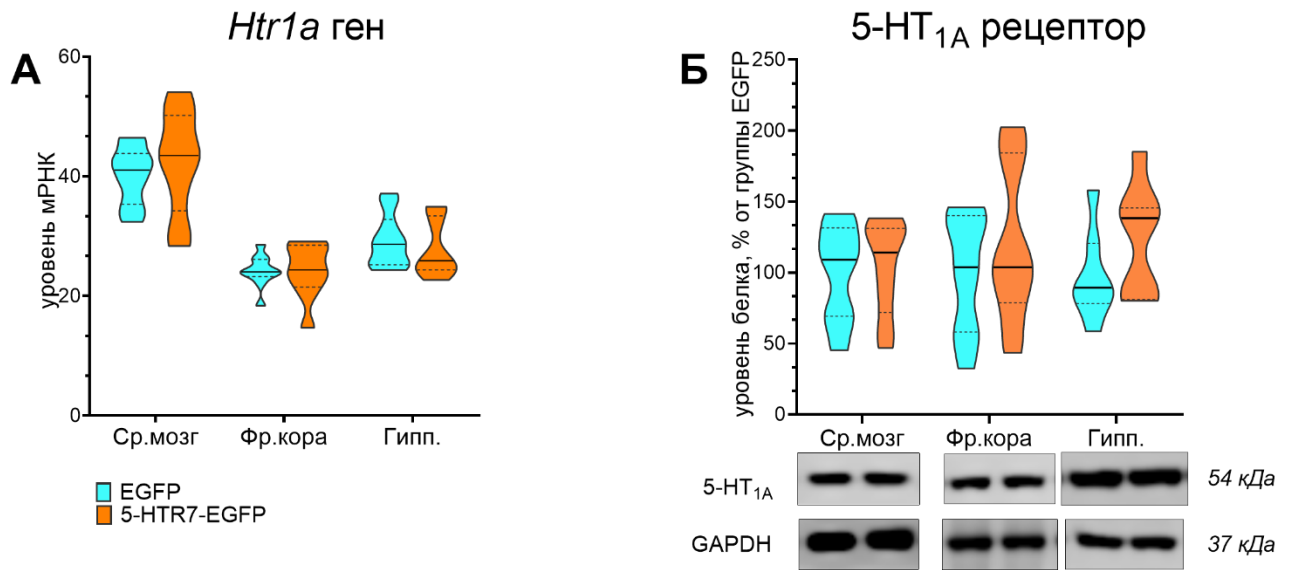


Рисунок 36. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ_{1А} рецептора и (Б) уровень белка 5-НТ_{1А} рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе мышей линии ASC/Iscg.

Также никаких различий по уровням мРНК (Рис. 37А) генов *Trh2* ($t_{17}=0.785$, $p>0.05$) и *Slc6a4* ($t_{17}=0.896$, $p>0.05$) и уровням белков (Рис. 37Б) ТПГ-2 ($t_{15}=1.69$, $p>0.05$) и 5-НТТ ($t_{16}=0.079$, $p>0.05$) в среднем мозге найдено не было.

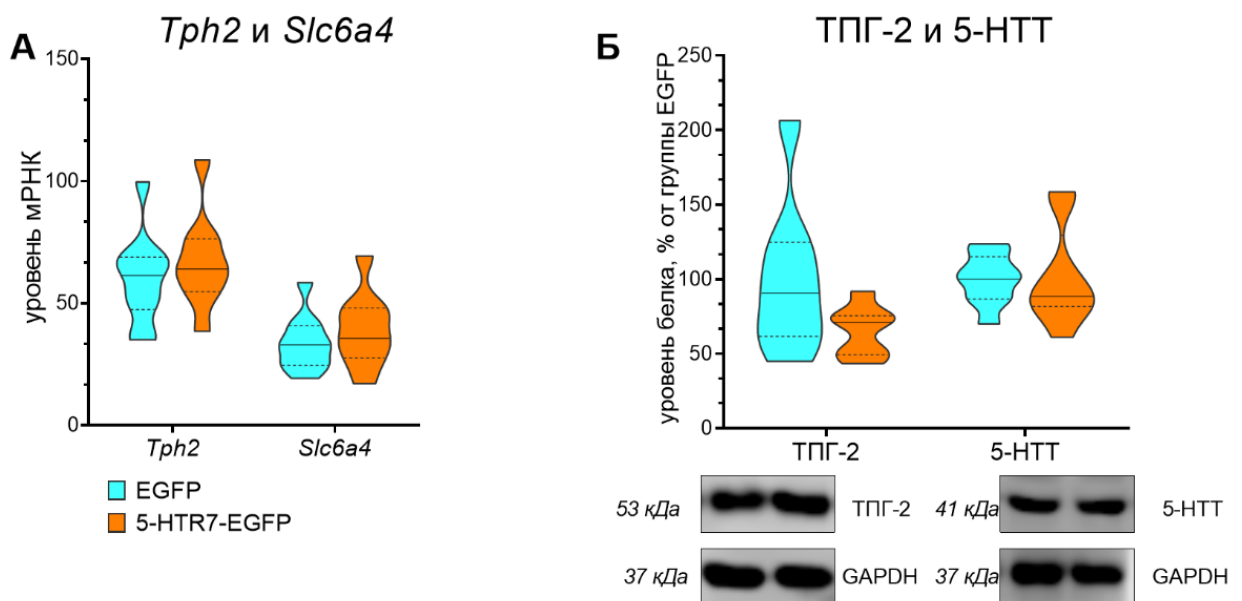


Рисунок 37. (А) Уровни мРНК генов *Trh2* и *Slc6a4* и (Б) Уровни белка ТПГ-2 и 5-НТТ в среднем мозге.

3.4.3. Уровень и обмен серотонина

Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора во фронтальной коре значительно понизила уровень серотонина в среднем мозге ($t_{14}=2.171$, $p<0.05$), хотя никаких различий по коэффициенту метаболизма 5-НТ ($t_{14}=1.577$, $p>0.05$) и его метаболиту 5-ГИУК ($t_{14}=1.577$, $p>0.05$) не было обнаружено (Рис. 38).

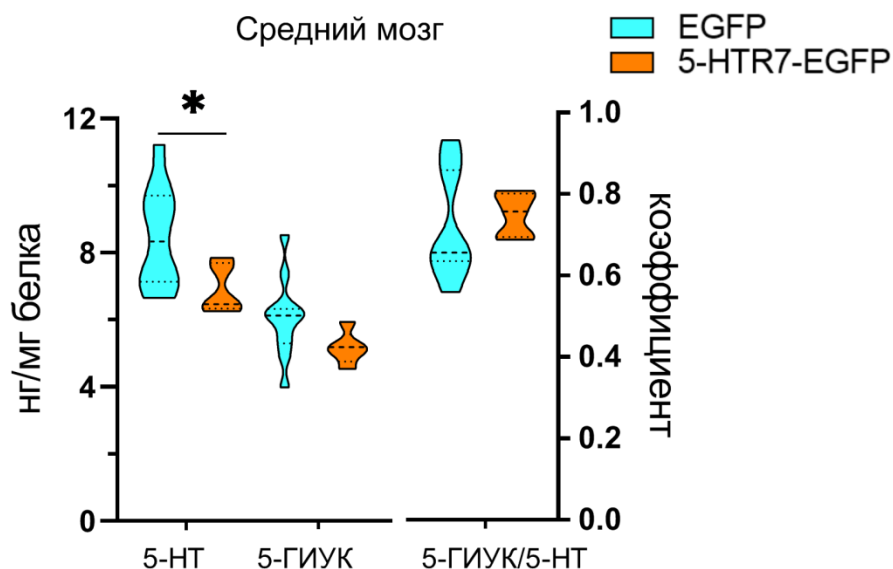


Рисунок 38. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в среднем мозге. *** $p < 0.001$.

Во фронтальной коре коэффициент метаболизма серотонина оказался значительно снижен на фоне сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецептора в этой структуре ($t_{14}=3.421$, $p < 0.01$), уровень 5-НТ значимо повысился ($t_{14}=2.216$, $p < 0.05$), а уровень 5-ГИУК не изменился ($t_{15}=1.173$, $p > 0.05$) (Рис. 39).

