ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ИЦИГ СО РАН)

На правах рукописи

ДРОЗД УЛЬЯНА СЕРГЕЕВНА

Модуляция действия субанестетической дозы кетамина оптогенетическими воздействиями на активность нейронов гиппокампа и дорсального ядра шва крыс

1.5.5. – физиология человека и животных

(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Ланшаков Дмитрий Александрович

чл.-корр. РАН, проф., д.б.н.

Дыгало Николай Николаевич

Новосибирск, 2026

Оглавление

Оглавление 2

Введение 5

Глава 1. Обзор литературы 15

1.1 Острый стресс и копинг-стратегии 15

1.2 Роль гиппокампа в регуляции психоэмоциональных реакций 17

1.2.1 Структурно-функциональная организация отделов гиппокампа 18

1.2.2 Вовлечённость дорсального и вентрального гиппокампа в стресс-ответ и выбор копинг-стратегии 21

1.3 Роль 5-НТергической системы в регуляции стресс-ответа и выборе копинг-стратегий 26

1.3.1 5-НТергическая система как регулятор адаптации к стрессу 26

1.3.2 Дорсальное и медиальное ядра шва: функциональная специализация 5-НТ-ергических путей 27

1.3.3 5-НТ-ергическая модуляция гиппокампа и префронтальной коры 28

1.3.4 Многоуровневая регуляция активности 5-НТ нейронов DRN 29

1.4 Кетамин как модулятор нейрональной активности и стресс-индуцированного поведения 32

1.4.1 Механизмы действия кетамина на клеточном и молекулярном уровнях 33

1.4.2 Действие кетамина на 5-НТ систему 35

1.5 Оптогенетическая модуляция активности нейронных цепей как инструмент исследования механизмов стресс-индуцированного поведения 36

1.5.1 Оптогенетика как метод установления функциональной значимости нейрональных популяций 36

1.5.2 Оптогенетический контроль активности нейрональных популяций: опсины и системы доставки 37

1.5.3 Применение оптогенетики для исследования стресс-индуцированного поведения и выбора копинг-стратегий 39

1.6 Заключение к обзору литературы 40

Глава 2. Материалы и методы 42

2.1 Экспериментальные животные....42
2.2 Тестирование пассивного поведенческого ответа в тесте подвешивание за хвост42
2.3 Тест «подвешивание за хвост» после введения кетамина....42
2.4 Наработка вирусных векторов....43
2.4.1 Векторы, активирующие глутаматергические нейроны....44
2.4.2 Векторы, ингибирующие 5-НТ нейроны....44
2.4.3 Определение титра вирусных частиц....45
2.5 Отработка координат введения вирусных векторов и эффективности оптостимуляции....46
2.5.1 Отработка введения вирусных конструкций и оптогенетической стимуляции дорсального гиппокампа....46
2.5.2 Отработка стереотаксических координат для введения вирусов в дорсальное ядро шва среднего мозга....48
2.5.3 Оптогенетическое ингибирование 5-НТ нейронов DRN взрослых животных49
2.6 Введение вирусных частиц в мозг взрослых животных....50
2.7 Вживление оптоволоконной канюли....50
2.8 Оптогенетическое воздействие в тесте «подвешивание за хвост»....51
2.9 Иммуноферментный анализ уровня кортикостерона....53
2.10 Анализ уровня мРНК....53
2.11 Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга....54
2.12 Статистическая обработка результатов....56
Глава 3. Результаты....57
3.1 Влияние субанестетической дозы кетамина на поведение и активность нейронов головного мозга в условиях острого стресса....57
3.1.1 Влияние кетамина на поведенческий ответ в тесте «подвешивание за хвост» 57
3.1.2 Уровень кортикостерона в плазме крови....57
3.1.3 Уровни мРНК гена c-fos в отделах головного мозга....58
3.1.4 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах ПФК....59

3.1.5 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах гиппокампа 61

3.1.6 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах DRN среднего мозга 62

3.2 Роль активности нейронов дорсального гиппокампа в формировании пассивного поведенческого ответа и его предотвращение кетамином 64

3.2.1 Влияние оптогенетической активации нейронов дорсального гиппокампа на пассивный поведенческий ответ крыс в тесте «подвешивание за хвост» 64

3.2.2 Экспрессия белка c-Fos в нейронах гиппокампа после оптостимуляции во время острого неизбегаемого стресса 65

3.2.3 Влияние кетамина на пассивный поведенческий ответ, вызванный оптостимуляцией дорсального гиппокампа, в тесте «подвешивание за хвост» 66

3.2.4 Влияние кетамина на экспрессию мРНК гена *c-fos* и белка c-Fos в гиппокампе при оптостимуляции 67

3.3 Роль активности 5-НТ нейронов DRN в модуляции поведенческого ответа кетамином 68

3.3.1 Оптогенетическое ингибирование 5-НТ нейронов DRN: первичная валидация метода 68

3.3.2 Количественная оценка специфичности экспрессии вирусных векторов в 5-НТ нейронах DRN 70

3.3.3 Влияние оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов DRN на модулирующий эффект кетамина в тесте «подвешивание за хвост» 71

3.3.4 Влияние оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов DRN на экспрессию c-Fos в DRN после теста «подвешивание за хвост» с предварительным введением кетамина 72

Глава 4. Обсуждение 75

Заключение 87

Выводы 89

Список сокращений 90

Список литературы 92

Введение

Актуальность темы исследования

Способность нервной системы к быстрой реорганизации поведения в ответ на острый стресс является фундаментальным механизмом адаптации. Острый стрессовый ответ не только мобилизует ресурсы организма для немедленного реагирования на угрозу, но и запускает каскады нейропластичности, обеспечивающие долговременную адаптацию и формирование устойчивости к будущим стрессорам [Hermans, Hendler, Kalisch, 2025]. Современные исследования показывают, что острый стресс вызывает не просто активацию отдельных структур мозга, а глубокую реорганизацию функциональных сетей. В ответ на острый стрессор происходит временное разобщение межрегиональных связей, но затем не возврат к исходному состоянию, а формирование новой сетевой конфигурации [Durieux и др., 2024; Escobedo и др., 2022]. Каким образом конкретные нейрональные популяции управляют переходом от стресс-индуцированного разобщения сетей к новому функциональному состоянию и какие механизмы определяют выбор между активной и пассивной копинг-стратегией, остаётся малоизученным. Существуют свидетельства того, что этот выбор контролируется специализированными нейрональными популяциями, расположенными преимущественно в среднем мозге, гипоталамусе и префронтальной коре (ПФК) [Ahmadlou и др., 2023; Escobedo и др., 2022; Keay, Bandler, 2001]. Значительно меньше известно о вкладе в данный процесс нейронов гиппокампа и дорсального ядра шва (DRN) – структур, которые активно вовлекаются в стресс-ответ, но роль которых в переключении копинг-стратегий (то есть в выборе между активным и пассивным поведенческим ответом на стрессор) остаётся невыясненной.

Уникальную возможность для экспериментального исследования этих механизмов предоставляет субанестетическая доза кетамина – антагониста NMDA-рецепторов глутамата. Показано, что однократное введение кетамина способно вызывать быстрое и выраженное снижение продолжительности пассивного поведенческого ответа у животных в тестах подвешивания за хвост и принудительного плавания [Fukumoto, Iijima, Chaki, 2016; Gigliucci и др., 2013; Maeng и др., 2008]. Выраженность и стабильность этого эффекта неодинаковы в разных условиях и, по современным представлениям, могут определяться исходным уровнем активности нейрональных цепей [Chen и др., 2024]. Однако остаётся неясным, через какие именно нейрональные популяции реализуется данное влияние.

На клеточно-молекулярном уровне эффект кетамина связывают с блокадой NMDA-рецепторов на ГАМК-ергических интернейронах, что приводит к растормаживанию

глутаматергической передачи и усилению активации AMPA-рецепторов на пирамидных нейронах [Aleksandrova, Phillips, 2021; Deyama, Kaneda, 2023]. Запускаемый этим каскад активации mTOR-сигнального пути и усиления синтеза BDNF и синаптических белков завершается быстрым синаптогенезом в ПФК и гиппокампе [Li и др., 2010; Zhou и др., 2014], а фармакологическая блокада AMPA-рецепторов устраняет поведенческие эффекты кетамина [Maeng и др., 2008]. Тем не менее, подобная трактовка, сосредоточенная преимущественно на молекулярных каскадах в отдельных структурах, оказывается недостаточной для полного понимания его действия. Остаётся нерешённым вопрос о том, изменение активности каких именно нейрональных популяций в этих структурах критично для переключения копинг-стратегии. Среди таких популяций особый интерес представляют нейроны дорсального гиппокампа и DRN – двух областей, чья роль в эффектах кетамина изучена лишь фрагментарно.

Гиппокамп – структура, которая вовлечена в регуляцию поведенческого ответа на стресс и стресс-индуцированную пластичность [Hayes и др., 2017; Roddy и др., 2019]. Кетамин, как известно, влияет на нейронную пластичность и функциональную активность гиппокампа, однако большинство исследований рассматривают его как единую структуру [Evans и др., 2024; Zhang и др., 2023]. Между тем гиппокамп функционально гетерогенен: дорсальный отдел преимущественно участвует в когнитивных процессах (память, пространственная навигация), тогда как вентральный – в регуляции настроения и тревожности [Grigoryan, Segal, 2016; Guliaeva, 2013]. В последние годы появляются данные, подтверждающие, что дорсальный гиппокамп способен оказывать существенное влияние на эмоциональное поведение, обеспечивая связь между когнитивной и аффективной сферами [Besnard, Miller, Sahay, 2020; Luchetti и др., 2020; Zhang и др., 2019c].

Особое значение в этом контексте имеют пирамидные глутаматергические нейроны дорсального поля CA1 (dCA1), формирующие основные выходные проекции гиппокампа. Через проекции в медиальную префронтальную кору (мПФК), ретросплениальную кору, поясную извилину и латеральную септальную область эти нейроны могут опосредованно влиять на активность лимбических структур, включая миндалину и гипоталамус, участвующих в регуляции стресс-ответа [Tao и др., 2021]. Таким образом, dCA1 рассматривается как возможное звено, связывающее когнитивные и эмоциональные сети, однако функциональная значимость этих связей для регуляции поведения при стрессе остаётся слабо изученной. В частности, остаётся открытым вопрос, является ли прямая активация этих нейронов достаточным условием для модуляции поведенческого ответа при остром стрессе и в какой степени изменение их активности необходимо для реализации эффекта кетамина.

Не менее значимым направлением является исследование роли серотонинергических (5-НТ-ергических) нейронов DRN – ключевого модуляторного центра, тесно связанного с гиппокампом и ПФК. Известно, что кетамин повышает активность 5-НТ-ергических нейронов DRN [Fukumoto и др., 2018; Gerhard и др., 2020] и увеличивает внеклеточный уровень 5-НТ в ПФК [Ago и др., 2019; López-Gil и др., 2019], однако остаётся неясным, являются ли эти эффекты причиной переключения копинг-стратегии или сопутствующим явлением. Данные литературы противоречивы: одни работы указывают на ослабление долговременных эффектов кетамина при истощении 5-НТ [Fukumoto, Iijima, Chaki, 2014; Jardin и др., 2016], другие не обнаруживают значимого влияния на острые поведенческие проявления [Gigliucci и др., 2013]. Кроме того, сложная внутренняя организация DRN, включающая взаимодействие 5-НТ-ергических и ГАМК-ергических нейронов, усложняет интерпретацию данных о его активности [Challis и др., 2013]. Следовательно, принципиально важно определить, является ли сохранение тонической активности 5-НТ-ергических нейронов DRN необходимым условием для реализации модулирующего влияния кетамина на выбор копинг-стратегии.

Для решения этих вопросов требуются методы, обеспечивающие прямое и избирательное управление активностью отдельных типов нейронов *in vivo* в реальном времени. В этом контексте оптогенетика предоставляет уникальную возможность перехода от корреляционных наблюдений к установлению причинно-следственных связей между активностью нейронных популяций и поведенческим эффектом [Fakhoury, 2021; Lin и др., 2022]. Применение оптогенетических подходов в сочетании с кетамином даёт возможность не только уточнить роль отдельных нейрональных популяций в переключении копинг-стратегий, но и выявить принципиальные условия, при которых это переключение становится возможным.

Цель и задачи исследования

Целью работы является изучение действия субанестетической дозы кетамина у животных в условиях острого стресса и модуляции его эффекта оптогенетическим воздействием на активность глутаматергических нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа и 5-НТ-ергических нейронов DRN.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать действие субанестетической дозы кетамина у интактных крыс в условиях острого стресса, вызванного подвешиванием за хвост, на время

неподвижности, уровень кортикостерона в крови и экспрессию белка c-Fos в ключевых отделах головного мозга;

2. Изучить влияние субанестетической дозы кетамина на время неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» и экспрессию c-Fos при оптогенетической активации глутаматергических нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа;
3. Исследовать влияние оптогенетического подавления активности 5-HT-ергических нейронов DRN на эффект субанестетической дозы кетамина в тесте «подвешивание за хвост» и на кетамин-индуцированную экспрессию c-Fos в DRN.

Научная новизна работы

Научная новизна исследования заключается в получении новых данных, расширяющих понимание механизмов модулирующего влияния субанестетической дозы кетамина на поведенческий ответ при остром стрессе. Впервые на интактных животных проведена оценка действия кетамина на активность нескольких ключевых структур мозга, что выявило регион-специфичность и контекст-зависимость нейронального ответа: избирательную активацию префронтальной коры, потенцирование стресс-индуцированной активации гиппокампа и DRN на фоне подавления стресс-индуцированной гиперактивации миндалины и других структур ствола мозга.

Впервые с помощью прямой оптогенетической стимуляции установлена причинно-следственная связь между активацией глутаматергических нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа и увеличением продолжительности пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», а также показана способность кетамина предотвращать развитие этого эффекта.

Кроме того, впервые выявлено, что активность 5-HT-ергических нейронов DRN необходима для уменьшения пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», вызванного кетамином, тогда как их подавление, наоборот, увеличивает этот поведенческий ответ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа вносит вклад в современные представления о нейробиологических механизмах регуляции поведенческого ответа на острый стресс и модуляции этого ответа кетамином. Полученные данные конкретизируют и развивают ключевую идею о контекст-

зависимости действия кетамина, экспериментально демонстрируя, что конечный нейробиологический и поведенческий эффект определяется взаимодействием препарата с текущим функциональным состоянием лимбико-кортикальной сети. Это углубляет теоретические модели, описывающие взаимодействие глутаматергической и 5-НТ-ергической систем в регуляции поведенческих реакций на стресс.

Практическая значимость исследования определяется выявленной зависимостью эффекта кетамина от исходной активности специфических нейрональных популяций, что обосновывает необходимость учёта функционального состояния мозга при интерпретации экспериментальных данных. Полученные результаты указывают на новые потенциальные мишени для направленной модуляции поведенческого ответа на стресс, что открывает перспективы для разработки подходов к коррекции стресс-индуцированных состояний с использованием оптогенетических и фармакологических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Введение крысам субанестетической дозы кетамина снижает продолжительность пассивного поведенческого ответа на острый стресс в тесте "подвешивание за хвост", что связано с активацией нейронов префронтальной коры мозга, потенциацией гиппокампа и дорсального ядра шва (DRN), подавлением активности нейронов миндалины и ствола мозга и снижением уровня кортикостерона;

2. Введение кетамина предотвращает усиление замирания, вызванное оптогенетической активацией глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа при остром неизбегаемом стрессе;

3. Оптогенетическое подавление серотонинергических нейронов DRN блокирует кетамин-индуцированную активацию нейрональной сети ядра и увеличивает продолжительность замирания крыс в тесте "подвешивание за хвост", что свидетельствует об участии данной нейрональной популяции в регуляции поведенческого ответа крыс на острый неизбегаемый стресс и эффекте кетамина на него.

Степень достоверности

Экспериментальные данные получены с использованием современных методологических подходов (оптогенетика, иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, ПЦР в реальном времени) на адекватной модели интактных животных. Формирование выборок проводилось с соблюдением этических норм и принципов

минимизации количества животных, необходимого для полноценного анализа. Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с использованием соответствующих методов (t-критерий Стьюдента, двухфакторный дисперсионный анализ, апостериорный анализ по Фишеру, корреляционный анализ). Научные выводы обоснованы и аргументированы. Совокупность этих подходов обеспечивает достоверность результатов исследования.