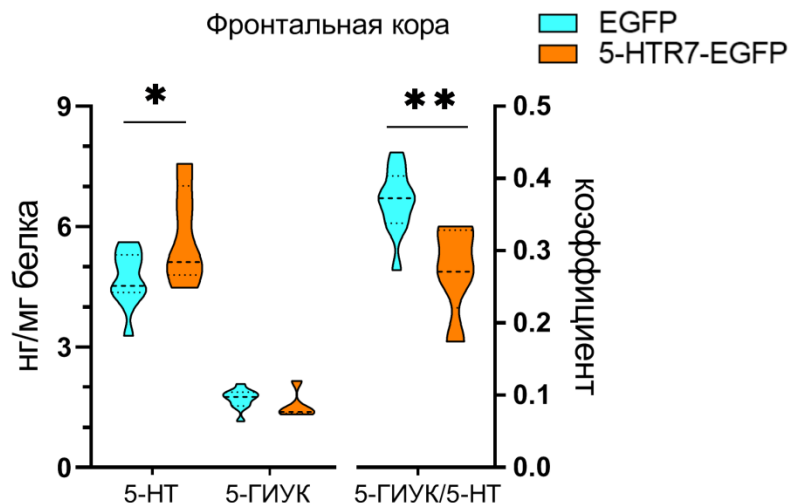


Рисунок 39. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ во фронтальной коре. * $p < 0.05$.

В гиппокампе на фоне сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецептора во фронтальной коре не было найдено значимых изменений по коэффициенту метаболизма 5-НТ ($t_{14}=1.426$, $p > 0.05$), по уровню 5-НТ ($t_{14}=0.897$, $p > 0.05$) и уровню 5-ГИУК ($t_{14}=0.085$, $p > 0.05$) (Рис. 40).

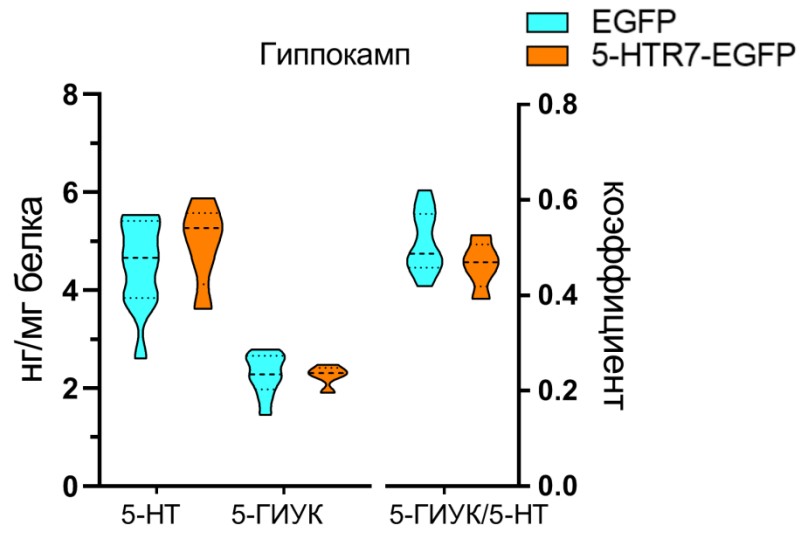


Рисунок 40. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе. * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Глава 4. Обсуждение результатов

5-HT₇ рецептор ранее считался положительно связанным с депрессивным поведением: мыши с нокаутом гена 5-HT₇ рецептора демонстрируют антидепрессивно-подобное поведение [Hedlund et al., 2005], а антагонисты 5-HT₇ рецептора вызывают антидепрессивный эффект [Bonaventure et al., 2012]. Важно уточнить, что, как и нокаут гена 5-HT₇ рецептора, так и воздействие антагониста 5-HT₇ рецептора затрагивают все возможные 5-HT₇ рецепторы организма и их эффект нельзя определить реакцией каких-либо локальных 5-HT₇ рецепторов. В данной работе упор делается именно на эффекте конкретных 5-HT₇ рецепторов определенных структур мозга из-за локального повышения уровня экспрессии гена 5-HT₇ рецепторов как в среднем мозге, так и во фронтальной коре.

Необходимо отметить, что на основе гипотезы об участии гетеродимеров 5-HT_{1A} / 5-HT₇ в механизмах, лежащих в основе депрессии [Naumenko, 2014], мы предполагаем, что изменение соотношения 5-HT_{1A} / 5-HT_{1A} гомо- и 5-HT_{1A} / 5-HT₇ гетеродимеров в сторону 5-HT_{1A} / 5-HT₇ гетеродимеров в пресинаптических окончаниях 5-HT нейронов посредством сверхэкспрессии рецептора 5-HT₇ рецепторов в области среднего мозга может приводить к антидепрессивному эффекту. С другой стороны, непосредственное повышение доли 5-HT_{1A} / 5-HT₇ гетеродимеров на постсинаптических окончаниях должно оказывать обратный эффект и приводить к продепрессивному эффекту. Однако в данной работе гетеродимеризация непосредственно не изучалась.

Нами были проведены три экспериментальные серии. В первой серии были взяты мыши линии C57Bl/6J, которым в область ядер шва вводился AAV_Syn_5HTR7-EGFP. Во второй серии тот же конструкт вводился в ту же область ядер шва, но уже мышам с генетически-детерминированным депрессивно-подобным поведением ASC/Isg. Третья экспериментальная серия включала в себя введение AAV_Syn_5HTR7-EGFP в область фронтальной коры

мышам стандартной линии мышей C57Bl/6J.

В нашей работе было впервые показано, что введение в средний мозг AAV, вызывающих сверхэкспрессию 5-HT₇ рецептора, мышам линии C57Bl/6J, приводило к снижению уровня поведенческого отчаяния, то есть реакции, подобной введению антидепрессантов. У генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей ASC сверхэкспрессия рецептора 5-HT₇ в области ядер шва среднего мозга вызвала как повышение двигательной активности в тесте открытого поля, так и повышение подвижности в тесте принудительного плавания. Ранее было показано, что мыши ASC/лсг демонстрируют сниженную двигательную активность по сравнению с родительскими линиями, что считается одним из признаков депрессивно-подобного поведения [Bazovkina et al., 2005]. Чтобы проверить, влияет ли увеличение локомоторной активности на подвижность, мы провели ковариационный анализ, таким образом показав, что и у мышей ASC/лсг сверхэкспрессия 5-HT₇ рецепторов в среднем мозге, вызвала антидепрессивный эффект. Поведенческие эффекты подтверждаются высказанной ранее гипотезой о роли гетеродимеризации 5-HT_{1A} / 5-HT₇ в регуляции депрессивного поведения.

Наблюдаемые изменения депрессивно-подобного поведения сопровождалась ожидаемой сверхэкспрессией 5-HT₇ рецептора в среднем мозге у обеих исследованных линий. Однако на фоне повышенной экспрессии гена 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, его экспрессия в других структурах также изменилась – повысилась во фронтальной коре мышей C57Bl/6J и снизилась в гиппокампе мышей ASC/лсг, что вероятно, может объясняться генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению у линии ASC/лсг. Вероятно, эффекты оверэкспрессии на другие структуры мозга, в которых плаزمида pAAV_HTR7_EGFP не экспрессировалась, могут быть связаны с нейрональными проекциями и/или взаимодействием различных нейротрансмиттерных систем, но из-за различий в генетическом фоне исследуемых линий мышей эти эффекты не идентичны. В то же время,

конвергенция поведенческих реакций позволяет предположить сходство механизмов, лежащих в основе антидепрессивного эффекта, вызванного как у «недепрессивных», так и у «депрессивных» мышей.

Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре вызывает усиление депрессивно-подобного поведения, что подтверждается понижением подвижности в тесте принудительного плавания по сравнению с контрольной группой. Стоит отметить, что были получены достоверные различия лишь по параметру подвижности животного (скорость изменения силуэта), который рассчитывается автоматически самой программой, в то время как параметр времени неподвижности, регистрируемый вручную не изменился. При этом, как было отмечено выше, в эксперименте со сверхэкспрессией 5-HT₇ рецептора в среднем мозге нам удалось получить достоверные различия, как по времени неподвижности, так и по параметру подвижности животных. Можно предположить, что это связано с тем фактом, что сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре оказывает влияние на 5-HT_{1A} постсинаптические гетерорецепторы, тогда как в области ядер шва задействованы пресинаптические 5-HT_{1A} ауторецепторы. Однако нельзя исключать, что регистрируемый автоматически параметр, возможно, более надежен, чем параметр, субъективно зависимый от оператора.

Имеются данные о локализации 5-HT₇ рецепторов на ГАМК интернейронах, которые при активации снижают высвобождение ГАМК и, следовательно, уменьшают тормозящее действие 5-HT нейронов, увеличивая выброс 5-HT в дорсальные ядра шва [Kusek et al., 2015]. Это замечание особенно важно в контексте данной работы, поскольку при инъекции AAV_Syn_5-HTR7-EGFP в область среднего мозга, сверхэкспрессия 5-HT₇ рецепторов может оказывать антидепрессивное действие через ГАМК-опосредованное усиление активности 5-HT-нейронов, так как нельзя исключать другие возможные механизмы реализации эффектов сверхэкспрессии 5-HT₇ рецепторов на поведение [Rodnyu et al., 2022], поскольку в данной работе не проводился PLA

(Proximity Ligation Assay) анализ и уровень гетеродимеризации рецепторов на клеточной мембране *in vivo* не измерялся.

Наблюдаемые поведенческие эффекты при сверхэкспрессии 5-HT₇ рецепторов в среднем мозге также можно объяснить изменением глутаматергической нейротрансмиссии, которая, как было показано, снижается 5-HT₇ рецепторами в ядрах шва среднего мозга (Duncan, Congleton, 2010). Действительно, рецептор 5-HT₇ ингибирует высвобождение глутамата, что, соответственно, приводит к снижению активности серотонинергических нейронов. В области ядер шва среднего мозга это ведет к ослаблению ингибирующего действия ауторецепторов 5-HT_{1A} на выделение 5-HT.

Традиционные экспериментальные методы, электрофизиология и микродиализ показали, что эффекты 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов на нейротрансмиссию противоположны (5-HT_{1A} рецепторы являются ингибирующими, а 5-HT₇ рецепторы активирующими, что обусловлено различиями в G-белках этих рецепторов), однако эффект 5-HT_{1A} преобладает над эффектом 5-HT₇ [Okubo et al., 2021], что приводит к недостаточному пониманию функции 5-HT₇ в области психонейрофармакологии. Накопление знаний о фармакодинамических профилях 5-HT₇ рецепторов позволяет предположить, что они могут непосредственно являться одним из ключевых игроков на разных стадиях развития мозга, а дисфункция или модуляция активности 5-HT₇ рецепторов связана с патогенезом и патофизиологией психических расстройств.

Не было обнаружено различий по уровням экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов во всех исследованных областях мозга в третьей серии экспериментов с инъекцией во фронтальную кору, в то время как в первой и второй серии экспериментов сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в среднем мозге привела к изменениям в экспрессии 5-HT_{1A} рецептора, зависимым от области мозга и линии мышей. Так, при введении AAV_Syn_5-HTR7-EGFP в средний мозг у мышей C57Bl/6J было зафиксировано снижение уровня мРНК 5-HT_{1A}

рецептора во фронтальной коре, тогда как у мышей линии ASC экспрессия гена 5-HT_{1A} рецептора оказалась сниженной в гиппокампе. Такие расхождения можно связать с различающимся генетическим фоном линий мышей C57Bl/6J и ASC. Ранее было показано, что гиппокамп мышей ASC более чувствителен к различным воздействиям, в том числе к хроническому воздействию тироксином [Zubkov et al., 2009], хроническому лечению флуоксетином [Tikhonova et al., 2010], а также интрацеребровентрикулярному введению нейротрофического фактора мозга BDNF [Naumenko et al., 2012]. Более того, отсутствие изменений в уровне мРНК 5-HT_{1A} рецептора во фронтальной коре вероятнее всего объясняется более низким базальным уровнем экспрессии рецептора в данной области мозга, а наблюдаемые изменения экспрессии 5-HT_{1A} рецептора в зависимости от региона мозга и линии мышей могут быть опосредованы ГАМК-регуляцией действия серотониновых нейронов в физиологических условиях и при депрессии [Albert, Vahid-Ansari, Luckhart, 2014].

Важно отметить, что у мышей C57Bl/6J, при инъекции AAV_Syn_5-HTR7-EGFP в средний мозг также произошло снижение уровня белка 5-HT_{1A} рецептора именно в мембранной фракции из образцов среднего мозга. Эти данные могут подтверждать идею о том, что изменение соотношения гомодимеров 5-HT_{1A} рецептора и гетеродимеров 5-HT_{1A}/5-HT₇ в сторону увеличения 5-HT_{1A}/5-HT₇ комплексов в пресинаптических терминалях повышает интернализацию 5-HT_{1A} рецептора [Kobe et al., 2012; Naumenko et al., 2014; Renner et al., 2012]. Однако сверхэкспрессия 5-HT₇ в среднем мозге не повлияла на уровень 5-HT_{1A} рецептора в мембранной фракции из образцов среднего мозга мышей ASC/Isq. Это несоответствие может указывать на независимую роль 5-HT₇ рецепторов в регуляции депрессивно-подобного поведения у мышей ASC/Isq, хотя это не до конца согласуется с имеющимися данными о положительной ассоциации 5-HT₇ рецептора с депрессивным поведением [Bonaventure et al., 2012]. В качестве возможного объяснения можно вспомнить о роли других механизмов десенситизации 5-HT_{1A} рецепторов, которые были описаны в разделе «Обзор

литературы», но подробно не рассматривались в данной работе. В частности тут могут иметь значение такие механизмы, как разобщение с G₁-белком или генетическая регуляция, поскольку линия мышей ASC/Icg была получена в результате длительного отбора гибридов между предрасположенной к каталепсии линией CBA/Lac и устойчивой к каталепсии линии AKR/J на высокую предрасположенность к каталепсии и значительно отличается от стандартной линии C57Bl/6J. Наличие резко возросшего количества 5-HT₇ рецепторов, вероятно, могло оказать эффект на те или иные сигнальные каскады, связанные с 5-HT_{1A} рецептором. Ранее работами лаборатории было показано [Кондаурова, Базовкина, Науменко, 2017] (и это соотносится с теорией об эффектах гетеродимеризации 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов), что хроническое введение LP44, являющегося химическим агонистом 5-HT₇ рецепторов приводит к выраженной десенсibilизации также и рецепторов 5-HT_{1A}. Однако такое воздействие не вызывает не приводит к существенным изменениям в уровнях экспрессии генов *Htr1a* и *Htr7* в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. Кроме того, не было найдено различий в уровне белка 5-HT_{1A} рецептора во всех исследованных структурах в третьей экспериментальной серии

Нам не удалось зафиксировать сверхэкспрессию белка 5-HT₇ рецептора во всех экспериментальных сериях. Рекомбинантный белок 5-HT₇ рецептора был обнаружен благодаря антителам против EGFP, которые детектируют EGFP метку на химерном белке 5-HT₇-EGFP с массой 79 кДа, что подтверждает экспрессию рекомбинантного белка 5-HT₇-EGFP. Обнаружить его на этом молекулярном весе с помощью широкого диапазона антител против 5-HT₇ не удалось. Нами были протестированы антитела 4 разных производителей, а Демирева Е. Ю. с коллегами [Demireva et al., 2019] протестировали 10 коммерчески доступных антител к 5-HT₇ рецептору, чтобы подтвердить отсутствие этого рецептора у созданных ими крыс с нокаутом 5-HT₇(-/-) и ни одно из антител не выявило потерю сигнала в тканях по 5-HT₇ рецептору, что может указывать на низкую специфичность антител против 5-HT₇ рецептора, вероятно из-за высокой

гомологии с другими серотониновыми рецепторами. Поэтому детекция химерного белка 5-HT₇-EGFP по метке EGFP стала единственным технически возможным доказательством сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора в мозге мышей экспериментальной группы.

Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора как в среднем мозге обоих исследованных линий, так и во фронтальной коре мышей линии C57Bl/6J не повлияла на экспрессию двух ключевых элементов серотониновой системы - TPH-2 и 5-HTT. Это в целом согласуется с ранее полученными результатами, показавшими, что хроническая активация 5-HT₇ рецепторов его селективным агонистом LP44 не оказала воздействия на экспрессию генов *Tph2* и *Slc6a4* [Kondaurova, Vazovkina, Naumenko, 2017], хотя хроническая активация 5-HT_{1A} рецептора его агонистом 8-OH-DPAT привела к значительному снижению экспрессии гена *Tph2* в среднем мозге [Porova et al., 2010]. С другой стороны, необходимо подчеркнуть тот факт, что TPH-2 и 5-HTT оказались в данной работе единственными элементами 5-HT системы мозга, которые не подверглись изменениям на фоне описанных выше воздействий. Данный факт может говорить о высокой устойчивости этих элементов 5-HT системы мозга против внешних воздействий не фармакологического профиля. Например в статье [Porova et al., 2015], описывающей влияние 1 месяца космического полета на российском биоспутнике БИОН-М1 на экспрессию ключевых генов дофаминовой и 5-HT систем мозга у мышей также не было найдено различий по уровням экспрессии TPH-2 и 5-HTT.

Сверхэкспрессия 5-HT₇ в среднем мозге вызвала значительные изменения метаболизма 5-HT как у мышей C57Bl/6J, так и у мышей ASC/Scg. Полученные данные также указывают на повышенную чувствительность 5-HT системы мозга у генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей: сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в среднем мозге привела к увеличению соотношения 5-Н1АА/5-НТ в среднем мозге и фронтальной коре у «недепрессивных» C57Bl/6J и во всех исследованных структурах мозга

«депрессивных» мышей ASC/1cg, что, вероятно, указывает на усиление метаболизма 5-НТ и согласуется с идеей о зависимом от 5-НТ₇/5-НТ_{1A} гетеродимеров снижении ингибирующего действия ауторецепторов 5-НТ_{1A} на метаболизм 5-НТ. В то же время уровень 5-Н1АА был выше во фронтальной коре и гиппокампе мышей ASC из опытной группы, тогда как у мышей C57Bl/6J сверхэкспрессия рецептора 5-НТ₇ приводила к снижению уровня 5-НТ в лобной коре. В совокупности эти результаты указывают на усиление метаболизма 5-НТ в ответ на сверхэкспрессию рецептора 5-НТ₇ в области ядер шва. Противоположные эффекты были получены при сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре. В среднем мозге уровень 5-НТ оказался повышен, наряду со сниженным коэффициентом метаболизма серотонина. Полученные данные говорят о снижении катаболизма серотонина в среднем мозге, которое можно объяснить возможным снижением уровня или функциональной активности 5-НТ_{1A} рецепторов из-за их интернализации вследствие димеризации с повышенным количеством 5-НТ₇ рецепторов. В то же время во фронтальной коре уровень 5-НТ снизился, что вероятно связано с механизмом не прямой отрицательной обратной связи. Этот механизм вовлекает как 5-НТ_{1A} гетерорецепторы, так и 5-НТ₇ рецепторы (в том числе сверхэкспрессированные) глутаматергических нейронов фронтальной коры, дающих нисходящие проекции в средний мозг [Altieri et al., 2013]. Проекции от глутаматергических нейронов фронтальной коры снижают активность 5-НТ нейронов через ГАМК-интернейроны среднего мозга. Этот механизм гипотетически может понижать активность нейронов среднего мозга при повышении плотности 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре, оказывающих стимулирующее действие на глутаматергические нейроны фронтальной коры. Гиппокамп оказался единственной структурой, где метаболизм 5-НТ не изменился, что можно объяснить с двух позиций. Во-первых, не известно прямых проекций из фронтальной коры в гиппокамп, а во-вторых, при сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов в среднем мозге наблюдались изменения обмена 5-НТ в гиппокампе только у мышей ASC/1cg, но не у C57Bl/6J, что,

поддерживает идею о низкой чувствительности гиппокампа этой линии мышей к подобного рода воздействиям.

В целом результаты настоящего исследования хорошо согласуются с нашими общими представлениями о 5-HT₇/5-HT_{1A} гетеродимер-зависимом снижении ингибирующего влияния 5-HT_{1A} ауторецепторов на метаболизм 5-HT, а также с предположением о роли 5-HT_{1A}/5-HT₇ гетеродимеризации в регуляции депрессивного поведения [Pорова et al., 2015; Naumenko et al., 2014].

Заключение

В данной работе впервые было показано, что основанная на AAV сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в ядрах шва среднего мозга существенно повлияла на функционирование 5-HT-системы мозга и уровень поведенческого отчаяния в тесте принудительного плавания как у "недепрессивных" мышей C57Bl/6J, так и у "депрессивных" мышей ASC. Этот факт подтверждает идею о том, что 5-HT₇ рецептор может является мишенью для лечения депрессивных расстройств и современные тенденции по поиску и исследованию химических соединений с антидепрессивной активностью, воздействующих на 5-HT₇ рецепторы. В дополнении к этому, полученные результаты указывают на сходство механизмов, лежащих в основе снижения уровня поведенческого отчаяния в тесте принудительного плавания, вызываемого рецептором 5-HT₇, как у "недепрессивных", так и у генетически предрасположенных к депрессивному поведению животных. В то же время сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в области фронтальной коры приводит к проявлению депрессивно-подобного поведения, дополнительно поддерживая гипотезу о роли гетеродимеризации 5-HT_{1A}/5-HT₇ рецепторов в подавлении активности 5-HT_{1A} рецептора. Кроме того, это доказывает структуроспецифичное участие 5-HT₇ рецептора в регуляции функционального состояния 5-HT системы мозга и механизмах нормального и депрессивно-подобного поведения.

Выводы

1. Введение аденоассоциированного генетического конструкта в область ядер шва среднего мозга и фронтальную кору мышей линии C57Bl/6J и в область ядер шва среднего мозга мышей ASC, привела к значительному усилению экспрессии гена 5-HT₇ рецепторов и появлению белка 5-HT₇-EGFP в данных структурах мозга.
2. У мышей линии C57Bl/6J сверхэкспрессия гена 5-HT₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга вызывает существенное снижение уровня поведенческого отчаяния в тесте принудительного плавания, ожидаемое изменение экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов во фронтальной коре и повышение уровня обмена серотонина во фронтальной коре и среднем мозге.
3. У мышей линии ASC/Isg (генетической модели депрессии) сверхэкспрессия гена 5-HT₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга сопровождается существенным антидепрессивным действием в тесте принудительного плавания и открытого поля, ожидаемое изменение экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов в гиппокампе и повышение уровня обмена серотонина во всех исследованных структурах мозга.
4. У мышей линии C57Bl/6 сверхэкспрессия гена 5-HT₇ рецепторов во фронтальной коре приводит к существенному усилению депрессивно-подобного поведения в тесте принудительного плавания, снижению уровня обмена серотонина в среднем мозге и уровня серотонина во фронтальной коре без существенных изменений в экспрессии 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов.
5. 5-HT₇ рецептор участвует в механизмах, лежащих в основе депрессивно-подобного поведения, причем его роль строго структуроспецифична. В области ядер шва среднего мозга 5-HT₇ рецептор подавляет депрессивно-подобное поведение, а во фронтальной коре, напротив, оказывает продепрессивное действие.