Апробация работы

Результаты работы вошли в отчеты по грантам РНФ и РФФИ, а также были представлены на всероссийских и международных научных конференциях:

1. **Дрозд, У. С.** Оптогенетическая стимуляция повышает экспрессию антиапоптозного белка Bcl-xL в глутаматергических нейронах гиппокампа // Материалы 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016 (Новосибирск 2016 г.), С. 74.
2. Dygalo N. N., Lanshakov D. A., **Drozd U. S.,** Sukhareva E. V., Bulygina V. V., Kalinina T. S. Optogenetic activation of the CA1 hippocampal pyramidal neurons induces a depressive-like behavioral phenotype // European Neuropsychopharmacology. – 2016. – Т. 2. – №26. – С. 277-278.
3. **Дрозд, У. С.** Экспрессия антиапоптозного белка Bcl-xL в глутаматергических нейронах гиппокампа при их оптогенетической стимуляции // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 25-28 апреля 2017 г.) Т. 4: Биология и фундаментальная медицина. —Томск, 2017. Т. 4, 46-48. Изд-во ТПУ.
4. **Дрозд, У. С.,** Ланшаков, Д. А. Оптогенетическая стимуляция глутаматергических нейронов гиппокампа усиливает проявление депрессивно-подобного поведения у крыс // МНСК-2017: Биология (Новосибирск 2017 г.), С. 60.
5. **Дрозд, У. С.,** Ланшаков, Д. А. Эффекты введения субанестетической дозы кетамина на экспрессию белка c-Fos в пирамидных нейронах префронтальной коры у крыс в условиях острого стресса // МНСК-2018: Биология (Новосибирск 2018г.), С. 83.
6. Дыгало Н. Н., Калинина, Т. С., **Дрозд, У. С.,** Сухарева, Е. В., Булыгина, В. В., Коншу, Д. А., Шишкина Г.Т., Ланшаков, Д. А. Особенности поведенческого и нейрохимического ответов на оптогенетическую и фармакологическую модуляцию активности глутаматергической нейротрансмиссии // Первая всероссийская конференция и школа с международным участием "Оптогенетика и оптофармакология" сборник научных

трудов. под общ. редакцией М.Л. Фирсова. Издательство: Ооо "Издательство ВВМ" (Санкт-Петербург, 2018), С. 29-30.

7. **Дрозд, У. С.,** Ланшаков Д. А., Дыгало Н. Н. Экспрессия белка раннего ответа c-fos в нейронах префронтальной коры и серотонинергических ядер среднего мозга после введения субанестетической дозы кетамина в условиях острого стресса // V международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «Open-Bio» (Кольцово 2018г.), С. 271-274.

8. Дыгало, Н. Н., Калинина Т. С., **Дрозд У. С.,** Сухарева Е. В., Булыгина В. В., Коншу Д. А., Шишкина Г. Т., Ланшаков Д. А. Особенности поведенческого и нейрохимического ответов на онтогенетическую и фармакологическую модуляцию активности глутаматергической нейротрансмиссии // Первая Всероссийская конференция и Школа с международным участием" Оптогенетика и оптофармакология" (Санкт-Петербург 2018 г.), С. 29-30.

9. **Drozd, U. S.,** Lanshakov, D. A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump // Summer School on Stress from Hans Selye’s original concept to recent advances (Санкт-Петербург 2019 г.) С.

10. Digalo, N. N., **Drozd U. S.,** Kalinina T. S., Sukhareva E. V., Bulygina V. V., Shishkina G. T., Lanshakov D. A. Subanesthetic dose of ketamine relieves depression-like behavior induced by optogenetic stimulation of the hippocampal pyramidal neurons // European Neuropsychopharmacology, 2019. Т. 29, С. 94.

11. **Дрозд, У. С.,** Ланшаков Д. А., Шабурова, Е. В., Дыгало Н. Н. Серотонинергические нейроны дорсального ядра шва принимают участие в механизме антидепрессантного действия кетамина // ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020 вторая Всероссийская научная конференция с международным участием и Школа по современным методам неинвазивного контроля нейрональной активности: сборник научных трудов. (Санкт-Петербург 2020г.) С. 19-20.

12. **Дрозд, У. С.** Активность серотонинергических нейронов дорсального ядра шва, влияющая на антидепрессантный эффект кетамина // МНСК-2020. Биология (Новосибирск 2020г.) С. 126-126.

13. **Drozd, U. S.,** Lanshakov, D. A., Dygalo N.N. Optogenetic inhibition of DRN serotoninergic neurons abolishes the antidepressant effect of ketamine // RUS NEUROCHEM 2022: Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества, (Санкт-Петербург 2022 г.).

Научные публикации

1. Ланшаков Д. А., **Дрозд У. С.,** Запара Т. А., Дыгало Н. Н. Введение оптогенетических векторов в мозг неонатальным животным для исследования функции нейронов в последующие периоды онтогенеза // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. – № 2. – С. 255–261.

2. Ланшаков Д. А., **Дрозд У. С.,** Дыгало Н. Н. Оптогенетическая активация нейрона повышает в нем уровень антиапоптозного белка Bcl-xL // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – №3. – С. 481-486. Перевод: Lanshakov D. A., Drozd U. S., Digalo N. N. Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in Neurons // Biochemistry (Moscow). – 2017. – Т. 82. – №3. – С. 340-344.

3. **Дрозд У. С.,** Шабурова Е. В., Дыгало Н. Н. Генетические подходы к изучению функций серотонинергических нейронов у животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №4. – С. 448-455. Перевод: **Drozd U. S.,** Shaburova E. V., Dygalo N. N. Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №4. – С. 448-455.

4. **Drozd, U. S.,** Lanshakov, D. A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump // Интегративная физиология. – 2020. – Т. 1. – №2. – С. 144-146.

5. **Дрозд У. С.,** Ланшаков Д. А., Дыгало Н. Н. Активность серотонинергических нейронов дорсального ядра шва необходима для проявления антидепрессантного действия кетамина // Нейрохимия. – 2023. – Т. 40. - №. 3. – С. 273-280. Перевод: **Drozd U. S.,** Lanshakov D. A., Dygalo N. N. Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neuron Activity is Necessary for the Manifestation of the Antidepressant Effect of Ketamine // Neurochemical Journal. – 2023. – Т.17. – №3. – С. 394-401.

6. **Дрозд У.С.,** Фрик Я.А., Смагин А.В., Ланшаков Д.А. Проекционные нейроны префронтальной коры, их участие в формировании различных форм поведения и экспрессия в них нейротрофического фактора мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2024. – Т. 110. – №9. – С. 1316-1336. Перевод: **Drozd, U. S.,** Ya A. Frik, A. V. Smagin, and D. A. Lanshakov. Prefrontal Cortical Projection Neurons: Involvement in Shaping Different Types of Behaviors, BDNF Expression and Transport // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2024. – Т.60. - №5. – С. 2116-2133.

7. **Дрозд У.С.,** Сухарева Е.В., Булыгина В.В., Калинина Т.С., Дыгало Н.Н., Ланшаков Д.А. Кетамин снижает проявление депрессивно-подобного поведения, вызванное оптогенетической стимуляцией глутаматергических нейронов дорсального

гиппокампа // Нейрохимия. – 2025. – Т. 42. - №. 1. – С. 80-89. Перевод: **Drozd, U. S.,** Sukhareva, E. V., Bulygina, V. V., Kalinina, T. S., Dygalo, N. N., Lanshakov, D. A., Ketamine reverses depressive-like behavior induced by optogenetic stimulation of glutamatergic neurons in the dorsal hippocampus // Neurochemical Journal. – 2025. – Т.19. - №3. – С. 366-373.

8. **Drozd U.S.,** Bulygina V.V., Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Lanshakov D.A. Subanesthetic ketamine modulates region-specific neural and endocrine responses to acute stress in rats // Neuropharmacology. – 2027. – Т. 302. – С. 111231.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является результатом исследований автора, частично поддержана грантами № 18-315-00114 мол_а от Российского фонда фундаментальных исследований, 14-15-00115 и 14-15-00115-П от Российского научного фонда.

Автором были самостоятельно в полном объеме выполнены процедуры, необходимые для иммуногистохимического анализа экспрессии белков: транскардиальная перфузия, забор образцов головного мозга, изготовление срезов на криотоме, флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание, микроскопический анализ при помощи конфокального микроскопа, подсчет клеток на микрофотографиях. Автором выполнена статистическая обработка всех полученных данных. Автор также совместно с сотрудниками лаборатории участвовала в создании ленти- и аденоассоциированных вирусных частиц и их введении в мозг неонатальных и взрослых крыс; вживлении оптоволоконных канюль в мозг взрослых животных; экспериментах на наркотизированных животных по анализу эффектов оптогенетических воздействий; поведенческих экспериментах по анализу эффектов кетамина и оптогенетических воздействий, а также в анализе уровней мРНК и иммуноферментном анализе. Автор принимала активное участие в представлении результатов исследования на конференциях и в подготовке материалов для научных публикаций.

Благодарности

Автор выражает благодарность научным руководителям д.б.н. Дыгало Н.Н. и к.б.н. Ланшакову Д.А. и сотрудникам лаборатории: д.б.н. Калининой Т.С., к.б.н. Комышевой Н.П., к.б.н. Булыгиной В.В., к.б.н. Банновой А.В., Рябчиковой И.А. и Краснопеевой Л.А., а также бывшим сотрудникам лаборатории к.б.н. Сухаревой Е.В. и Шабуровой Е.В. за помощь в выполнении исследования.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Острый стресс и копинг-стратегии

Способность реагировать на внезапные изменения внешней среды является фундаментальным свойством всех живых организмов. У млекопитающих эта способность реализуется через острый стрессовый ответ – эволюционно закреплённый комплекс нейрональных, эндокринных и поведенческих реакций, направленных на мобилизацию ресурсов организма для преодоления угрозы [Bracha, 2004]. Вопреки упрощённым представлениям о стрессе как о «перегрузке» систем, современные данные указывают на то, что острый стрессовый ответ представляет собой тонко организованный и в значительной степени адаптивный процесс [Hermans, Hendler, Kalisch, 2025]. Выделяемые при остром стрессе глюкокортикоиды и катехоламины являются не просто «маркерами стресса», но сигнальными молекулами, координирующими перераспределение энергии, модуляцию синаптической пластичности и консолидацию памяти о стрессовом опыте. Эти процессы обеспечивают более эффективный ответ на будущие угрозы. Таким образом, острый стресс следует рассматривать не как патологический процесс, а как нормальный физиологический механизм, патологизация которого наступает лишь при нарушении его временных параметров или невозможности восстановления.

Принципиальное значение имеет разграничение острого, повторного и хронического стресса. Хотя все три типа опираются на одни и те же нейроэндокринные оси (симпато-адреналовую и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую (ГГН)), их физиологические исходы и нейробиологические последствия различаются качественно [McEwen, 2007]. В отличие от острого адаптивного ответа, хроническая или повторная активация стресс-систем приводит к аллостатической нагрузке – кумулятивному износу, выражающемуся в структурной реорганизации лимбических структур: атрофии дендритов пирамидных нейронов области CA3 гиппокампа, снижении нейрогенеза в зубчатой извилине (DG) и изменении экспрессии глутаматных рецепторов в ПФК [Conrad и др., 1999; Joëls, Baram, 2009]. Эти изменения не воспроизводятся при однократном воздействии, что подчёркивает принципиальное различие между острым стрессовым эпизодом и хроническим стрессовым состоянием.

Ответ на острый стресс в значительной степени определяется возможностью контроля над стрессором: животные по-разному реагируют на избегаемый и неизбегаемый стресс [Seligman, Maier, 1967]. При избегаемом стрессе поведенческий ответ однозначно направлен на устранение угрозы, и успешное избегание само по себе является адаптивным

исходом. При неизбегаемом стрессе животное лишено этой возможности, и адаптивное поведение сводится к выбору стратегии, направленной на минимизацию его последствий. Именно в условиях отсутствия контроля над стимулом поведенческий ответ структурируется вокруг дихотомии активной и пассивной копинг-стратегий – двух стратегий совладания со стрессом, различающихся по направленности поведенческого паттерна. Активная копинг-стратегия включает попытки воздействовать на стрессор или избежать его, тогда как пассивная копинг-стратегия представляет собой энергосберегающий режим, при котором животное сокращает активные попытки воздействия на стрессор и переходит к иммобилизации. Примером таких условий служат тест принудительного плавания и тест подвешивания за хвост, в которых животное помещается в ситуацию неизбегаемого стресса. В обоих тестах продолжительность неподвижности рассматривается как количественный индекс пассивного поведенческого ответа, тогда как попытки выбраться или освободиться отражают активный поведенческий ответ [Commons и др., 2017; Molendijk, De Kloet, 2015]. Следует отметить, что исторически неподвижность в этих тестах интерпретировалась как «поведенческое отчаяние» или «депрессивно-подобное поведение» [Porsolt, Le Pichon, Jalfre, 1977; Steru и др., 1985], однако в современной литературе эта трактовка пересматривается: иммобилизация в условиях острого неизбегаемого стресса все чаще считается исследователями адаптивной энергосберегающей стратегией, а не депрессивно-подобным состоянием [Armario, 2021; Commons и др., 2017; Molendijk, De Kloet, 2015].

Структурно-функциональные корреляты копинг-стратегий локализованы на уровне конкретных нейрональных цепей. Реализация активной копинг-стратегии сопряжена с активностью дорсолатерального периакведуктального серого вещества (PAG), дофаминергической передачей в прилежащем ядре (NAc) и префронтально-периакведуктальными проекциями, тогда как пассивная копинг-стратегия опосредуется вентролатеральным PAG, латеральной уздечкой (LHb) и нисходящими префронтальными влияниями [Cerniauskas и др., 2019; Coffey и др., 2020; Cui и др., 2020; Johnson и др., 2022]. Однако на системном уровне острый стресс вызывает не просто активацию отдельных структур, а перестройку паттернов функциональной связанности между ними. В частности, показано, что острый стресс усиливает активность и связность сети значимости (salience network), включающей переднюю островковую кору и дорсальную переднюю поясную кору, что сопровождается перераспределением ресурсов между крупномасштабными сетями мозга [Luo и др., 2026]. Динамика этих перестроек носит фазный характер: период острой реакции на стрессор сменяется восстановительным периодом, во время которого формируется новая сетевая конфигурация, не совпадающая с исходным состоянием

[Durieux и др., 2024]. В этот ответ вовлекается широкий спектр структур: от стволовых ядер (голубое пятно, ядра шва) до кортикальных областей (ПФК, островковая кора) и подкорковых образований (миндалина, ядро ложа терминальной полоски, гипоталамус). Совокупная активация этих структур формирует тревогу, настороженность и перестройку когнитивных процессов, что в совокупности определяет выбор копинг-стратегии.

Особое место среди структур, вовлечённых в стресс-ответ, занимают гиппокамп и 5-НТ-ергическая система. Гиппокамп, с одной стороны, является мишенью гормонов стресса и участвует в негативной обратной связи ГГН-оси, ограничивая продолжительность гормонального ответа [Herman и др., 1995; Jacobson, Sapolsky, 1991]; с другой – через обширные связи с гипоталамусом, ПФК и островковой корой он кодирует контекст стрессового воздействия, что критически важно для выбора копинг-стратегии [Anagnostaras, Gale, Fanselow, 2001; Fanselow, 2000]. 5-НТ-ергическая система, в свою очередь, активируется на самых ранних этапах стресс-ответа и модулирует как гормональные, так и поведенческие его компоненты. Разные подтипы 5-НТ рецепторов дифференцированно поддерживают пассивный и активный поведенческий ответ [De Boer, Buwalda, Koolhaas, 2017; Jørgensen и др., 1998; Lowry, 2002; Mikkelsen, Hay-Schmidt, Kiss, 2004; Valentino, Lucki, Van Bockstaele, 2010]. Понимание того, как именно эти две системы организованы, необходимо для выяснения их конкретного вклада в переключение копинг-стратегий при остром стрессе. Рассмотрению структурно-функциональной организации гиппокампа и 5-НТ-ергической системы в контексте регуляции копинг-стратегий при остром стрессе посвящены следующие разделы настоящей главы.

1.2 Роль гиппокампа в регуляции психоэмоциональных реакций

Гиппокамп – парная структура, расположенная в медиальной височной доле больших полушарий и являющаяся частью лимбической системы. Лимбическая система объединяет ряд корковых и подкорковых образований, которые участвуют в регуляции вегетативных функций, формировании мотиваций и эмоций, организации памяти и обучении [Kamali и др., 2023]. Как один из центральных узлов лимбической системы, гиппокамп вовлечён в реализацию этих процессов. Традиционно его рассматривают прежде всего, как ключевую структуру, обеспечивающую кодирование, консолидацию и извлечение воспоминаний, а также пространственную навигацию [Lisman и др., 2017]. Однако накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что функции гиппокампа выходят далеко за пределы когнитивной сферы. Способность извлекать прошлый опыт и на его основе оценивать контекст текущей ситуации критически важна для формирования

поведенческого ответа на стрессор: знакомый и предсказуемый контекст позволяет выбирать эффективные копинг-стратегии, тогда как новизна или рассогласование с прошлым опытом запускают реакции настороженности и тревоги. Сама по себе такая настороженность не является дезадаптивной: в потенциально угрожающей среде она, напротив, повышает готовность к реагированию. Эта реакция приобретает дезадаптивный характер в тех случаях, когда прошлый опыт плохо соответствует текущему контексту и настороженность становится чрезмерной или неоправданной [Krugers, Joëls, 2025; Surget, Belzung, 2022]. Кроме того, гиппокамп непосредственно участвует в регуляции эмоциональных состояний, влияя на уровень тревожности и выраженность стресс-ответа [Ghasemi и др., 2022; Van Der Veldt и др., 2025].

Важно, что когнитивная и эмоциональная функции в значительной степени разделены между дорсальным и вентральным отделами гиппокампа: дорсальный традиционно связывают с пространственной памятью и контекстуальным кодированием, тогда как вентральный – с регуляцией эмоций, мотивации и стресс-ответом [Grigoryan, Segal, 2016; Gulyaeva, 2013]. В основе этой специализации лежат различия в афферентных и эфферентных связях, а также разная реакция отделов на стрессорные воздействия [Maggio, Segal, 2009; Segal, Richter-Levin, Maggio, 2010]. Несмотря на то, что большинство исследований сосредоточено на вентральном гиппокампе, накапливаются данные о том, что дорсальный гиппокамп также вносит вклад в эмоциональное поведение через кодирование контекстуальной информации и проекции в структуры, участвующие в выборе копинг-стратегий [Yoon и др., 2024; Chen и др., 2019]. Для понимания того, каким образом гиппокамп участвует в переключении между активным и пассивным копингом при остром стрессе, необходимо детально рассмотреть структурно-функциональную организацию его отделов от клеточной архитектоники отдельных полей до топографии внешних связей.

1.2.1 Структурно-функциональная организация отделов гиппокампа

В структуре гиппокампальной формации выделяют несколько областей: аммонов рог (поля CA1–3), субикулум и DG. Основные нейрональные элементы этих областей представлены глутаматергическими клетками: в полях CA1-3 – это пирамидные нейроны, а в зубчатой извилине – гранулярные. Все отделы гиппокампа также содержат разнообразные популяции тормозных нейронов, регулирующих активность локальных контуров [Shi и др., 2023]. Ниже области гиппокампа рассматриваются в порядке последовательной обработки информации, поступающей из энторинальной коры.

DG получает основные входящие сигналы от энторинальной коры и выполняет функцию разделения паттернов – преобразования схожих входящих сигналов в различающиеся выходные паттерны активности, что позволяет различать близкие по характеристикам события и предотвращает смешение воспоминаний [Borzello и др., 2023; Hainmueller, Bartos, 2020]. Взрослый нейрогенез в DG обеспечивает гибкость поведенческого ответа, позволяя животному подстраивать уровень осторожности к предсказуемости угрозы в окружающей среде [Cameron, Schoenfeld, 2018; Kempermann, 2022]. Острый стресс кратковременно подавляет продукцию новых нейронов. При хроническом стрессе стойкое снижение нейрогенеза, напротив, может служить адаптивным механизмом, ограничивающим стресс-ответ и стабилизирующим поведение в условиях продолжающейся угрозы [Cameron, Schoenfeld, 2018]. Обработанная в DG информация передаётся в поле CA3 через моховидные волокна (Рис. 1) [Hainmueller, Bartos, 2020].

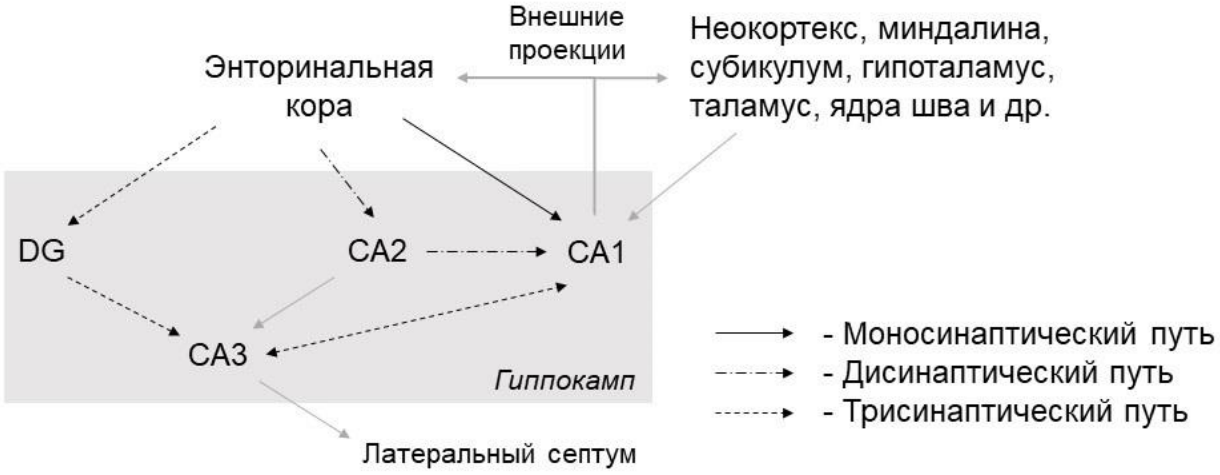


Рис. 1 Схематическое изображение основных внешних и внутренних связей отделов гиппокампа.

Поле CA3 получает входы от DG через моховидные волокна и от энторинальной коры, образуя обширную сеть рекуррентных связей между пирамидными нейронами, которая обеспечивает автоассоциативное завершение паттернов памяти [Li и др., 2024b; Sammons и др., 2024]. Обработанная в CA3 информация передаётся в поле CA1 через коллатерали Шаффера [Cherubini, Miles, 2015]. Помимо внутригиппокампальных связей, пирамидные нейроны CA3 формируют проекции в латеральный септум, обладающие билатеральным характером и различающиеся по топографии между дорсальными и вентральными отделами (Рис. 1) [Besnard, Miller, Sahay, 2020; Lee и др., 2024].

Поле CA2, расположенное между CA3 и CA1, отличается особым молекулярным профилем и высокой устойчивостью к клеточной гибели [Bienkowski, 2023; Robert и др.,

2018]; его пирамидные нейроны играют роль в обработке социальных и контекстуальных аспектов памяти [Oliva, Fernandez-Ruiz, Karaba, 2023; Shinohara, Kohara, 2023].

Поле CA1 является завершающим и главным эфферентным звеном гиппокампа, которое формирует наиболее мощные и разветвленные проекции за его пределы. Способность поля CA1 интегрировать многоуровневую информацию обеспечивается сложно организованной сетью, включающей пирамидные нейроны, гигантские возбуждающие клетки, а также разнообразные популяции интернейронов, осуществляющих пространственно-временной контроль активности [Abbaspoor, Hoffman, 2024; Lebedeva и др., 2023]. Ключевым для функционирования поля CA1 является получение информации от энторинальной коры по трем параллельным путям: моносинаптическому (темпороаммоническому) [Mercier и др., 2022], дисинаптическому (через поле CA2) [Lopez-Rojas и др., 2022] и классическому трисинаптическому (через DG и поле CA3) (Рис. 1) [Farzaneh и др., 2018]. Такая организация позволяет полю CA1 сравнивать прямую сенсорную информацию о текущем состоянии среды с высоко-обработанными мнестическими паттернами, извлеченными из сети ассоциативной памяти поля CA3, что лежит в основе детекции новизны и контекстуального обновления памяти [Zhao и др., 2020].

В дополнение поле CA1 обширно иннервируется подкорковыми и корковыми областями, включая субикулум, поясную, теменную и височную кору, а также миндалину, септум, ядра таламуса, голубое пятно, ядра шва, супрамаммиллярное ядро и вентральную область покрышки (Рис. 1). Эти проекции оканчиваются как на апикальных и базальных дендритах пирамидных нейронов, так и на различных классах интернейронов, оказывая мощное модулирующее влияние на локальные цепи возбуждения и торможения посредством множества нейромедиаторных систем – глутамата, ГАМК, ацетилхолина, норадреналина, 5-НТ, дофамина и нейропептидов [Lee и др., 2024; Luo и др., 2019; Qiu и др., 2024; Su и др., 2023].

Важной особенностью распределения этих проекций являются выраженные отличия в иннервации вентрального и дорсального отделов гиппокампа, лежащие в основе их функциональной специализации. Так, вентральное поле CA1 (vCA1) в основном получает входы через вентромедиальные части энторинальной коры от инфралимбической и прелимбической коры, а также базолатерального комплекса миндалины и гипоталамуса. Напротив, дорсальное поле CA1 (dCA1) в большей степени интегрирует сигналы от передней поясной и ретросплениальной коры, которые поступают через дорсолатеральные отделы энторинальной коры [Grigoryan, Segal, 2016; Tao и др., 2021]. Кроме этого, для dCA1 характерны более интенсивные холинергическая и дофаминергическая иннервация, тогда

как концентрация норадреналина и 5-НТ выше в vCA1. Указанные различия определяют особенности обработки информации: dCA1 в большей степени специализировано на когнитивных и пространственных задачах, а vCA1 – на эмоциональных и мотивационных [Trompoukis, Papatheodoropoulos, 2020].

Итогом этой сложной интеграции становится формирование обширной системы эфферентных проекций, связывающих гиппокампальную формацию с множеством корковых и подкорковых структур. Ключевые из этих проекций направлены в субикулум и энторинальную кору, через которые гиппокампальный сигнал поступает в неокортекс. Кроме того, поле CA1 формирует прямые связи с миндалиной, мПФК, поясной и орбитофронтальной корой, а также с подкорковыми структурами, включая септум, ядра гипоталамуса, таламус, ядра шва и вентральной областью покрышки (VTA) (Рис. 1) [Tao и др., 2021]. Сходно с различиями во входящих связях, эфферентные проекции поля CA1 демонстрируют выраженную топографическую организацию. Эфференты dCA1 преимущественно проецируются в ПФК, ретросплениальную и теменную кору, а также в мамиллярные тела, тем самым интегрируя пространственные и когнитивные сигналы в сети навигации и эпизодической памяти [Tao и др., 2021]. vCA1 направляет выходы в миндалину, прилежащее ядро, медиальное септальное ядро и гипоталамус, связывая гиппокамп с лимбическими и мотивационными системами, которые регулируют эмоции, стрессовые реакции и социальное поведение [Gergues и др., 2020]. Таким образом, различия в афферентной и эфферентной организации dCA1 и vCA1 создают анатомическую основу для их дифференциальной вовлечённости в регуляцию стресс-ответа и выбор копинг-стратегий, что будет подробнее рассмотрено в следующем разделе.

1.2.2 Вовлечённость дорсального и вентрального гиппокампа в стресс-ответ и выбор копинг-стратегии

Неодинаковая вовлечённость дорсального и вентрального отделов гиппокампа в стресс-ответ становится особенно очевидной при анализе их реакции на острый стресс на уровне синаптической пластичности и нейроэндокринной регуляции. Ключевым подтверждением функциональной асимметрии служит то, что острый стресс (15-минутное плавание) оказывает противоположные эффекты на синаптическую пластичность в дорсальном и вентральном гиппокампе: в дорсальном отделе через активацию глюкокортикоидных рецепторов (ГР) долговременная потенциация (LTP) подавляется, а долговременная депрессия (LTD) усиливается, тогда как в вентральном отделе LTP, напротив, через активацию минералокортикоидных (МР) рецепторов усиливается, а LTD конвертируется в

медленную форму LTP [Maggio, Segal, 2009]. Иначе говоря, острый стресс повышает возбудимость вентрального гиппокампа и снижает возбудимость дорсального. На основе этих данных была предложена гипотеза «динамической маршрутизации», согласно которой стресс переключает функциональную связность гиппокампа с дорсально-кортикальной (подавляемой) на вентрально-амигдалярную (активируемую) через разную активацию ГР и МР [Segal, Richter-Levin, Maggio, 2010]. Эта гипотеза находит нейрохимическое подтверждение: при остром стрессе (электрический удар лапы) уровень кортикостерона повышается в дорсальном гиппокампе раньше (15–60 мин), чем в вентральном (90–105 мин), что отражает последовательную, а не одновременную активацию ГР-опосредованных процессов [Dorey и др., 2012]. Из этих данных следует, что стресс-ответ в гиппокампе не является единым процессом, а представляет собой временную последовательность функциональных переключений между дорсальным и вентральным отделами.

Дорсальный и вентральный гиппокамп также вносят разный вклад в регуляцию ГГН-оси. Оба отдела оказывают преимущественно ингибирующее влияние на ГГН-ось, однако реализуют его через разные пути и в разных условиях. Вентральный субикулум, как основной выход вентрального гиппокампа к гипоталамусу, является ключевым звеном быстрого ингибирования стресс-индуцированного выброса кортикостерона: его повреждение удлиняет гормональный ответ на острый стресс, тогда как повреждение полей vCA1 и vCA3 без затрагивания субикулума не изменяет этот ответ [Herman и др., 1995]. Дорсальный гиппокамп, напротив, участвует преимущественно в базальной регуляции ГГН-оси и не оказывает столь выраженного влияния на острый стресс-индуцированный ответ [Jankord, Herman, 2008]. Кроме того, ингибирование как дорсального, так и вентрального гиппокампа ослабляет вегетативные компоненты острого стресс-ответа (изменение давления, частоты сердечных сокращений), но не влияет на отставленные поведенческие последствия, что указывает на частично различные механизмы регуляции вегетативных и поведенческих компонентов стресс-ответа [Scopinho и др., 2013]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что функциональное переключение между дорсальным и вентральным отделами гиппокампа создаёт нейробиологическую основу для их разного вклада в выбор копинг-стратегии при остром стрессе [Segal, Richter-Levin, Maggio, 2010].

Помимо регуляции ГГН-оси, вклад вентрального гиппокампа в стресс-ответ и поведение опосредуется его связями с другими структурами мозга. Установлено несколько проекционных путей vCA1, вовлечённых в регуляцию эмоций и выбор копинг-стратегий [Gergues и др., 2020]. Во-первых, vCA1 содержит «клетки тревожности», проецирующиеся на латеральный гипоталамус и обеспечивающие анксиогенный ответ [Jimenez и др., 2018].

Во-вторых, vCA1 и базолатеральная миндалина (BLA) образуют двунаправленную связь. Проекция vCA1→BLA обеспечивает связь между памятью о месте и эмоциональной оценкой события при извлечении контекстуального страха [Xu и др., 2016]. В проекции BLA→vCA1 наблюдаются пластические изменения в зависимости от копинг-стратегии: усиление при активном избегании и ослабление при пассивном ответе; оптогенетическая стимуляция этого пути восстанавливает нормальное поведение при пассивности [Yang и др., 2016]. В-третьих, проекция вентрального гиппокампа на NAc напрямую модулирует направление копинг-ответа: её оптогенетическая стимуляция увеличивает иммобилизацию в тесте принудительного плавания, сдвигая поведение в сторону пассивного копинга [Bagot и др., 2015]. Таким образом, вентральный гиппокамп интегрирует контекстуальную и эмоционально окрашенную информацию, определяя направление поведенческого ответа. Хотя большинство приведённых данных получено на моделях хронического стресса, уже после острого стресса вентральный гиппокамп и BLA вносят разный вклад в стресс-ответ: вентральный гиппокамп поддерживает устойчивые изменения тревожного поведения, тогда как BLA участвует в стресс-сенситизации [Pennington и др., 2024].