Список используемых сокращений

5-HT	Серотонин
5-HTP	5-Гидрокситриптофан
5-CT	5-Карбоксамидотриптамин
5-HTT	Мембранный транспортер серотонина
<i>Slc6a4</i>	Ген, кодирующий 5-HTT
ТПГ-2	Триптофангидроксилаза-2
<i>Tph2</i>	Ген, кодирующий ТПГ-2
5-HT1A	Рецептор серотонина 1A подтипа
<i>Htr1a</i>	Ген, кодирующий 5-HT1A рецептор
5-HT7	Рецептор серотонина 7 типа
<i>Htr7</i>	Ген, кодирующий 5-HT7 рецептор
ГАМК	Гаммааминомасляная кислота
СИОЗС	Селективный ингибитор обратного захвата серотонина
AAV	Аденоассоциированный вирус
ITRs	Инвертированные концевые повторы
WPRE	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка
hGHrA	Сигнал полиаденилирования гормона роста
EGFP	Зеленый флуоресцентный белок
ЦНС	Центральная нервная система
GPCR	Рецептор, связанный с G-белком
цАМФ, сАМР	Циклический аденозинмонофосфат
PKA, PKA	Протеинкиназа А
GIRK	Калиевые каналы внутреннего выпрямления
MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа
BDNF	Нейротрофический фактор мозга

Список цитируемой литературы

1. Гарибова Т.Л. Поведенческие Экспериментальные Модели Депрессии / Т.Л. Гарибова, В.А. Крайнева, Т.А. Воронина // Фармакокинетика И Фармакодинамика. – 2017. – Vol. 3. – P. 14-19.
2. Кондаурова Е.М. Взаимодействие 5-НТ1- и 5-НТ7-рецепторов: хроническая активация 5-НТ7-рецептора уменьшает содержание 5-НТ1-рецептора и понижает его функциональную активность в мозге мышей / Е.М. Кондаурова, Д.В. Базовкина, В.С. Науменко // Молекулярная биология. – 2017. – Vol. 51. – № 1. – P. 157-165.
3. Науменко В.С. Количественное определение экспрессии гена 5-НТ1А серотонинового рецептора в головном мозге / В.С. Науменко, К.А. В. // Молекулярная биология. – 2006. – Vol. 40. – № 1. – P. 37-44.
4. Попова Н.К. Серотонин и поведение / Н.К. Попова, В.С. Науменко, В.Г. Колпаков. – Новосибирск: Издательство “Наука,” 1978. – 304 p.
5. Современные Экспериментальные Модели Депрессии / Н. Язуина et al. // Биомедицина. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – P. 61-71.
6. 5-HT 7R/G 12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner / F. Kobe et al. // Journal of Neuroscience. – 2012. – Vol. 32. – № 9. – P. 2915-2930.
7. Abelaira H.M. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression / H.M. Abelaira, G.Z. Reúus, J. Quevedo // Revista Brasileira de Psiquiatria. – 2013. – Vol. 35. – № SUPPL.2. – P. 112-120.
8. Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research / D.L. Haggerty et al. // Molecular Therapy - Methods and Clinical Development. – 2020. – Vol. 17. – № June. – P. 69-82.
9. Akimova E. The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders / E. Akimova, R. Lanzenberger, S. Kasper // Biological Psychiatry. – 2009. – Vol. 66. – № 7. – P. 627-635.

10. Albert P.R. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression / P.R. Albert, F. Vahid-Ansari, C. Luckhart // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – № JUNE. – P. 1-13.
11. Anisman H. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models / H. Anisman, K. Matheson // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2005. – Vol. 29. – № 4-5. – P. 525-546.
12. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test / A. V. Kulikov et al. // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2010. – Vol. 191. – № 1. – P. 26-31.
13. Baganz N. A Dialogue between the Immune System and Brain, Spoken in the Language of Serotonin / N. Baganz, R. Blakely // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. 48-63.
14. Basic concepts in viral vector-mediated gene therapy / M.J. Benskey et al. // *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 1937. – P. 3-26.
15. Behavioral animal models of depression / H.C. Yan et al. // *Neuroscience Bulletin*. – 2010. – Vol. 26. – № 4. – P. 327-337.
16. Berger M. The Expanded Biology of Serotonin / M. Berger, J.A. Gray, B.L. Roth // *Annual Review of Medicine*. – 2009. – Vol. 60. – № 1. – P. 355-366.
17. Bessis N. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms / N. Bessis, F.J. GarciaCozar, M.-C. Boissier // *Gene Therapy*. – 2004. – Vol. 11. – № S1. – P. S10-S17.
18. Björkholm C. BDNF - A key transducer of antidepressant effects / C. Björkholm, L.M. Monteggia // *Neuropharmacology*. – 2016. – Vol. 102. – P. 72-79.
19. Blendy J.A. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment / J.A. Blendy // *Biological Psychiatry*. – 2006. – Vol. 59. – № 12. – P. 1144-1150.
20. Chemical Neuroanatomy of 5-HT Receptor Subtypes in the Mammalian Brain / G. Mengod et al. – 2006. – P. 319-364.
21. Constitutive G(i₂)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists / P.R. Albert et al. // *Journal of*

- Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274. – № 50. – P. 35469-35474.
22. Creation of the 5-hydroxytryptamine receptor 7 knockout rat as a tool for cardiovascular research / E.Y. Demireva et al. // *Physiological Genomics*. – 2019. – Vol. 51. – № 7. – P. 290-301.
 23. Current Limitations and Candidate Potential of 5-HT7 Receptor Antagonism in Psychiatric Pharmacotherapy / R. Okubo et al. // *Frontiers in Psychiatry*. – 2021. – Vol. 12. – № February. – P. 1-16.
 24. Davidson B.L. From the Cover: Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system / B.L. Davidson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № 7. – P. 3428-3432.
 25. Depression, Serotonin and Tryptophan / L. Dell’Osso et al. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2016. – Vol. 22. – № 8.
 26. Deurwaerdère P. De. Serotonin in health and disease / P. De Deurwaerdère, G. Di Giovanni // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 10. – P. 10-13.
 27. Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior / Z.R. Donaldson et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2014. – Vol. 39. – № 2. – P. 291-302.
 28. Differential distribution of serotonin receptor subtypes in BNSTALG neurons: Modulation by unpredictable shock stress / R. Hazra et al. // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 225. – P. 9-21.
 29. Distribution of 5-HT Receptors in the Central Nervous System / G. Mengod et al. // *Handbook of Behavioral Neuroscience*. – 2010. – Vol. 21. – № C. – P. 123-138.
 30. Distribution of serotonin receptors. / J.M. Palacios et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1990. – Vol. 600. – № 1. – P. 36-52.
 31. Dual lipidation of the brain-specific Cdc42 isoform regulates its functional properties / A. Wirth et al. // *Biochemical Journal*. – 2013. – Vol. 456. – № 3. – P. 311-322.
 32. Effect of lethal yellow (A Y) mutation and photoperiod alterations on mouse

- behavior / E.Y. Bazhenova et al. // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii*. – 2019a. – Vol. 23. – № 1. – P. 55-61.
33. Effect of photoperiodic alterations on depression-like behavior and the brain serotonin system in mice genetically different in tryptophan hydroxylase 2 activity / E.Y. Bazhenova et al. // *Neuroscience Letters*. – 2019b. – Vol. 699. – P. 91-96.
34. Effects of β -carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: Further evidence of antidepressant properties. Vol. 81 / J.J. Fortunato et al. – Quevedo, João: Laboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma: Elsevier Science, 2010.
35. Experimental models of depressive disorder / V.M. Ushakova et al. // *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatel'nosti Imeni I.P. Pavlova*. – 2019. – Vol. 69. – № 2. – P. 230-247.
36. Exposure of mice to long-light: A new animal model to study depression / A. Becker et al. // *European Neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 20. – № 11. – P. 802-812.
37. Flint J. The Genetics of Major Depression / J. Flint, K.S. Kendler // *Neuron*. – 2014. – Vol. 81. – № 3. – P. 484-503.
38. Forkhead Box, Class O Transcription Factors in Brain: Regulation and Behavioral Manifestation / A. Polter et al. // *Biological Psychiatry*. – 2009. – Vol. 65. – № 2. – P. 150-159.
39. Fuchs E. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety / E. Fuchs, G. Flugge // *Dialogues in Clinical Neuroscience*. – 2006. – Vol. 8. – № 3. – P. 323-333.
40. Gaddum J.H. Two Kinds of Tryptamine Receptor / J.H. Gaddum, Z.P. Picarelli // *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. – 1957. – Vol. 12. – № 3. – P. 323-328.
41. Genetic Animal Models of Depression / P.R. Canavello et al. // *Neuromethods : Neuromethods* / eds. A. V. Kalueff, C.L. Bergner. – Totowa, NJ: Humana Press, 2010.