В отличие от вентрального гиппокампа, роль его дорсальной части в регуляции стресс-ответа и выборе копинг-стратегии долгое время оставалась менее исследованной. Однако накапливаются данные, свидетельствующие о его непосредственном участии в обработке стрессорных сигналов и формировании адаптивного поведения при стрессе. Одним из ключевых подтверждений этого является существование в dCA1 нейронных популяций, селективно реагирующих на угрозу. Так, при предъявлении аверсивных (то есть связанных с угрозой или неприятным воздействием) стимулов, включая воздушную струю и электрическое раздражение хвоста, в dCA1 наблюдается активация субпопуляций пирамидных нейронов и интернейронов, не зависящая от пространственного положения животного [Barth и др., 2023]. Нейроны с наибольшим ответом на угрозу имеют повышенную базальную активность, чаще участвуют в эпизодах высокочастотной нейронной активности, связанных с консолидацией памяти, и образуют больше контактов с тормозными интернейронами. Таким образом, аверсивное воздействие перестраивает пространственную карту в dCA1, смещая её от зоны угрозы к области вознаграждения [Barth и др., 2023].

Сходные результаты получены при анализе активности нейронных ансамблей dCA1 во время острого стресса. Использование миниатюрной флуоресцентной микроскопии у свободно движущихся животных показало, что острая иммобилизация вызывает быструю и выраженную перестройку функциональной организации нейронной сети dCA1, проявляющуюся изменением паттернов совместной активности нейронов [Gerasimov и др.,

2024]. Через 3 часа после стресса активность ансамблей частично восстанавливается, а через 10 дней полностью возвращается к исходному состоянию, что указывает на наличие механизмов гомеостатической стабилизации гиппокампальной сети [Gerasimov и др., 2024]. Таким образом, реакция dCA1 на острый стресс реализуется не только на уровне отдельных нейронов, но и в виде обратимой перестройки активности целых нейронных ансамблей.

Перестройка активности dCA1 при стрессе тесно связана с действием глюкокортикоидов. Как отмечалось выше, острый стресс сопровождается активацией ГР в дорсальном гиппокампе и подавлением его синаптической пластичности [Maggio, Segal, 2009]. Одним из клеточных механизмов этого эффекта является усиление активности HCN1-каналов. Показано, что кортикостерон через активацию ГР увеличивает гиперполяризационно-активируемый катионный ток в пирамидных нейронах dCA1, что приводит к снижению их возбудимости [Kim и др., 2022]. Более того, глюкокортикоиды подавляют активность пирамидных нейронов преимущественно в поле CA1, практически не затрагивая нейроны CA3 и зубчатой извилины, что свидетельствует о повышенной чувствительности данного поля к стресс-индуцированным гормональным воздействиям [Li и др., 2024a]. Ключевая роль этого механизма подтверждается тем, что постстрессовое усиление активности HCN1-каналов снижает возбудимость нейронов dCA1, уменьшая их способность генерировать нервные импульсы, тогда как нокаут HCN1 предотвращает эти изменения и нормализует связанные со стрессом когнитивные нарушения [Kim, Kim, Michael, 2026]. Напротив, сверхэкспрессия HCN1 воспроизводит характерные последствия стрессового воздействия, включая нарушения пространственной рабочей памяти и процесс угасания условной реакции страха [Kim, Kim, Michael, 2026]. Таким образом, путь ГР – HCN1 – снижение возбудимости dCA1 представляет собой один из ключевых механизмов стресс-индуцированной перестройки функционирования дорсального гиппокампа.

Вместе с тем действие стресса на dCA1 не ограничивается подавлением нейрональной активности. В ответ на стрессорное воздействие в гиппокампе запускаются быстрые процессы синаптического ремоделирования, способствующие обновлению представлений о среде и формированию адаптивного поведения. Так, острый стресс вызывает быструю вставку Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, изменяя свойства возбуждающей передачи уже в течение первых часов после воздействия [Whitehead и др., 2013]. Дополнительный вклад в эти процессы вносит кортикотропин-рилизинг-фактор (CRF), который индуцирует как функциональную, так и структурную перестройку гиппокампальных синапсов, усиливая межнейронную коммуникацию в условиях стресса [Vandael и др., 2021]. Наряду с этим норадренергическая активация β-адренорецепторов способствует усилению возбудимости дорсального

гиппокампа и повышению эффективности пространственной обработки информации, что может иметь адаптивное значение в ситуациях, требующих быстрого ориентирования и выбора стратегии реагирования по типу «бей или беги» [Trompoukis, Miliou, Papatheodoropoulos, 2024]. Интересно, что острый стресс также изменяет свойства передачи в проекции CA3–CA1, снижая соотношение AMPA/NMDA-рецепторных токов, тогда как мемантин предотвращает как эти синаптические изменения, так и связанные с ними когнитивные нарушения [Torrisi и др., 2026]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что стресс-индуцированная перестройка dCA1 представляет собой результат взаимодействия нескольких параллельных механизмов, включающих как подавление возбудимости отдельных нейронов, так и динамическую модификацию синаптических контактов.

Особый интерес представляет роль dCA1 в выборе копинг-стратегий при неизбегаемом стрессе. Ключевым подтверждением участия дорсального гиппокампа в этом процессе является обнаружение функциональной цепи dCA1–мПФК, активность которой определяет характер поведенческого ответа на стрессорное воздействие [Yoon и др., 2024]. Активация данной проекции сопровождается усилением активного поведенческого ответа и является необходимым компонентом отсроченного антидепрессивного действия кетамина. При этом блокада рецептора TrkB устраняет долговременные поведенческие эффекты кетамина, не влияя на его острое действие, что указывает на вовлечение BDNF-зависимых механизмов пластичности в формирование устойчивых изменений копинга [Yoon и др., 2024].

Другие данные также свидетельствуют о том, что направление копинг-ответа определяется балансом возбуждения и торможения в локальных сетях области CA1. Так, снижение ГАМК-ергического торможения в dCA1 выраженно снижает пассивный поведенческий ответ в тесте принудительного плавания, тогда как усиление тормозной передачи приводит к противоположному результату и способствует формированию пассивного поведенческого ответа [Yoon и др., 2020]. Кроме того, показано, что формирование памяти о пережитом опыте беспомощности требует развития медленной формы долговременной потенциации в dCA1, зависящей от активации NMDA-рецепторов, глюкокортикоидных рецепторов и фосфорилирования субъединицы GluA1 [Jing и др., 2015]. Выраженность этих пластических изменений позволяет предсказывать уровень иммобилизации спустя сутки после стрессорного воздействия, что указывает на участие dCA1 в консолидации поведенческих последствий стресса.

Таким образом, dCA1 представляет собой не только центральный узел контекстуальной обработки информации, но и важный регулятор адаптивного поведения

при стрессе. Быстрая перестройка активности нейронных ансамблей, высокая чувствительность к глюкокортикоидам и выраженная способность к стресс-индуцированной синаптической пластичности позволяют dCA1 интегрировать информацию о внешней угрозе и внутреннем состоянии организма, участвуя в формировании копинг-стратегий. Накопленные данные свидетельствуют о том, что изменения активности и пластичности нейронов dCA1 способны определять направление поведенческого ответа на стрессорное воздействие, включая выбор между активными и пассивными формами реагирования. Однако остаётся неясным, является ли прямая активация нейронов dCA1 достаточной для изменения копинг-стратегии при остром стрессе.

1.3 Роль 5-НТергической системы в регуляции стресс-ответа и выборе копинг-стратегий

1.3.1 5-НТергическая система как регулятор адаптации к стрессу

5-НТ-ергическая система является одной из важнейших нейромодуляторных систем мозга, участвующих в регуляции эмоционального поведения, мотивации, обучения и адаптивного реагирования на изменения внешней среды. Основным источником 5-НТ в центральной нервной системе служат нейроны ядер шва, преимущественно дорсальное (DRN) и медиальное (MRN), которые формируют обширные восходящие проекции в структуры лимбической системы, включая гиппокамп, миндалевидное тело, ПФК и гипоталамус. Благодаря такому характеру организации 5-НТ-ергическая система занимает уникальное положение, позволяющее ей координировать работу нейронных сетей, вовлечённых в оценку значимости стимулов, формирование эмоциональных реакций и выбор поведенческой стратегии [Michelsen, Schmitz, Steinbusch, 2007; Muzerelle и др., 2016; Ren и др., 2018].

В отличие от систем быстрой синаптической передачи, 5-НТ выполняет преимущественно модуляторную функцию, регулируя возбудимость нейронов, эффективность синаптической передачи и процессы пластичности через широкий спектр рецепторов [Cools, Roberts, Robbins, 2008]. При этом влияние 5-НТ на поведение определяется не только уровнем его высвобождения, но и активностью конкретных 5-НТ-ергических популяций, особенностями их проекционных связей и состоянием целевых нейронных сетей [Doya, Miyazaki, Miyazaki, 2021; Ren и др., 2018].

В последние годы становится всё более очевидным, что 5-НТ-ергическая система не передаёт фиксированные сигналы, связанные с конкретными эмоциональными

состояниями, а участвует в гибкой настройке поведения в зависимости от контекста. Изменения активности 5-НТ-ергических нейронов наблюдаются при воздействии аверсивных стимулов различной модальности и сопровождаются перестройкой эмоциональных, когнитивных и вегетативных компонентов стресс-ответа [Cools, Roberts, Robbins, 2008]. В связи с этим 5-НТ рассматривается как один из ключевых факторов, обеспечивающих адаптацию поведения к изменяющимся условиям среды.

Особый интерес представляет участие 5-НТ-ергической системы в регуляции копинг-поведения. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что изменения 5-НТ-ергической передачи способны влиять на выбор между активными и пассивными стратегиями реагирования, определяя степень поведенческой гибкости и устойчивости к стрессорным воздействиям [Carhart-Harris, Nutt, 2017; Puglisi-Allegra, Andolina, 2015]. Таким образом, 5-НТ-ергическая система может рассматриваться как один из центральных механизмов, обеспечивающих интеграцию когнитивных и эмоциональных компонентов стресс-ответа и формирование адаптивного поведения.

1.3.2 Дорсальное и медиальное ядра шва: функциональная специализация 5-НТ-ергических путей

Центральное место в организации 5-НТ-ергической регуляции стресс-ответа занимают DRN и MRN. Несмотря на общую способность синтезировать и высвобождать 5-НТ, эти ядра существенно различаются по характеру афферентных и эфферентных связей, что определяет их функциональную специализацию [Jacobs, Azmitia, 1992; Muzerelle и др., 2016].

MRN преимущественно иннервирует медиальные отделы переднего мозга, включая гиппокамп и медиальную префронтальную кору, тогда как DRN обеспечивает значительно более широкую иннервацию, охватывая гиппокамп, миндалину, прилежащее ядро, гипоталамус, таламус и обширные области коры [Muzerelle и др., 2016]. Такая организация позволяет этим ядрам координировать активность распределённых лимбических сетей, участвующих в обработке эмоционально значимых стимулов и формировании поведенческих реакций.

Современные исследования показывают, что DRN и MRN выполняют различные, но взаимосвязанные функции в регуляции реакции на острый стресс. 5-НТ-ергические нейроны DRN способны быстро изменять активность в ответ на воздействие аверсивных стимулов: так, ноцицептивные раздражители вызывают фазические изменения частоты разрядов различных групп 5-НТ-нейронов DRN, причём направление ответа (возбуждение

или торможение) зависит от электрофизиологического фенотипа нейрона [Schweimer, Ungless, 2010]. При этом характер активации DRN зависит от контекста ситуации: различные субпопуляции 5-НТ-ергических нейронов избирательно реагируют на стрессорные воздействия разной модальности, и их активация может способствовать как активному преодолению стрессора, так и формированию избегательного поведения [Hale, Shekhar, Lowry, 2012; Nishitani и др., 2019a].

Особенно важным оказалось то, что различные 5-НТ-ергические проекции DRN могут оказывать противоположное влияние на эмоциональное состояние и поведение. Так, активация нейронов DRN, проецирующихся в миндалину, способствует усилению тревожности и избегающего поведения, тогда как стимуляция проекций в ПФК ассоциирована с более активными формами реагирования [Ren и др., 2018]. Аналогично, дисбаланс между активностью DRN и MRN сопровождается изменением эмоционального фенотипа: снижение относительной активности DRN и усиление активности MRN ассоциированы с повышенной тревожностью и депрессивно-подобным поведением [Teissier и др., 2015a].

Таким образом, функциональное значение 5-НТ-ергической системы определяется не столько общим уровнем активности ядер шва, сколько особенностями вовлечения отдельных проекционных путей. Это делает необходимым рассмотрение механизмов, посредством которых 5-НТ влияет на активность конкретных структур-мишеней, участвующих в выборе копинг-стратегий.

1.3.3 5-НТ-ергическая модуляция гиппокампа и префронтальной коры

Среди многочисленных мишеней 5-НТ-ергической системы особый интерес представляют гиппокамп и префронтальная кора, играющие ключевую роль в оценке контекста стрессовой ситуации, принятии решений и выборе поведенческой стратегии. Оба региона получают плотную 5-НТ-ергическую иннервацию из ядер шва и содержат широкий спектр 5-НТ-рецепторов, обеспечивающих многообразие эффектов 5-НТ на локальные нейронные сети [Andrade, Haj-Dahmane, 2013; Pehrson, Sanchez, 2015].

В гиппокампе доминирующим эффектом 5-НТ является снижение возбудимости пирамидных нейронов и ограничение чрезмерной глутаматергической активности [Ferraro и др., 1997]. Важную роль в этом процессе играют постсинаптические 5-HT_{1A}-рецепторы, активация которых вызывает гиперполяризацию пирамидных клеток [Andrade, Nicoll, 1987]. Одновременно другие подтипы рецепторов (5-HT_{1B}, 5-$HT_{2A/C}$, 5-HT_3, 5-HT_6 и 5-HT_7)

способны усиливать активность тормозных интернейронов, дополнительно регулируя баланс возбуждения и торможения в гиппокампальной сети [Dale и др., 2014].

В ПФК действие 5-НТ более сложное и бимодальное: он может как подавлять, так и облегчать активность пирамидных нейронов [Leiser и др., 2015]. Тормозной компонент связан преимущественно с активацией 5-$HT_{1A/1B}$ рецепторов на пирамидных клетках и 5-HT_3 рецепторов на интернейронах [Celada, Puig, Artigas, 2013]. Возбуждающий компонент реализуется через 5-HT_{2A} рецепторы, расположенные на пирамидных нейронах [Puig, Gulledge, 2011]. Благодаря этому 5-НТ участвует в тонкой настройке соотношения между когнитивным контролем и эмоциональной реактивностью, которое необходимо для выбора адекватного поведенческого ответа.

Таким образом, влияние 5-НТ на активность нейронных сетей и поведение определяется не только уровнем его высвобождения, но и тем, какие именно 5-НТ-ергические популяции активируются, через какие проекционные пути реализуется их действие и какова временная динамика этой активации. Такая организация позволяет 5-НТ-ергической системе гибко модулировать различные компоненты стресс-ответа, обеспечивая адаптацию поведения к изменяющимся условиям среды и участвуя в выборе копинг-стратегий. В свою очередь, активность 5-НТ-ергических нейронов DRN представляет собой динамическую переменную, формирующуюся под влиянием сложного взаимодействия механизмов авторегуляции, внешних афферентных сигналов и локальных нейронных сетей, что позволяет системе быстро перестраивать свою работу в ответ на стрессорные воздействия.

1.3.4 Многоуровневая регуляция активности 5-НТ нейронов DRN

Спонтанная активность 5-НТ нейронов DRN *in vivo* характеризуется регулярным низкочастотным паттерном. Ее базальный тонус поддерживается сложной иерархической системой регуляции, включающей авторегуляцию, внешние проекции и локальные нейронные сети [Sakai, Crochet, 2001].