– Vol. 44. – P. 191-200.

42. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice / A. V. Kulikov et al. // *Genes, Brain and Behavior*. – 2008. – Vol. 7. – № 4. – P. 506-512.
43. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / S.L. James et al. // *The Lancet*. – 2018. – Vol. 392. – № 10159. – P. 1789-1858.
44. GPCRs steer Gi and Gs selectivity via TM5-TM6 switches as revealed by structures of serotonin receptors / S. Huang et al. // *Molecular Cell*. – 2022. – Vol. 82. – № 14. – P. 2681-2695.e6.
45. Grimm D. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6 / D. Grimm, M.A. Kay, J.A. Kleinschmidt // *Molecular Therapy*. – 2003. – Vol. 7. – № 6. – P. 839-850.
46. Hannon J. Molecular biology of 5-HT receptors / J. Hannon, D. Hoyer // *Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects*. – 2008. – Vol. 195. – P. 155-182.
47. Hensler J.G. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT1A) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice / J.G. Hensler, E.E. Ladenheim, W.E. Lyons // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 85. – № 5. – P. 1139-1147.
48. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response / M.A. Tikhonova et al. // *Behavioural Brain Research*. – 2013. – Vol. 243. – № 1. – P. 53-60.
49. Identification of essential residues for binding and activation in the human 5-HT7(a) serotonin receptor by molecular modeling and site-directed mutagenesis / A.A. Rita Impellizzeri et al. // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – № MAY. – P. 1-12.
50. Increased Fear Response to Contextual Cues in Mice Lacking the 5-HT1A Receptor / K.C. Klemenhagen et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2006. – Vol. 31. – № 1. – P. 101-111.
51. International union of basic and clinical pharmacology. Cx. Classification of

- receptors for 5-hydroxytryptamine; pharmacology and function / N.M. Barnes et al. // *Pharmacological Reviews*. – 2021. – Vol. 73. – № 1. – P. 310-520.
52. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response / P.W. Andrews et al. // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2015. – Vol. 51. – P. 164-188.
53. Khurana K. Lacidipine attenuates reserpine-induced depression-like behavior and oxido-nitrosative stress in mice / K. Khurana, N. Bansal // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2019. – Vol. 392. – № 10. – P. 1265-1275.
54. Kondaurova E.M. 5-HT1A/5-HT7 receptor interplay: Chronic activation of 5-HT7 receptors decreases the functional activity of 5-HT1A receptor and its content in the mouse brain / E.M. Kondaurova, D. V. Bazovkina, V.S. Naumenko // *Molekuliarnaia biologiiia*. – 2017. – Vol. 51. – № 1. – P. 157-165.
55. Krishnan V. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives / V. Krishnan, E.J. Nestler // *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*. – 2011. – P. 121-147.
56. Krishnan V. The molecular neurobiology of depression / V. Krishnan, E.J. Nestler // *Nature*. – 2008. – Vol. 455. – № 7215. – P. 894-902.
57. Lentz T.B. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system / T.B. Lentz, S.J. Gray, R.J. Samulski // *Neurobiology of Disease*. – 2012. – Vol. 48. – № 2. – P. 179-188.
58. Long J.A.D. Vortioxetine for Depression in Adults / J.A.D. Long // *Issues in Mental Health Nursing*. – 2019. – Vol. 40. – № 9. – P. 819-820.
59. Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice / D.M. McCarty et al. // *Gene Therapy*. – 2009. – Vol. 16. – № 11. – P. 1340-1352.
60. Martinowich K. New insights into BDNF function in depression and anxiety / K. Martinowich, H. Manji, B. Lu // *Nature Neuroscience*. – 2007. – Vol. 10. – № 9. – P. 1089-1093.
61. Miller A.H. Inflammation and its discontents: The role of cytokines in the pathophysiology of major depression / A.H. Miller, V. Maletic, C.L. Raison //

Psiquiatria Biologica. – 2010. – Vol. 65. – № 2. – P. 71-80.

62. Moses L. Serotonin a review.pdf / L. Moses // J. vet. Pharmacol. Therap. – 2008. – Vol. 31. – P. 187-199.
63. Naumenko V.S. On the role of brain 5-HT 7 receptor in the mechanism of hypothermia: Comparison with hypothermia mediated via 5-HT 1A and 5-HT 3 receptor / V.S. Naumenko, E.M. Kondaurova, N.K. Popova // Neuropharmacology. – 2011. – Vol. 61. – № 8. – P. 1360-1365.
64. Naumenko V.S. 5-HT1A receptor: its role in the regulation of different kinds of behavior / V.S. Naumenko, E.G. Ponimaskin, N.K. Popova // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2016. – Vol. 20. – № 2. – P. 180-190.
65. Neural and genetic correlates of the social sharing of happiness / M. Matsunaga et al. // Frontiers in Neuroscience. – 2017. – Vol. 11. – № DEC. – P. 1-16.
66. Nikiforuk A. Targeting the serotonin 5-HT7 receptor in the search for treatments for CNS disorders: Rationale and progress to date / A. Nikiforuk // CNS Drugs. – 2015. – Vol. 29. – № 4. – P. 265-275.
67. On association of the lethal yellow (A Y) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior / N. V. Khotskin et al. // Behavioural Brain Research. – 2019. – Vol. 359. – № November 2018. – P. 446-456.
68. On the interaction between BDNF and serotonin systems: The effects of long-term ethanol consumption in mice / N.K. Popova et al. // Alcohol. – 2020. – Vol. 87. – P. 1-15.
69. Peroutka S.J. Serotonin receptor variants in disease: new therapeutic opportunities? / S.J. Peroutka // Ann N Y Acad Sci. – 1998. – Vol. 15. – № 861. – P. 16-25.
70. Pharmacology and Therapeutic Potential of the 5-HT 7 Receptor / K.M. Blattner et al. // ACS Chemical Neuroscience. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 89-119.
71. Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice / T. Otsuka et al. // Psychoneuroendocrinology. – 2014. – Vol. 40. – № 1. – P. 37-47.
72. Polter A.M. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain /

- A.M. Polter, X. Li // Cellular Signalling. – 2010. – Vol. 22. – № 10. – P. 1406-1412.
73. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard / A. V. Kulikov et al. // Journal of Neuroscience Methods. – 2005. – Vol. 141. – № 1. – P. 97-101.
74. Recombinant Viral Vectors as Neuroscience Tools / S.H. Chen et al. // Current Protocols in Neuroscience. – 2019. – Vol. 87. – № 1. – P. 1-16.
75. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: Emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior / S.C. Altieri et al. // ACS Chemical Neuroscience. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. 72-83.
76. Risk Neurogenes for Long-Term Spaceflight: Dopamine and Serotonin Brain System / N.K. Popova et al. // Molecular Neurobiology. – 2015. – Vol. 51. – № 3. – P. 1443-1451.
77. Roth B.L. Molecular and Cellular Mechanisms for the Polarized Sorting of Serotonin Receptors: Relevance for Genesis and Treatment of Psychosis / B.L. Roth, Z. Xia // Critical ReviewsTM in Neurobiology. – 2004. – Vol. 16. – № 4. – P. 229-236.
78. Selecting an appropriate animal model of depression / Y. Hao et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – № 19. – P. 1-16.
79. Serotonin 5-HT₇ receptor increases the density of dendritic spines and facilitates synaptogenesis in forebrain neurons / L. Speranza et al. // Journal of Neurochemistry. – 2017. – Vol. 141. – № 5. – P. 647-661.
80. Serotonin 5-HT₇ receptor overexpression in the raphe nuclei area produces antidepressive effect and affects brain serotonin system in male mice / A.Y. Rodnyy et al. // Journal of Neuroscience Research. – 2022. – Vol. 100. – № 7. – P. 1506-1523.
81. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. / M. Pytliak et al. // Physiological research. – 2011. – Vol. 60. – № 1. – P. 15-25.
82. Sharp T. 5-HT and depression: Is the glass half-full? / T. Sharp, P.J. Cowen // Current Opinion in Pharmacology. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 45-51.
83. Sweatt J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory / J.D. Sweatt // Current Opinion in Neurobiology. – 2004. – Vol. 14. – № 3. – P. 311-317.
84. The 5-HT_{1A} receptor: an overview of recent advances / S. El Mestikawy et al. //

Neurochemical Research. – 1991. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-10.

85. Thompson T. Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice / T. Thompson, L. Grabowski-Boase, L.M. Tarantino // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2015. – Vol. 133. – P. 7-17.

86. Translational evaluation of JNJ-18038683, a 5-hydroxytryptamine type 7 receptor antagonist, on rapid eye movement sleep and in major depressive disorder / P. Bonaventure et al. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2012. – Vol. 342. – № 2. – P. 429-440.

87. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain / V.S. Naumenko et al. // Journal of Neuroscience Methods. – 2008. – Vol. 170. – № 2. – P. 197-203.

88. Vandamme C. Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial / C. Vandamme, O. Adjali, F. Mingozzi // Human Gene Therapy. – 2017. – Vol. 28. – № 11. – P. 1061-1074.

89. Viral vectors for delivering gene material into cells and their application in neurobiology (Review) / E.A. Epifanova et al. // Sovremennyye Tehnologii v Medicine. – 2017. – Vol. 9. – № 1. – P. 162-173.

90. Viral vectors for therapy of neurologic diseases / S.R. Choudhury et al. // Neuropharmacology. – 2017. – Vol. 120. – P. 63-80.

91. Wang D. State-of-the-art human gene therapy: Part I. Gene delivery technologies / D. Wang, Guangping Gao, G. Gao // Discovery medicine. – 2014. – Vol. 18. – № 97. – P. 67-77.

92. Willner P. The validity of animal models of predisposition to depression / P. Willner, P.J. Mitchell // Behavioural Pharmacology. – 2002. – Vol. 13. – № 3. – P. 169-188.

93. Wirth T. History of gene therapy / T. Wirth, N. Parker, S. Ylä-Herttuala // Gene. – 2013. – Vol. 525. – № 2. – P. 162-169.

94. [3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. / D.R. Thomas et al. // Neuropharmacology. – 2002. – Vol. 42. – № 1. – P. 74-81.

95. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. / J. De Vry et al. // *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. – 2004. – Vol. 14. – № 6. – P. 487-495.
96. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. / P.B. Hedlund et al. // *Biological psychiatry*. – 2005. – Vol. 58. – № 10. – P. 831-837.
97. 5-HT₇ receptor modulates GABAergic transmission in the rat dorsal raphe nucleus and controls cortical release of serotonin. / M. Kusek et al. // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 324.
98. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. / T.W. Lovenberg et al. // *Neuron*. – 1993. – Vol. 11. – № 3. – P. 449-458.
99. Albert P.R. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. / P.R. Albert, S. Lemonde // *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. – 2004. – Vol. 10. – № 6. – P. 575-593.
100. Albert P.R. The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior / P.R. Albert, F. Vahid-Ansari // *Biochimie*. – 2019. – Vol. 161. – P. 34-45.
101. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. / M. Varadi et al. // *Nucleic acids research*. – 2022. – Vol. 50. – № D1. – P. D439-D444.
102. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? / I.D. Neumann et al. // *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. – 2011. – Vol. 35. – № 6. – P. 1357-1375.
103. Avgustinovich D.F. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. / D.F. Avgustinovich, I.L. Kovalenko, N.N. Kudryavtseva // *Neuroscience and behavioral physiology*. – 2005. – Vol. 35. – № 9. – P. 917-924.
104. Beaulieu J.-M. Akt/GSK3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs / J.-M. Beaulieu, R.R. Gainetdinov, M.G. Caron // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2009. – Vol. 49. – № 1. – P. 327-347.

105. Belmaker R.H. Major depressive disorder. / R.H. Belmaker, G. Agam // *The New England journal of medicine*. – 2008. – Vol. 358. – № 1. – P. 55-68.
106. Bhalla P. Molecular cloning and tissue distribution of mRNA encoding porcine 5-HT₇ receptor and its comparison with the structure of other species. / P. Bhalla, P.R. Saxena, H.S. Sharma // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2002. – Vol. 238. – № 1-2. – P. 81-88.
107. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. / B.L. Roth et al. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 1994. – Vol. 268. – № 3. – P. 1403-1410.
108. Biochemical and pharmacological study of N-linked glycosylation of the human serotonin 5-HT_{7a} receptor. / E. Gellynck et al. // *The FEBS journal*. – 2012. – Vol. 279. – № 11. – P. 1994-2003.
109. Bulenger S. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation / S. Bulenger, S. Marullo, M. Bouvier // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2005. – Vol. 26. – № 3. – P. 131-137.
110. Central pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. / T. Jolas et al. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 1994. – Vol. 268. – № 3. – P. 1432-1443.
111. Choi C. The Ras-ERK pathway modulates cytoskeleton organization, cell motility and lung metastasis signature genes in MDA-MB-231 LM2. / C. Choi, D.M. Helfman // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 28. – P. 3668-3676.
112. Chronic actions of thyroxine on behavior and serotonin receptors in mouse strains with contrasting predispositions to catalepsy. / E.A. Zubkov et al. // *Neuroscience and behavioral physiology*. – 2009. – Vol. 39. – № 9. – P. 909-914.
113. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. / J.A. Bard et al. // *The Journal of biological chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – № 31. – P. 23422-23426.
114. Contributions of animal models to the study of mood disorders. / S.S. Valvassori et al. // *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. – 2013. – Vol. 35 Suppl 2. – P. S121-31.

115. Correlation between 5-HT₇ receptor affinity and protection against sound-induced seizures in DBA/2J mice. / A. Bourson et al. // *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. – 1997. – Vol. 356. – № 6. – P. 820-826.
116. Courtney N.A. Mechanisms of 5-HT_{1A} receptor-mediated transmission in dorsal raphe serotonin neurons. / N.A. Courtney, C.P. Ford // *The Journal of physiology*. – 2016. – Vol. 594. – № 4. – P. 953-965.
117. Devi L.A. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. / L.A. Devi // *Trends in pharmacological sciences*. – 2001. – Vol. 22. – № 10. – P. 532-537.
118. Differential agonist-mediated internalization of the human 5-hydroxytryptamine 7 receptor isoforms. / C.R. Guthrie et al. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2005. – Vol. 313. – № 3. – P. 1003-1010.
119. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. / H. Sei et al. // *Brain research*. – 2000. – Vol. 877. – № 2. – P. 387-390.
120. Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT_{1A} receptors but not 5-HT_{2A} receptors. / A. Bortolozzi et al. // *The international journal of neuropsychopharmacology*. – 2010. – Vol. 13. – № 10. – P. 1299-1314.
121. Dysfunctional inhibitory mechanisms in locus coeruleus neurons of the wistar kyoto rat. / C. Bruzos-Cidón et al. // *The international journal of neuropsychopharmacology*. – 2015. – Vol. 18. – № 7. – P. pyu122.
122. Effect of Antidepressants on Immunological Reactivity in ASC Mice with Genetically Determined Depression-Like State. / M.M. Gevorgyan et al. // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2016. – Vol. 161. – № 2. – P. 266-269.
123. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains / V.S. Naumenko et al. // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 214. – P. 59-67.
124. Effects of chronic fluoxetine treatment on catalepsy and the immune response in mice with a genetic predisposition to freezing reactions: the roles of types 1A and 2A