Первичным механизмом контроля является автоингибирование по принципу отрицательной обратной связи. Высвобождаемый из коллатералей 5-НТ активирует соматодендритные 5-HT_{1A} ауторецепторы на самих нейронах DRN, что снижает их возбудимость и частоту разрядов, предотвращая гиперактивацию [Penington, Kelly, Fox, 1993].

Кроме того, на активность 5-НТ нейронов в DRN влияют возбуждающие и тормозные входы из различных областей мозга. Поскольку эти влияния динамически

изменяются, уровни 5-НТ как внутри DRN, так и в проекционных зонах, могут колебаться. Подобные флуктуации лежат в основе тонкой регуляции различных физиологических и поведенческих функций, включая двигательную активность, циркадные ритмы и настроение [Teissier и др., 2015b].

Возбуждающие глутаматергические проекции поступают в DRN из нескольких областей, включая ПФК, LHb, парабрахиальное, латеродорсальное тегментальное и парагигантоцеллюлярное ядра, препозитное подъязычное и спинальное тройничное ядра, а также от локальных глутаматергических нейронов, расположенных внутри самого DRN. Тормозные ГАМК-ергические проекции в DRN происходят из VTA, ростромедиального ядра покрышки, а также из локальных источников в dlPAG и самом DRN [Zhou и др., 2017].

Отдельные структуры, такие как латеральный гипоталамус (LH), преоптическая область (POA), черная субстанция (SN) и миндалина, посылают смешанные глутаматергические и ГАМК-ергические проекции, формируя сложный баланс возбуждения и торможения. При этом такие области, как ПФК, LH, POA, SN и LHb, формируют связи не только с 5-НТ-ергическими, но и с ГАМК-ергическими нейронами DRN [Zhou и др., 2017].

Локальные ГАМК-ергические нейроны, составляющие до 30% популяции DRN, служат ключевыми интеграторами внешних сигналов и модуляторами активности 5-НТ клеток [Challis и др., 2013]. 5-НТ, в свою очередь, регулирует эти интернейроны через несколько типов рецепторов: тормозные 5-HT_{1A} и возбуждающие 5-$HT_{2A/2C}$ и 5-HT_{7} [Broadbelt и др., 2010]. Благодаря разному сродству рецепторов [Saxena, 1995], при низкой концентрации 5-НТ активируются высокоаффинные 5-HT_{1A} рецепторы, что ослабляет ГАМК-ергическое торможение и повышает тонус 5-НТ нейронов. При высокой концентрации 5-НТ активируются 5-$HT_{2A/2C}$ рецепторы, усиливая тормозной контроль [Hernández-Vázquez, Garduño, Hernández-López, 2019]. Таким образом, 5-НТ-ергические нейроны опосредованно регулируют собственную активность через петли обратной связи с локальными интернейронами.

Дополнительным механизмом регуляции активности 5-НТ нейронов являются аксо-аксонные соединения между ГАМК-ергическими и глутаматергическими терминалями, формирующие синаптические триады на общих постсинаптических элементах в DRN. В этих структурах пресинаптические ГАМК-А и ГАМК-Б рецепторы, соответственно, усиливают и подавляют высвобождение глутамата [Soiza-Reilly и др., 2013]. Например, ГАМК может косвенно снижать активность 5-НТ-ергических нейронов, подавляя глутаматергическую передачу из LHb и мПФК [Adell и др., 2002; Varga и др., 2001].

Таким образом, активность 5-НТ нейронов DRN представляет собой динамическую переменную, тонко регулируемую на нескольких уровнях: от быстрой авторегуляции и локальных нейронных сетей до интеграции дистантных возбуждающих и тормозных сигналов из лимбических и стволовых структур (Рис. 2).

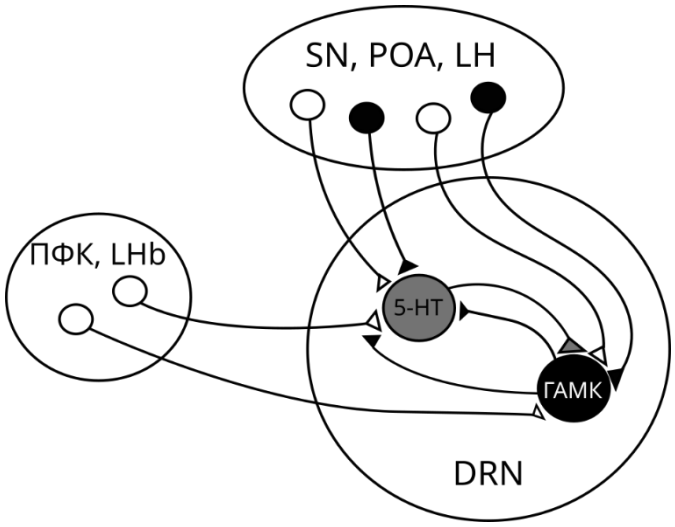


Рис. 2 Схема, отражающая некоторые аспекты регуляции активности нейронов DRN. Белым отмечены глутаматергические нейроны, оказывающие возбуждающее влияние; черным – ГАМК-ергические нейроны, оказывающие тормозное влияние; серым – 5-НТ нейроны, оказывающие либо тормозное влияние через 5-HT_{1A} рецепторы, либо возбуждающее через 5-$HT_{2A/2C}$ и 5-HT_7 рецепторы.

Таким образом, приведённые данные свидетельствуют о том, что как дорсальный гиппокамп, так и DRN вносят существенный вклад в регуляцию стресс-ответа и выбор копинг-стратегий. dCA1 участвует в контекстуальной оценке стрессовой ситуации и формировании адаптивного поведения, тогда как 5-НТ-ергические нейроны DRN через обширную систему проекций способны модулировать активность нейронных сетей, вовлечённых в эмоциональные и поведенческие реакции на стресс. Нарушения функционирования обеих систем ассоциированы со снижением поведенческой гибкости и смещением копинг-поведения в сторону менее адаптивных форм реагирования. В связи с этим изучение вклада активности dCA1 и 5-НТ-ергических нейронов DRN в регуляцию стресс-индуцированного поведения представляет значительный интерес для понимания нейробиологических механизмов адаптации к стрессу.

1.4 Кетамин как модулятор нейрональной активности и стресс-индуцированного поведения

Кетамин представляет собой диссоциативный анестетик, широко применяемый в клинической и ветеринарной практике благодаря своим анестезирующим, анальгетическим и седативным свойствам. Особый интерес к данному соединению значительно возрос после открытия его способности вызывать быстрые изменения эмоционального и поведенческого состояния при введении в субанестетических дозах [Berman и др., 2000]. Первоначально этот эффект рассматривался преимущественно в контексте лечения депрессивных расстройств, однако последующие исследования показали, что влияние кетамина значительно шире и включает изменение активности нейрональных сетей, процессов обучения, адаптации к стрессу и выбора поведенческих стратегий [Carreno и др., 2016; Duman, Aghajanian, 2012; Yoon и др., 2024].

Кетамин представляет собой рацемическую смесь двух энантиомеров – S(+) и R(-)-кетамина, обладающих различными фармакологическими свойствами [White и др., 1980]. В клинической практике применяется как рацемическая форма препарата, так и очищенный S-кетамин, обладающий более высокой аффинностью к основным молекулярным мишеням [Peltoniemi и др., 2016]. Несмотря на сложный профиль действия и способность взаимодействовать с различными рецепторными системами, ключевым механизмом фармакологического действия кетамина считается его влияние на глутаматергическую передачу через неконкурентную блокаду NMDA-рецепторов [Anis и др., 1983].

NMDA-рецепторы являются центральным элементом регуляции активности нейронных сетей, поскольку участвуют в интеграции возбуждающих сигналов, контроле пластичности синапсов и формировании адаптивных изменений нервной системы. Благодаря способности модулировать функцию этих рецепторов кетамин способен быстро изменять баланс возбуждения и торможения в нейрональных цепях [Carreno и др., 2016], что делает его уникальным инструментом для исследования механизмов, лежащих в основе перестройки активности мозга при стрессовых воздействиях.

Особое значение в контексте настоящего исследования имеет способность кетамина влиять не только на отдельные молекулярные процессы, но и на функциональное состояние определенных нейрональных контуров. Показано, что действие кетамина зависит от активности вовлеченных структур и может приводить к изменению работы гиппокампа, ПФК и связанных с ними нейрональных сетей [Duman и др., 2016; Zanos, Gould, 2018]. Эти области играют ключевую роль в оценке значимости стрессовых стимулов, формировании адаптивного поведения и выборе копинг-стратегий [Carreno и др., 2016; Yoon и др., 2024b].

Важным аспектом является то, что поведенческие эффекты кетамина не ограничиваются состояниями, связанными с хроническим стрессом или депрессивной симптоматикой [Autry и др., 2011; Franceschelli и др., 2015]. Экспериментальные данные демонстрируют, что действие препарата может зависеть от исходного функционального состояния нервной системы и характера стрессового воздействия [Franceschelli и др., 2015], а также от активности конкретных нейрональных цепей [Carreno и др., 2016; Chen и др., 2024; Yoon и др., 2024a]. Это указывает на контекст-зависимый характер действия кетамина и подчеркивает необходимость изучения его влияния через призму регуляции нейрональной активности и поведения.

Таким образом, кетамин представляет собой не только фармакологический агент с быстрым терапевтическим эффектом, но и важный инструмент для исследования механизмов, посредством которых изменение активности нейрональных сетей может влиять на адаптацию к стрессу и формирование поведенческих стратегий. В связи с этим дальнейшее рассмотрение клеточных и молекулярных механизмов действия кетамина позволяет раскрыть, каким образом модуляция глутаматергической передачи приводит к функциональной перестройке нейронных цепей.

1.4.1 Механизмы действия кетамина на клеточном и молекулярном уровнях

Одним из ключевых вопросов при изучении механизмов действия кетамина стало объяснение того, каким образом блокада NMDA-рецепторов, являющихся одним из основных компонентов возбуждающей глутаматергической передачи, может приводить к усилению активности нейронных сетей. Первые данные, продемонстрировавшие, что однократное введение субанестетической дозы кетамина вызывает увеличение возбуждения корковых структур, были получены в 1997 году [Bagley, Moghaddam, 1997]. Эти наблюдения привели к формированию гипотезы о растормаживающем действии кетамина, согласно которой блокада NMDA-рецепторов на ГАМК-ергических интернейронах снижает их тоническую активность и, таким образом, ослабляет тормозной контроль над пирамидными нейронами [Ballard, Zarate, 2020].

Снижение активности ингибирующих интернейронов приводит к увеличению активности пирамидных клеток и повышению высвобождения глутамата в нейронных сетях. Данный механизм позволяет кетамину быстро изменять баланс возбуждения и торможения, создавая условия для последующей перестройки функционального состояния нейрональных цепей [Ballard, Zarate, 2020]. В пользу этой модели свидетельствуют данные

о том, что кетамин и другие антагонисты NMDA-рецепторов, такие как МК-801, увеличивают внеклеточный уровень глутамата и снижают уровень ГАМК в ПФК [Homayoun, Moghaddam, 2007; Yonezawa и др., 1998; Zuo и др., 2012]. Селективность действия кетамина в отношении интернейронов может быть связана с особенностями субъединичного состава NMDA-рецепторов, экспрессируемых этими клетками: ГАМК-ергические интернейроны преимущественно содержат субъединицы GluN2C/D, которые характеризуются высокой активностью в состоянии покоя и повышенной чувствительностью к блокаде кетамином [Culley и др., 2016; Zorumski и др., 2016].

Наряду с гипотезой растормаживания существует модель прямого действия кетамина на пирамидные нейроны. Согласно данной гипотезе, кетамин блокирует NMDA-рецепторы, содержащие субъединицу GluN2B, непосредственно на возбуждающих нейронах [Miller, Moran, Hall, 2016]. Такая блокада приводит к активации внутриклеточных механизмов, регулирующих синтез белков и синаптическую пластичность. В частности, ингибирование NMDA-зависимой активации киназы eEF2 снимает подавление трансляции белков, включая BDNF, что способствует усилению формирования и стабилизации возбуждающих синаптических контактов [Monteggia, Zarate, 2015].

Вероятно, эти механизмы не исключают, а дополняют друг друга, совместно приводя к нормализации синаптической передачи при депрессии [Duman, Sanacora, Krystal, 2019; Zanos и др., 2018]. Общим результатом их действия является быстрое усиление синаптической пластичности и синаптогенез в ключевых областях – ПФК и гиппокампе [Duman и др., 2016; Li и др., 2010]. Этот процесс связывают с активацией каскада BDNF-TrkB и последующей стимуляцией внутриклеточных сигнальных путей, включая mTOR, что приводит к синтезу белков, необходимых для перестройки синаптических связей [Casarotto и др., 2021; Deyama, Duman, 2020].

Таким образом, действие кетамина представляет собой не просто изменение уровня отдельных нейромедиаторов, а комплексную перестройку функционального состояния нейрональных сетей, включающую изменение баланса возбуждения и торможения, усиление синаптической пластичности и изменение способности нейронов адаптироваться к внешним воздействиям. Именно способность кетамина быстро модулировать активность ключевых структур, участвующих в оценке стрессора и формировании поведенческого ответа, делает его важным инструментом для изучения механизмов регуляции стресс-индуцированного поведения и выбора копинг-стратегий.

1.4.2 Действие кетамина на 5-НТ систему

Помимо прямого воздействия на глутаматергическую передачу, кетамин способен изменять активность других нейромодуляторных систем, участвующих в регуляции эмоционального поведения и адаптации к стрессу [López-Gil и др., 2019]. Среди них особое значение имеет 5-НТ-ергическая система, поскольку 5-НТ играет ключевую роль в контроле возбудимости лимбических структур, оценке значимости стимулов и выборе поведенческой стратегии. В отличие от прямого блокирующего действия кетамина на NMDA-рецепторы, его влияние на 5-НТ-ергическую систему, вероятно, является преимущественно опосредованным и связано с изменением активности нейрональных цепей, регулирующих работу ядер шва [Fukumoto, Iijima, Chaki, 2015; Nishitani и др., 2014].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что введение кетамина приводит к увеличению высвобождения 5-НТ в ряде областей мозга, включая ПФК, а изменение 5-НТ-ергической передачи может вносить вклад в формирование поведенческих эффектов препарата. Так, повышение уровня 5-НТ в ПФК после введения кетамина коррелирует с изменением поведения в тестах, оценивающих копинг-поведение [López-Gil и др., 2019a; Pham и др., 2017]. В то же время фармакологическое подавление 5-НТ-ергической передачи, включая истощение запасов 5-НТ или блокаду отдельных 5-НТ-рецепторов, способно снижать выраженность поведенческих эффектов кетамина [Du Jardin и др., 2018; Fukumoto, Iijima, Chaki, 2014]. Эти данные указывают на то, что 5-НТ система может выступать одним из функциональных посредников действия кетамина, связывая изменения активности глутаматергических сетей с последующей перестройкой поведения.

Ключевым источником 5-НТ для передних отделов мозга является DRN, однако прямое воздействие кетамина на эту структуру не является основным механизмом изменения 5-НТ-ергической передачи. Показано, что локальное введение кетамина непосредственно в DRN не вызывает выраженного изменения активности 5-НТ-ергических нейронов данной области [Nishitani и др., 2014]. Это указывает на то, что влияние кетамина на DRN реализуется преимущественно через связанные с ним нейрональные цепи.

Одним из предполагаемых механизмов является активация корково-стволовых путей, соединяющих ПФК и DRN. Согласно данной модели, кетамин, вызывая растормаживание пирамидных нейронов ПФК, увеличивает активность их глутаматергических проекций в DRN. Усиление возбуждающего влияния на 5-НТ-ергические нейроны DRN приводит к увеличению высвобождения 5-НТ в проекционных областях, включая ПФК [Pham и др., 2017]. В пользу данной модели свидетельствуют данные о том, что активация AMPA-рецепторов в DRN усиливает высвобождение 5-НТ,

тогда как блокада этих рецепторов снижает вызванное кетамином увеличение уровня 5-НТ [Nishitani и др., 2014] и ослабляет его поведенческие эффекты [Pham и др., 2017].

Дополнительный вклад в регуляцию активности DRN могут вносить другие афферентные системы. В частности, показано, что кетамин способен активировать холинергические нейроны педункулопонтинного ядра покрышки, которые оказывают возбуждающее влияние на глутаматергические клетки DRN [Garduño и др., 2012]. Усиление локальной глутаматергической передачи в DRN, в свою очередь, приводит к активации AMPA-рецепторов на 5-НТ-ергических нейронах и повышению выброса 5-НТ в ПФК [Nishitani и др., 2014].

Повышенный уровень 5-НТ в мПФК стимулирует постсинаптические 5-HT_{1A} рецепторы, которые запускают внутриклеточный сигнальный каскад [Maati и др., 2016]. Из этого следует, что эндогенная активация 5-НТ-рецепторов может быть важна для одного или нескольких этапов (например, активация mTOR или eEF2, а также секреция BDNF), которые опосредуют терапевтический эффект кетамина.

В целом современные данные позволяют рассматривать влияние кетамина на 5-НТ систему как компонент сложного взаимодействия между глутаматергическими и моноаминергическими механизмами регуляции поведения. Изменение активности 5-НТ-ергических нейронов DRN и последующая модуляция лимбических структур могут способствовать перестройке эмоциональной реактивности, поведенческой гибкости и способности организма адаптироваться к стрессовым воздействиям. Однако фармакологические исследования не позволяют определить, является ли изменение активности конкретных 5-НТ-ергических популяций необходимым и достаточным условием поведенческих эффектов кетамина. Для установления функциональной значимости отдельных нейрональных цепей требуются методы, позволяющие селективно изменять активность определенных клеточных популяций, такие как оптогенетическая модуляция.

1.5 Оптогенетическая модуляция активности нейронных цепей как инструмент исследования механизмов стресс-индуцированного поведения

1.5.1 Оптогенетика как метод установления функциональной значимости нейрональных популяций

Современные исследования стресс-индуцированного поведения выявили широкий спектр нейрональных структур и клеточных популяций, активность которых изменяется в

ответ на стрессовые воздействия. Методы регистрации нейрональной активности позволили выявить изменения активности дорсального гиппокампа CA1, 5-HT-ергических ядер шва и префронтально-гиппокампальных сетей в формировании адаптивного поведения. Однако данные подходы преимущественно отражают корреляцию между активностью нейрональных систем и поведенческими реакциями и не позволяют определить их непосредственную функциональную значимость.

Фармакологическая модуляция нейрональных процессов, включая действие кетамина, продемонстрировала, что изменение активности определенных нейрональных систем способно приводить к перестройке поведенческого ответа на стресс. Вместе с тем системное воздействие препаратов затрагивает широкий спектр молекулярных мишеней и нейрональных цепей, что ограничивает возможность выделения конкретных популяций нейронов, определяющих поведенческий эффект.

Для установления роли активности отдельных нейрональных структур необходимы методы, позволяющие селективно и обратимо контролировать активность определенных клеточных популяций с высокой временной точностью. Одним из таких подходов является оптогенетическая модуляция активности нейронов [Deisseroth, 2015], которая сочетает генетическую специфичность воздействия с возможностью управления активностью нейрональных цепей в режиме реального времени.

Использование оптогенетики позволяет перейти от описания ассоциаций между активностью мозга и поведением к установлению причинно-следственных связей, определяя, является ли изменение активности конкретной нейрональной популяции достаточным для формирования определенного поведенческого ответа. Это особенно важно при исследовании копинг-стратегий, поскольку выбор между активными и пассивными формами реагирования определяется взаимодействием распределенных нейрональных сетей, включающих гиппокамп, префронтальную кору и 5-HT-ергические системы [Yoon et al., 2024; Johnson et al., 2022].

1.5.2 Оптогенетический контроль активности нейрональных популяций: опсины и системы доставки

Оптогенетика представляет собой метод управления активностью клеток с использованием светочувствительных белков – опсинов, которые экспрессируются в целевых нейрональных популяциях с помощью генетических конструкций. Введение генов опсинов в определенные группы нейронов позволяет избирательно изменять их функциональное состояние при воздействии света, что обеспечивает высокий уровень

пространственной и временной точности контроля активности нейронных цепей [Yizhar и др., 2011]. Важным преимуществом данного подхода является возможность воздействия на конкретные популяции клеток без существенного влияния на окружающие нейроны, что делает его особенно востребованным при изучении сложных форм поведения, в регуляции которых участвуют распределенные нейрональные сети.

В зависимости от типа используемого опсина, оптогенетическая стимуляция может приводить как к активации, так и к подавлению активности нейронов. Для возбуждения нейрональных популяций наиболее широко применяются каналородопсины, в частности ChR2, которые после стимуляции светом вызывают деполяризацию мембраны за счет открытия катионных каналов и входа положительно заряженных ионов в клетку [Boyden и др., 2005]. Напротив, ингибирование нейронной активности достигается с использованием светочувствительных ионных насосов: галородопсина (NpHR), обеспечивающего гиперполяризацию за счет хлорного насоса [Zhang и др., 2007], и археородопсинов (Arch/ArchT), активация которых вызывает гиперполяризацию мембраны за счет протонного насоса и снижение вероятности генерации потенциалов действия [Chow и др., 2010]. Таким образом, сочетание активирующих и ингибирующих опсинов позволяет оценивать не только связь активности определенной нейрональной популяции с поведением, но и определять, является ли эта активность необходимым или достаточным условием формирования наблюдаемого ответа.

Для доставки генетических конструкций, кодирующих опсины, наиболее часто используются вирусные векторы, преимущественно аденоассоциированные вирусы (AAV). Их применение позволяет обеспечить экспрессию опсинов в выбранной области мозга и, при использовании специфических промоторов или Cre-зависимых конструкций, ограничить ее определенными типами нейронов. После введения вирусного вектора в целевую структуру экспрессия опсина развивается в течение нескольких недель и сохраняется длительное время, обеспечивая возможность последующей регистрации и модуляции активности выбранных нейрональных популяций *in vivo* [Yizhar и др., 2011].

Благодаря способности селективно изменять активность отдельных клеток и нейронных цепей оптогенетика стала одним из ключевых инструментов для установления функциональной значимости конкретных структур мозга в регуляции поведения. В контексте исследования стресс-ответа данный подход позволяет определить, является ли изменение активности определенных нейрональных популяций достаточным для изменения стратегии поведения при воздействии стрессора.

1.5.3 Применение оптогенетики для исследования стресс-индуцированного поведения и выбора копинг-стратегий

Применение оптогенетических подходов позволило перейти от корреляционного анализа активности нейронных структур к установлению их функциональной значимости в регуляции стресс-индуцированного поведения [Drozd, Shaburova, Dygalo, 2019]. Исследования последних лет показали, что активация или подавление отдельных нейрональных популяций способно изменять выбор между активными и пассивными стратегиями реагирования на стресс. Например, стимуляция 5-НТ-ергических нейронов DRN усиливает активный поведенческий ответ в тесте принудительного плавания, тогда как их ингибирование способствует увеличению пассивного поведения [Nishitani и др., 2019a]. Аналогично, оптогенетическая активация отдельных проекций мПФК позволяет изменять стресс-индуцированные поведенческие реакции. Так, стимуляция проекции мПФК → dlPAG снижает проявления пассивного копинга, тогда как неспецифическое повышение активности нейронов mPFC может, напротив, усиливать пассивные стратегии поведения [Johnson и др., 2022; Wang и др., 2014]. Эти данные подчеркивают, что функциональное значение отдельных структур определяется не только уровнем их активности, но и спецификой вовлеченных нейрональных цепей. Анатомической основой этого положения служит сложная организация проекционных нейронов ПФК, включающая множественные подтипы с различными паттернами коллатералей к подкорковым структурам [Drozd и др., 2024].

Вклад гиппокампа в регуляцию стресс-ответа также активно изучается с использованием оптогенетических подходов, однако большинство исследований сосредоточено на вентральной части гиппокампа. Было показано, что стимуляция проекций вентрального гиппокампа к мПФК способна восстанавливать поведенческие нарушения, вызванные хроническим стрессом, тогда как ингибирование вентрального гиппокампа предотвращает снижение мотивации после хронического социального поражения [Papp и др., 2021; Yoshida и др., 2021]. В то же время функциональная роль дорсального гиппокампа в выборе копинг-стратегий остается значительно менее изученной. Недавние исследования продемонстрировали, что активность цепи поле CA1 дорсального гиппокампа – мПФК участвует в регуляции поведенческого ответа при неизбегаемом стрессе и связана с эффектами кетамина [Yoon и др., 2024].

Таким образом, оптогенетические исследования демонстрируют, что гиппокамп, ПФК и 5-НТ-ергические нейроны DRN являются компонентами распределенной нейрональной системы, определяющей характер поведенческого ответа на стресс. При этом

остается недостаточно изученным, каким образом изменение активности отдельных структур, в частности дорсального CA1, влияет на выбор копинг-стратегии и связано ли это влияние с модуляцией активности 5-HT-ергической системы. Решение этого вопроса требует избирательного воздействия на конкретные нейрональные популяции в условиях поведенческого тестирования, что и определяет применение оптогенетического подхода в настоящем исследовании.

1.6 Заключение к обзору литературы

Проведённый анализ литературы показывает, что адаптивный ответ на стресс определяется не только активацией систем, обеспечивающих формирование стресс-реакции, но и способностью нейронных сетей гибко изменять поведение в зависимости от условий среды. В этом процессе ключевую роль играют нейромодуляторные системы, регулирующие функциональное состояние лимбических структур и определяющие выбор между различными стратегиями реагирования на стрессор. Особое значение среди них имеет 5-HT-ергическая система, которая благодаря широкой организации восходящих проекций и контекст-зависимому характеру активности способна модулировать эмоциональную реактивность, поведенческую гибкость и формирование копинг-стратегий.

Несмотря на значительный прогресс в понимании роли отдельных нейромедиаторных систем, механизмы, посредством которых активность конкретных нейрональных популяций определяет поведенческий ответ на стресс, остаются недостаточно изученными. Особый интерес представляет дорсальный гиппокамп CA1, участвующий в интеграции информации о текущем контексте и предыдущем опыте, а также 5-HT-ергические нейроны DRN, регулирующие состояние распределённых нейронных сетей, вовлечённых в адаптивное поведение. Однако вклад этих структур в формирование копинг-стратегий и их изменение под действием фармакологических воздействий требует дальнейшего изучения.

Кетамин, являясь неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторов, представляет собой уникальный инструмент для исследования механизмов регуляции стресс-индуцированного поведения. Его способность быстро изменять функциональное состояние нейронных сетей, влиять на процессы синаптической пластичности и модулировать активность различных нейромедиаторных систем указывает на возможность его действия не только как антидепрессанта, но и как регулятора поведенческой адаптации. При этом остается неясным, какие именно нейрональные популяции являются критическими

мишенями его действия и каким образом изменение их активности отражается на выборе копинг-стратегии.

Решение этих вопросов требует перехода от описательных и корреляционных наблюдений к прямому исследованию функциональной значимости отдельных нейрональных популяций. Оптогенетический подход, позволяющий избирательно изменять активность определенных клеток с высоким пространственно-временным разрешением, создает возможность оценить вклад глутаматергических нейронов дорсального CA1 гиппокампа и 5-HT-ергических нейронов DRN в формирование поведенческого ответа на стресс, а также определить их участие в эффектах кетамина. Такой подход позволяет выявить механизмы, лежащие в основе адаптивного поведения, и расширить понимание нейрональных основ индивидуальных различий в выборе копинг-стратегий.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Экспериментальные животные

В экспериментах использовали неонатальных (возраст 3 дня), ювенильных (возраст 3 недели) и взрослых (возраст 2,5-3 месяца) самцов крыс Вистар. Животные содержались в условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН со свободным доступом к воде и пище, в условиях 10:14 чч. (свет-темнота) светового дня. Все процедуры проводились в соответствии с Международными Европейскими Биоэтическими стандартами (86/609-EEC), Российскими правилами работы с лабораторными животными (N 267 от 19.06.2003) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

2.2 Тестирование пассивного поведенческого ответа в тесте подвешивание за хвост

Животных подвешивали за основание хвоста при помощи клейкой ленты на высоте 60 см от пола. Время теста составляло 6 минут. Экспериментальная установка была огорожена непрозрачными стенками с трех сторон, а также в помещении был включен белый звуковой шум. Поведение записывали на цифровую видеокамеру для последующего подсчета эпизодов активности и периодов неподвижности [Cryan, Mombereau, Vassout, 2005] на протяжении каждой из 6 минут. Оценку поведения по видеозаписи проводили независимые операторы, незнакомые с протоколом воздействий и групповой принадлежностью оцениваемых животных.

2.3 Тест «подвешивание за хвост» после введения кетамина

Взрослые животные были разделены на четыре экспериментальные группы (по 10 в каждой группе):

1. Физ. р-р. – Контроль (без стресса);
2. Физ. р-р. – Стресс (подвешивание за хвост);
3. Кетамин – Контроль;
4. Кетамин – Стресс.

Кетамин (ФГУП «Эндофарм», Россия) вводили внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг [Elersič и др., 2024; Yang и др., 2013], а контрольной группе вводили эквивалентный объем физиологического раствора (физ. р-р. 0,5 мл/100 г). Через 1 час после введения препаратов, половина животных из каждой фармакологической группы была протестирована в тесте

«подвешивание за хвост» в течение 6 минут для оценки времени неподвижности, вторая половина животных оставалась в домашних клетках и являлась контролем к действию стресса. Через 1 час после теста (или такого же времени нахождения в домашней клетке контрольных групп) у части животных (по 6 животных в каждой группе) после быстрой декапитации собирали кровь в пробирки с антикоагулянтом (0,2М ЭДТА) для определения уровня кортикостерона иммуноферментным методом и образцы мозга (ствол, средний мозг, миндалину, гиппокамп и ПФК) для анализа уровня мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Другие животные (по 4 в каждой группе) были транскардиально перфузированы, и образцы мозга были взяты для иммуногистохимического анализа. Схема эксперимента представлена на Рис. 3.

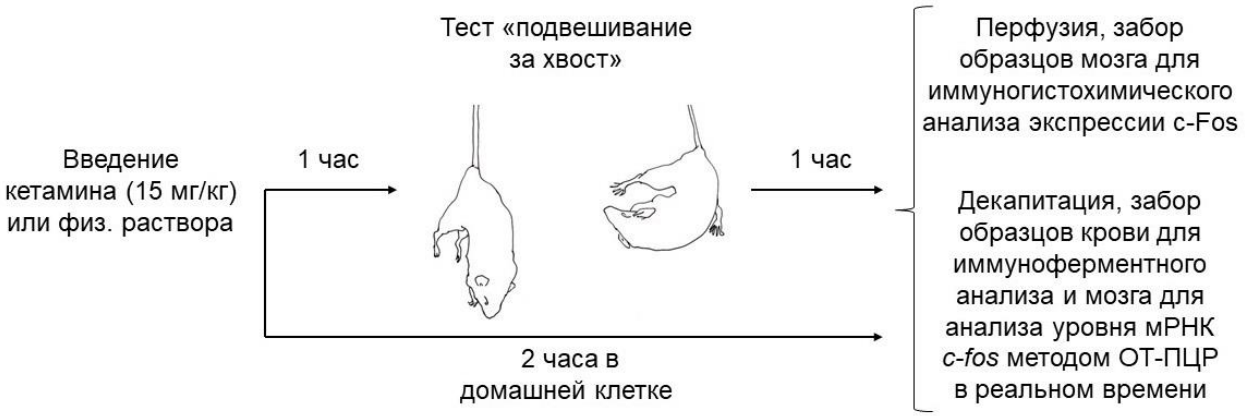


Рис. 3 Схема эксперимента с тестом «подвешивание за хвост» после введения субанестетической дозы кетамина.

2.4 Наработка вирусных векторов

Для получения вирусных частиц культуру клеток HEK-293T трансфицировали плазмидными ДНК, кодирующими белки капсида и вспомогательные белки вируса, а также плазмидами, содержащими последовательности опточувствительных белков и контрольных флуоресцентных белков. Культуру клеток HEK-293T поддерживали по стандартным протоколам [Shaburova, Lanshakov, 2021] на среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% FBS (Biosera, Франция), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко). За день до трансфекции клетки HEK-293T высеивали с плотностью 9×10^6 клеток на чашку Петри (15 см). Клетки трансфицировали 15 мкг плазмидной ДНК в 10 мл среды OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США) в эквимолярной концентрации, и оставляли на ночь. Молярное соотношение полиэтиленимина (1 мкг/мл) (Polysciences, США) и ДНК составляло 3:1.