- serotonin receptors and the tph2 and SERT genes. / M.A. Tikhonova et al. // Neuroscience and behavioral physiology. – 2010. – Vol. 40. – № 5. – P. 521-527.
125. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. / J.C. Felger et al. // Biological psychiatry. – 2007. – Vol. 62. – № 11. – P. 1324-1333.
126. Effects of lurasidone in behavioral models of depression. Role of the 5-HT₇ receptor subtype. / L.N. Cates et al. // Neuropharmacology. – 2013. – Vol. 70. – P. 211-217.
127. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. / J. Grønli et al. // Behavioural brain research. – 2007. – Vol. 181. – № 1. – P. 42-51.
128. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. / D.E. Heidmann et al. // Neuropharmacology. – 1998. – Vol. 37. – № 12. – P. 1621-1632.
129. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. / M. Guscott et al. // Neuropharmacology. – 2005. – Vol. 48. – № 4. – P. 492-502.
130. Guseva D. Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling / D. Guseva, A. Wirth, E. Ponimaskin // Frontiers in Behavioral Neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – P. 1-8.
131. Heim C. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. / C. Heim, C.B. Nemeroff // Biological psychiatry. – 2001. – Vol. 49. – № 12. – P. 1023-1039.
132. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. / S.-K. Chen et al. // Cell. – 2010. – Vol. 141. – № 5. – P. 775-785.
133. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking / U. Renner et al. // Journal of Cell Science. – 2012. – Vol. 125. – № 10. – P. 2486-2499.
134. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. / J. Jumper et al. // Nature. – 2021. – Vol. 596. – № 7873. – P. 583-589.

135. Holsboer F. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. / F. Holsboer, M. Ising // *Annual review of psychology*. – 2010. – Vol. 61. – P. 81-109, C1-11.
136. Immune response in mice of a new strain ASC (antidepressants sensitive catalepsy) / E.L. Alperina et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 144. – № 2. – P. 221-223.
137. Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders / V.S. Naumenko et al. // *CNS Neuroscience and Therapeutics*. – 2014. – Vol. 20. – № 7. – P. 582-590.
138. Katz R.J. Animal models and human depressive disorders. / R.J. Katz // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. – 1981. – Vol. 5. – № 2. – P. 231-246.
139. Kulikov A. V. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. / A. V Kulikov, M.A. Tikhonova, V.A. Kulikov // *Journal of neuroscience methods*. – 2008. – Vol. 170. – № 2. – P. 345-351.
140. Loftis J.M. The phenomenology and treatment of interferon-induced depression. / J.M. Loftis, P. Hauser // *Journal of affective disorders*. – 2004. – Vol. 82. – № 2. – P. 175-190.
141. Ludwig B. The concept of violent suicide, its underlying trait and neurobiology: A critical perspective. / B. Ludwig, Y. Dwivedi // *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. – 2018. – Vol. 28. – № 2. – P. 243-251.
142. Mann J.J. Models of Depressive Disorders. *Model. Depress. Disord.* / J.J. Mann; ed. J.J. Mann. – Boston, MA: Springer US, 1989.
143. Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice. / W. Adriani et al. // *Neuropharmacology*. – 2012. – Vol. 62. – № 2. – P. 833-842.
144. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT₇ and other 5-HT receptor types. / F. Viguiet et al. // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 716. – № 1-3. – P. 8-16.
145. Nesse R.M. Is depression an adaptation? / R.M. Nesse // *Archives of general*

psychiatry. – 2000. – Vol. 57. – № 1. – P. 14-20.

146. Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression in neurons. / J.-H. Choi et al. // *Molecular brain*. – 2014. – Vol. 7. – P. 17.

147. Overstreet D.H. The flinders sensitive line rat model of depression--25 years and still producing. / D.H. Overstreet, G. Wegener // *Pharmacological reviews*. – 2013. – Vol. 65. – № 1. – P. 143-155.

148. Persistent modification of forebrain networks and metabolism in rats following adolescent exposure to a 5-HT₇ receptor agonist. / R. Canese et al. // *Psychopharmacology*. – 2015. – Vol. 232. – № 1. – P. 75-89.

149. Plassat J.L. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. / J.L. Plassat, N. Amlaiky, R. Hen // *Molecular pharmacology*. – 1993. – Vol. 44. – № 2. – P. 229-236.

150. Popova N.K. 5-HT_{1A} receptor as a key player in the brain 5-HT system / N.K. Popova, V.S. Naumenko // *Reviews in the Neurosciences*. – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 191-204.

151. Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT(1A) agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior. / N.K. Popova et al. // *Neuroscience*. – 2010. – Vol. 169. – № 1. – P. 229-235.

152. Rusak B. Neural regulation of circadian rhythms. / B. Rusak, I. Zucker // *Physiological reviews*. – 1979. – Vol. 59. – № 3. – P. 449-526.

153. Sale E.M. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. / E.M. Sale, G.J. Sale // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. – 2008. – Vol. 65. – № 1. – P. 113-127.

154. Selection for the predisposition to catalepsy enhances depressive-like traits in mice. / D. V Bazovkina et al. // *Genetika*. – 2005. – Vol. 41. – № 9. – P. 1222-1228.

155. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT_{1A} serotonin receptor gene in mice / E.M. Kondaurava et al. // *Genes, Brain and Behavior*. – 2006. – Vol. 5. – № 8. – P. 596-601.

156. Seligman M.E. Learned helplessness in the rat. / M.E. Seligman, G. Beagley // *Journal of comparative and physiological psychology*. – 1975. – Vol. 88. – № 2. – P. 534-541.
157. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. / M. Leopoldo et al. // *Pharmacology & therapeutics*. – 2011. – Vol. 129. – № 2. – P. 120-148.
158. Sharp T. Central 5-HT receptors and their function; present and future / T. Sharp, N.M. Barnes // *Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 177. – № May. – P. 108155.
159. Silberstein S.D. Serotonin (5-HT) and migraine. / S.D. Silberstein // *Headache*. – 1994. – Vol. 34. – № 7. – P. 408-417.
160. Sloman L. A new comprehensive evolutionary model of depression and anxiety. / L. Sloman // *Journal of affective disorders*. – 2008. – Vol. 106. – № 3. – P. 219-228.
161. Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. / N. Elizalde et al. // *Psychopharmacology*. – 2010. – Vol. 210. – № 3. – P. 393-406.
162. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. / D.J. Walther et al. // *Science (New York, N.Y.)*. – 2003. – Vol. 299. – № 5603. – P. 76.
163. The 5-HT₇ receptor as a potential target for treating drug and alcohol abuse / S.R. Hauser et al. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – № JAN. – P. 1-9.
164. The endogenous and reactive depression subtypes revisited: integrative animal and human studies implicate multiple distinct molecular mechanisms underlying major depressive disorder. / K. Malki et al. // *BMC medicine*. – 2014. – Vol. 12. – P. 73.
165. The H/Rouen mouse model displays depression-like and anxiety-like behaviors. / M. El Yacoubi et al. // *Behavioural brain research*. – 2013. – Vol. 256. – P. 43-50.
166. The serotonin 5-HT₇ receptors: two decades of research / E. Gellynck et al. // *Experimental Brain Research*. – 2013. – Vol. 230. – № 4. – P. 555-568.
167. Thomas D.R. 5-HT₇ receptors. / D.R. Thomas, J.J. Hagan // *Current drug targets. CNS and neurological disorders*. – 2004. – Vol. 3. – № 1. – P. 81-90.
168. Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. / P. Willner // *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. – 1986. – Vol. 10. – № 6. – P. 677-690.

169. WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. / R. Klein et al. // *Gene*. – 2006. – Vol. 372. – P. 153-161.
170. Zifa E. 5-Hydroxytryptamine receptors. / E. Zifa, G. Fillion // *Pharmacological reviews*. – 1992. – Vol. 44. – № 3. – P. 401-458.