2.4.1 Векторы, активирующие глутаматергические нейроны

Для оптогенетический активации глутаматергических нейронов были наработаны AAV на основе плазмид из репозитария Addgen (США), созданных группой К. Дейссерота. Для получения AAV смешанного 1-2-го серотипа производили трансфекцию клеток HEK293T эквимолярной смесью плазмид для сборки вируса (pDP1 и pDP2) и плазмидой pAAV-CAMKIIa-ChR2(H134R)-EYFP (#26969, Addgen, США), содержащие последовательность светочувствительного каналородопсина (ChR2(H134R)) сшитого с желтым флуоресцентным белком (EYFP) под промотором CAMKIIa для глутаматергических нейронов. В качестве контрольного вектора использовали AAV-CAMKIIa-EGFP (#50469, Addgen, США), содержащий зеленый флуоресцентный белок (EGFP) под контролем того же промотора.

После трансфекции среду заменяли на свежую, а клетки инкубировали в течение 72 ч. Затем культуру собирали, очищали центрифугированием при 4000 g и 4°C в течение 15 мин. Осадок ресуспензировали в 150 мМ NaCl и 20 мМ Трис (pH 8,0) и затем инкубировали в течении часа при 37°C в 0,5% дезоксихолата натрия и 50 Ед/мл бензонуклеазы. Обломки клеток удаляли центрифугированием при 3000 g в течение 15 минут. Полученные вирусные частицы очищали аффинно-хроматографически на гепарин-сефарозных колонках и концентрировали при помощи центрифужных концентраторов Millipore до титра 10^{11} частиц/мл [Lanshakov и др., 2016; McClure и др., 2011].

2.4.2 Векторы, ингибирующие 5-НТ нейроны

Для оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов были созданы лентивирусные частицы на основе плазмид, полученных от проф. Нишитани (Nishitani et al., 2019). Клетки трансфицировали эквимолярной смесью плазмид для сборки вирусного капсида psPAX2 и pMD2.G (#12260 и #12259, Addgen, США) и TPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE либо TPH2-Venus-WPRE. Плазмида TPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE содержит последовательность гена протонного насоса археародопсина (eArchT3.0), конъюгированного с eYFP, экспрессия которого регулируется промотором гена *Tph2*, специфичного для 5-НТ нейронов. В качестве контроля использовалась плазмида TPH2-Venus-WPRE, кодирующая зеленый флуоресцентный белок Venus.

После трансфекции среду заменяли на свежую, а клетки инкубировали в течение 48 ч. Затем культуру собирали, очищали центрифугированием при 4000 g и 4°C в течение 15 мин и фильтровали (0,45 мкм SLHVR33RS Миллипор). Полученный раствор разводили в

30 мл TBS (150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 8,0), дополнительно очищали на сильноосновных анионообменниках с четвертичными аммониевыми группами ДИАПАК-ТА («Биохиммак») и концентрировали до титра 10^{12} частиц/мл на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-4 (MERCK) [Shaburova, Lanshakov, 2020].

2.4.3 Определение титра вирусных частиц

Содержание вирусных частиц в образце определялось по количеству копий *цис*-регуляторного посттранскрипционного элемента WPRE, входящего в состав сконструированных векторов. Для лентивирусных частиц сначала проводили реакцию обратной транскрипции. Суммарную РНК выделяли из полученных образцов лентивируса с помощью набора RNeasy Mini (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. РНК элюировали из колонки водой, свободной от РНКаз, после чего проводили реакцию обратной транскрипции. Смесь содержала 20 мкМ праймера WPRE_R (табл. 1), 20 мМ dNTPs, 40 мМ DTT и 100 ед. ревертазы MMLV (Evrogen).

Колличественную ПЦР проводили на приборе ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) с мастер-миксом qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Evrogen) и 20 мкМ каждого праймера: WPRE _F и WPRE_R (табл. 1). Использовали следующий режим реакции: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин; денатурация при 95°C в течение 15 с; отжиг и элонгация при 60°C в течение 1 мин. Цикл повторяли 50 раз.

Табл. 1 Последовательность праймеров, использованных для титрирования лентивирусных частиц

Праймер	Последовательность 5′→3′
WPRE_R	ACAACACCACGGAATTGTCAGTGC
WPRE _F	TCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT

Титр вирусного препарата (частиц/мл) рассчитывали с учетом всех разведений и на основе числа копий вирусных РНК или ДНК, которые определяли с помощью калибровочной кривой, построенной для серийных разведений плазмиды с известным числом копий исследуемой конструкции.

1.1 Отработка координат введения вирусных векторов и эффективности оптостимуляции

1.1.1 Отработка введения вирусных конструкций и оптогенетической стимуляции дорсального гиппокампа

Для отработки метода оптогенетики были использованы неонатальные 3-дневные крысята, которым под холодовым наркозом в боковые желудочки мозга вводили 1 мкл вирусных частиц, кодирующих фоточувствительный ChR2(H134R)-EYFP белок или контрольный конструкт, несущий EGFP с добавлением трипанового синего красителя для контроля попадания. Использование неонатальных животных было выбрано для упрощения процедуры введения векторов непосредственно через прокол костей черепа.

Через 3 недели после введения вирусных частиц ювенильным крысятам проводили фотостимуляцию дорсального гиппокампа. Для этого животные были наркотизированы уретаном (1 г/кг) и помещены в стереотаксис. Поверхность черепа освобождали от мягких тканей и стоматологическим бором в кости делали небольшое отверстие диаметром ~ 0,2 мм над областью CA1 гиппокампа. Через это отверстие в мозг вводили 16-канальный оптотрод (A1×16–5mm–100–177–OA16LP, «NeuroNexus Technologies», США), позволяющий оптическую стимуляцию ткани в области расположения окончания оптотрода. Далее дорсальный гиппокамп 5 минут освещали синим светом (480 нм, 1,2 мВ/мм2, 20 Гц) через оптоволокно, входящее в состав оптотрода («Thorlabs», США) [Lanshakov и др., 2016; Lanshakov, Drozd, Dygalo, 2017].

Через час после этого образцы мозга были отобраны для иммуногистохимического определения экспрессии белка раннего ответа c-Fos. Для этого наркотизированных животных транскардиально перфузировали 1xPBS и 4% PFA. Извлекали мозг, постфиксировли 4 часа в 4% PFA и делали 300 мкм срезы на вибратоме («Microm», Германия). Схема эксперимента представлена на Рис. 4.

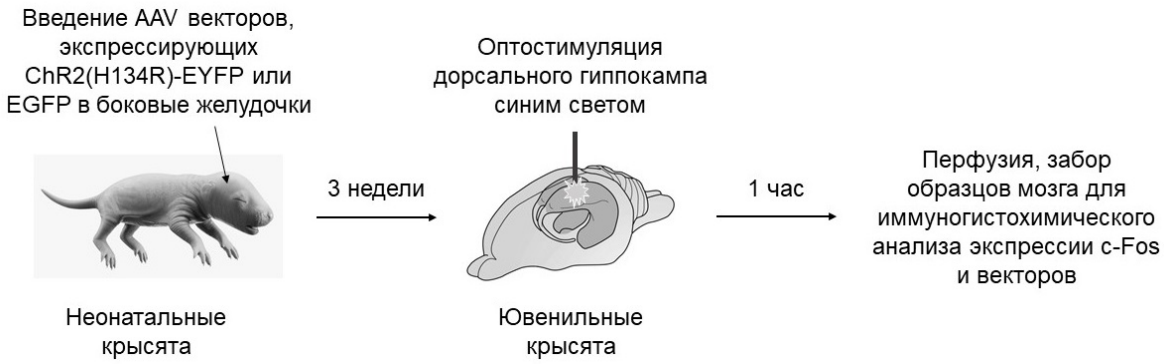


Рис. 4 Схема эксперимента по отработке введения вирусных конструкций и оптогенетической стимуляции дорсального гиппокампа.

И в контрольной, и в опытной группе наблюдалась экспрессия флуоресцентных белков в CA1 поле дорсального гиппокампа: в среднем EGFP и ChR2(H134R)-EYFP экспрессировали 35-40 клеток на 1 мм^2. После оптостимуляции у животных, нейроны которых экспрессировали светочувствительный ионный канал, было обнаружено статистически значимое повышение общего количества c-Fos-позитивных клеток, по сравнению с животными контрольной группы животных, нейроны которых не были чувствительны к свету ($F_{1,13} = 5,96$; $p < 0,05$). Количество клеток, коэкспрессирующих c-Fos и вектор, было значительно больше у животных опытной группы с фоточувствительными нейронами, чем у контрольной группы ($F_{1,17} = 27,93$; $p < 0,001$) (Рис. 5).

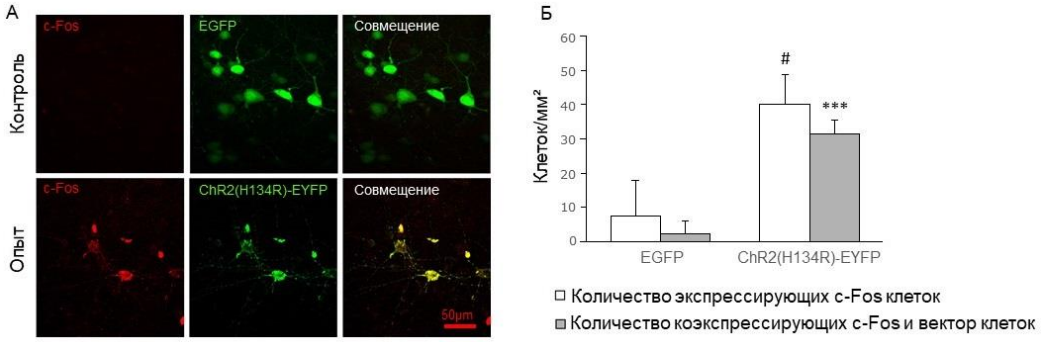


Рис. 5 А – Репрезентативные фотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos и флуоресцентного вектора EGFP в нейронах контрольной группы или CHR2(H134R)-EYFP в нейронах опытной группы в области поля CA1 дорсального гиппокампа; **Б** – Количество экспрессирующих c-Fos и коэкспрессирующих c-Fos и вектор клеток в поле CA1 дорсального гиппокампа после оптостимуляции; # - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой EGFP.

У опытной группы белок c-Fos был обнаружен преимущественно в флуоресцентных фоточувствительных клетках, но также и в небольшом числе клеток, которые не экспрессировали ChR2(H134R)-EYFP. Так как в контрольной группе так же было выявлено некоторое количество c-Fos-позитивных клеток, можно сделать вывод, что различие между этими двумя группами достигалось за счет клеток, в которых экспрессия c-Fos наблюдалась одновременно с экспрессией ChR2(H134R)-EYFP. Повышение экспрессии белка раннего ответа c-Fos после стимуляции синим светом глутаматергических нейронов гиппокампа, в которых промотор CAMKIIa обеспечивает экспрессию ChR2(H134R)-EYFP, ясно свидетельствует об оптогенетической активации этих нейронов.

Таким образом, на ювенильных животных была отработана методика активации нейронов гиппокампа и показано, что введение вектора, экспрессирующего ChR2(H134R)-EYFP, и последующая оптостимуляция вызывали активацию глутаматергических нейронов

гиппокампа, которая регистрировалась по увеличению числа экспрессирующих c-Fos нейронов. Результаты полученные в этом разделе были опубликованы в двух статьях [Lanshakov и др., 2016; Lanshakov, Drozd, Dygalo, 2017].

2.5.2 Отработка стереотаксических координат для введения вирусов в дорсальное ядро шва среднего мозга

Вирусная доставка специфичных векторов, как правило, осуществляется в целевые области мозга при помощи стереотаксической установки. При введении небольшого объема (1-2 мкл) сконцентрированного вируса заражение вирусными частицами будет происходить в ограниченной области мозга. При анализе литературы было обнаружено, что разные исследовательские группы используют несовпадающие координаты для введения в область DRN, поскольку разные линии крыс могут различаться размерами мозга. Поэтому для уточнения координат введения вируса была проведена предварительная отработка введения в DRN флуоресцентного красителя NeuroTrace™ 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain, который окрашивает нейроны аналогично окраске по Нисслю. Для этого 4 взрослые крысы были наркотизированы авертином в дозе 0,2 г/кг, закреплены в стереотаксисе, поверхность черепа была освобождена от мягких тканей, после чего при помощи зубного бора в черепе было проделано небольшое отверстие, через которое в течение 7 минут по координатам AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 6; 6,5; 7 и 7,5 мм было введено 2 мкл красителя при помощи микро-шприца Hamilton neuros. Спустя 30 минут после введения животных транскардиально перфузировали 1xPBS и 4% PFA, после чего извлекали головной мозг, из которого на криотоме готовили срезы толщиной 25 мкм на уровне DRN. Срезы промывали diamidino-2-phenylindole). Препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO («Carl Zeiss», Германия) при помощи объектива с x20 увеличением, затем была оценена локализация окрашенных нейронов при разной глубине введения.

В результате было определено, что оптимальная глубина введения – 7 мм, при которой наблюдалось окрашивание нейронов в области DRN. При введении красителя на глубину 6 и 6,5 мм наблюдалось окрашивание нейронов в области серого вещества водопровода, которые находятся дорсальнее DRN, а при введении на глубину 7,5 мм окрашивались нейроны, которые находятся вентральнее DRN (Рис. 6). Таким образом, в последующих экспериментах при введении вирусных частиц в DRN взрослых крыс Вистар использовались координаты AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 7 мм.

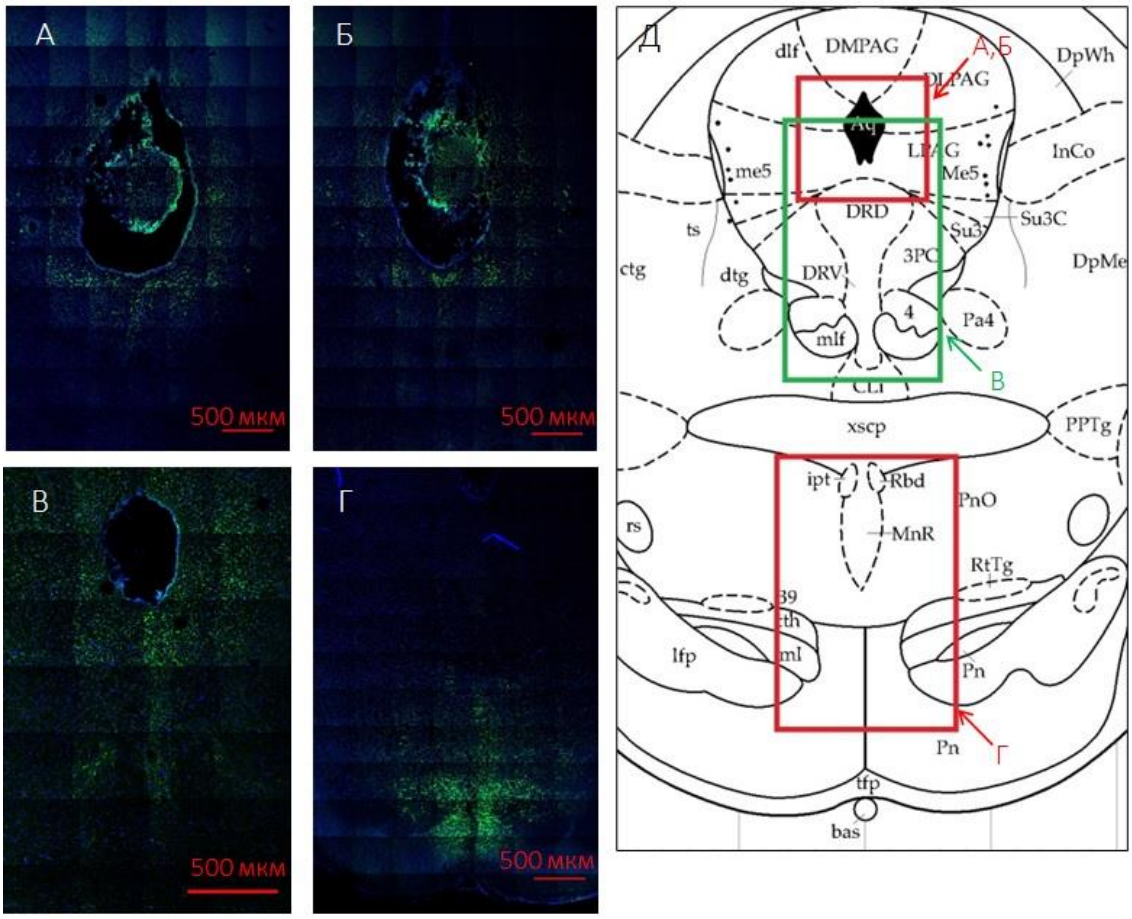


Рис. 6 Репрезентативные фотографии окрашивания нейронов красителем NeuroTrace™ 500/525 Green Fluorescent Nissl Stain, введенного в мозг взрослых крыс с использованием разных стереотаксических координат: **А** – AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 6 мм; **Б** – AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 6,5 мм; **В** – AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 7 мм; **Г** – AP = -7,7 мм, ML = 0 мм, DV = 7,5 мм; **Д** – Схема расположения зон, окрашенных после введения красителя по использованным координатам, на атласе мозга крысы (Paxinos, Watson 1998). **А, Б, В, Г** соответствуют обозначениям на репрезентативных фотографиях.

2.5.3 Оптогенетическое ингибирование 5-НТ нейронов DRN взрослых животных

Для оценки эффективности экспрессии векторов в DRN, а также эффективности подавления нейрональной активности при воздействии светом часть животных была подвергнута оптогенетическому воздействию в наркотизированном состоянии через неделю после введения вируса. Для этого 3 крысы, которым был введен вирус, экспрессирующий eArchT3.0 и 2 крысы, которым был введен контрольный вектор, были наркотизированы авертином (0,2 г/кг) и простимулированы зеленым светом (560 нм, 1.2 мВ/мм2, 20 Гц) в течение 3 минут при помощи оптотрода фирмы Neuronexus, введенного в

область DRN [Drozd, Lanshakov, 2020]. Через 1 час после теста животные были транскардиально перфузированы, и образцы мозга были отобраны для иммуногистохимического анализа. Схема эксперимента представлена на Рис. 7.

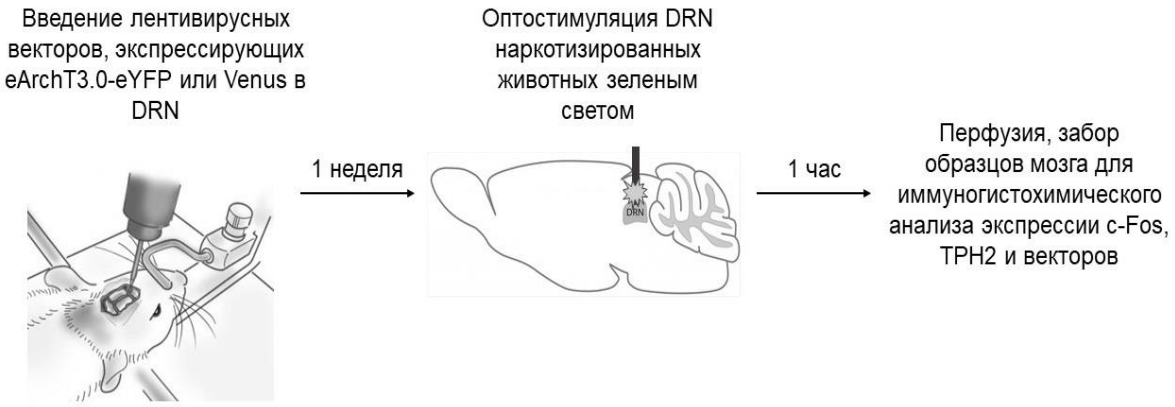


Рис. 7 Схема эксперимента по оптогенетическому ингибированию активности 5-НТ нейронов DRN взрослых животных.

После проведения необходимых этапов отработки метода оптогенетики мы приступили к оптогенетическим манипуляциям на взрослых животных.

2.6 Введение вирусных частиц в мозг взрослых животных

В гиппокамп взрослых животных вирусные векторы вводили по координатам AP = -3,3 мм, ML = 2 мм, DV = 2,9 мм. В DRN вирусные частицы были введены по координатам AP = -7.7 мм, ML = 0 мм, DV = 7 мм, согласно результатам отработки координат введения. Животные были наркотизированы авертином в дозе 0,2 г/кг, закреплены в стереотаксисе, поверхность черепа была освобождена от мягких тканей, после чего при помощи зубной дрели в черепе было проделано небольшое отверстие, через которое при помощи микро-шприца Hamilton neuros в течение 7 минут было введено 1 мкл вирусных частиц. Затем разрез на скальпе был зашит хирургическим швом и обработан стрептоцидом. Так же внутрибрюшинно было введено 100 мкл комбинированного антибиотика фирмы ПанЭко, содержащего 500 Ед пенициллина и 500 мкг стрептомицина.

2.7 Вживление оптоволоконной канюли

Операции по вживлению оптоволоконных канюль (Thorlabs, США) проводили через 3 недели после введения AAV в гиппокамп или через 1 неделю после введения лентивирусных векторов в DRN, - сроки, необходимые для достижения оптимального

уровня экспрессии векторов [Fleury и др., 2003; Lanshakov и др., 2016]. Отверстие в черепе, для введения вируса, расширялось до диаметра канюли, и рядом высверливали еще одно небольшое отверстие для внедрения микровинта. Конструкцию крепили светоотвердевающим зубным цементом (RelyX Luting 2, США). Затем разрез на скальпе был зашит хирургическим швом и обработан стрептоцидом. Так же внутрибрюшинно было введено 100 мкл комбинированного антибиотика фирмы ПанЭко, содержащие 500 Ед пенициллина и 500 мкг стрептомицина.

2.8 Оптогенетическое воздействие в тесте «подвешивание за хвост»

Через 1 неделю после имплантации канюль животные проходили тест «подвешивание за хвост». Всего было проведено 3 серии экспериментов:

1) на животных, которым вводили векторы в гиппокамп, исследовали влияние оптогенетической активации глутаматергических нейронов dCA1 на продолжительность неподвижности в тесте (Рис. 8 А);

2) на животных, которым вводили векторы в гиппокамп, исследовали влияние кетамина на пассивный поведенческий ответ, вызванный оптогенетической стимуляцией гиппокампа (Рис. 8 Б);

3) на животных, которым вводили векторы в DRN, исследовали влияние оптогенетического ингибирования 5-НТ нейронов на модулирующий эффект кетамина (Рис. 8 В).

Во второй и третьей сериях эксперементов половине животных из каждой группы (с оптогенетическим вектором или с контрольным) за 1 час до теста был введен кетамин в субанестетической дозе (15 мг/кг), а другой половине – физ. р-р. в эквивалентном объеме (0,5 мл/100 г) внутрибрюшинно.

Для проведения теста оптоволоконный кабель был подсоединен к канюле. Использованная система оптостимуляции не ограничивала свободные движения животных во время записи поведения в тесте «подвешивание за хвост». На 2-й, 4-й и 6-й минуте теста производилась оптостимуляция гиппокампа синим светом (480 нм, 1,2 мВ/мм2, 20 Гц) при помощи оптоволокна (Торлабс, США), подсоединенного к канюле, введенной в целевую область, а на 1-й, 3-й и 5-й минуте теста оптостимуляция не производилась. DRN облучалось зеленым светом (560 нм, 1,2 мВ/мм2, 20 Гц) на 1-й, 3-й и 5-й минуте теста, а на 2-й, 4-й и 6-й минуте теста оптостимуляция не производилась.

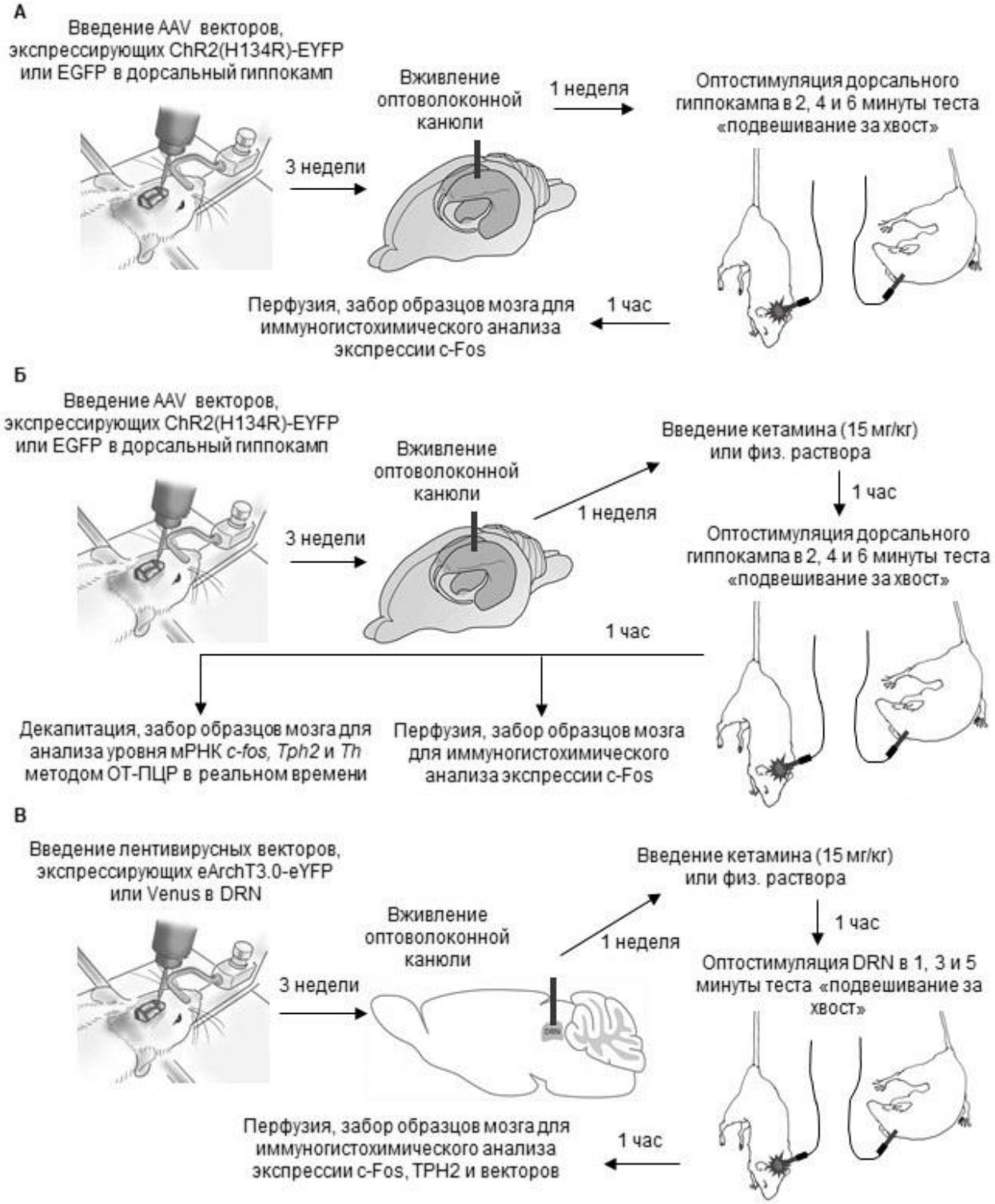


Рис. 8 Схемы экспериментов по оптогенетическим воздействиям на нейроны животных в процессе теста «подвешивание за хвост». **А** – Оптогенетическое стимулирование активности глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа; **Б** – Оптогенетическое стимулирование активности глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа после введения кетамина; **В** – Оптогенетическое ингибирование активности 5-НТ нейронов DRN после введения кетамина.

Через 1 час после теста у части животных (по 6 животных в группе) после быстрой декапитации собирали образцы мозга для анализа уровня мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Другие животные (по 4 в каждой группе) были транскардиально перфузированы, и образцы мозга были отобраны для иммуногистохимического анализа.

2.9 Иммуноферментный анализ уровня кортикостерона

Кровь центрифугировали при 1500 g и 4°C в течение 15 мин для получения плазмы, в которой определяли уровень кортикостерона при помощи набора для иммуноферментного анализа Corticosterone ELISA Kit (Enzo, США), согласно инструкции производителя.

2.10 Анализ уровня мРНК

После декапитации из мозга на холодовых блоках выделяли ПФК, гиппокамп, миндалину, средний мозг и ствол, которые замораживали в жидком азоте. Схема диссекции ствола показана на Рис. 9.

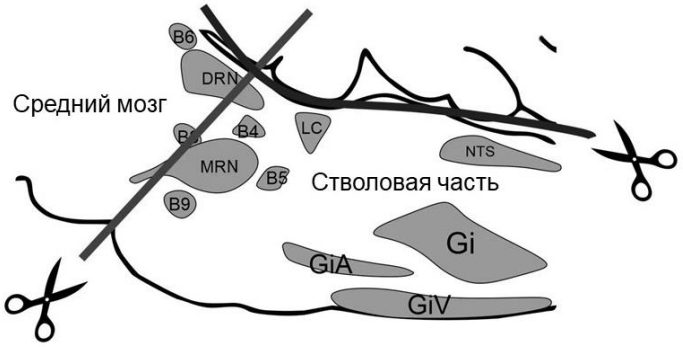


Рис. 9 Схема выделения стволовой части и среднего мозга.

Суммарную РНК выделяли из образцов ткани головного мозга методом одностадийной кислой фенольной экстракции [Chomczynski, Sacchi, 1987]. Образцы ткани гомогенизировали в 1 мл лизирующего раствора, содержащего 4 М изотиоцианат гуанидина, 25 мМ цитрата натрия (pH 7,0), 0,5% саркозила и 0,1 М 2-меркаптоэтанола. К полученному гомогенату добавляли 0,1 мл 2 М ацетата натрия (pH 4,0) и 1 мл водонасыщенного фенола (Sigma-Aldrich, США), после чего смесь интенсивно встряхивали. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа (Союзхимпром, Россия), повторно встряхивали и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Водную фазу

переносили в чистую пробирку, добавляли равный объём изопропанола и инкубировали при –20°C в течение 1 ч для осаждения РНК. Осадок РНК собирали центрифугированием (12 000 g, 15 мин, 4°C), промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в воде, обработанной диэтилпирокарбонатом. Концентрацию РНК оценивали спектрофотометрически, а качество препарата контролировали по соотношению OD 260/280. Для дальнейшего анализа отбирали только образцы с отношением OD 260/280, близким к 2,0.

Для получения кДНК 3-5 мкг суммарной РНК каждого образца инкубировали 90 мин при 42˚C в 20 мкл смеси, содержащей 50U ревертазы MuLV («СибЭнзим», Россия), 5 мкМ Oligo(dT)15 праймера, 1,5 мМ каждого dNTP, 1× буфер (50 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 3 мМ MgCl2, 75 мМ KCl, 10 мМ DTT). Перед началом реакции смесь РНК, Oligo(dT)15 праймера и воды прогревали при при 70˚C в течение 1 мин, затем реакцию проводили 1 час при 42 ˚C. По окончании инкубации фермент инактивировали нагреванием до 70˚C в течение 10 мин. Образцы кДНК хранили при -80˚C. Для ПЦР кДНК разводили в 25 раз.

Количественный анализ содержания мРНК гена *c-fos* относительно мРНК *actb* проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (*c-fos*: Rn02396759_m1, *actb*: Rn00667869_m1) на амплификаторе ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Все реакции проводили в трехкратной повторности на образцах кДНК в 96-луночных оптических планшетах по протоколу производителя в 25 мкл 1×TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). ПЦР состояла из 1 цикла при 50°C в течение 2 мин и 95°C в течение 10 мин, за которыми следовали 40-45 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. Эффективность амплификации для кДНК β-актина и исследованных генов составляла 98–100%, что позволило применять сравнительный метод ΔΔCt для расчёта экспрессии мРНК относительно бета-актина в качестве эндогенного контроля в соответствии с руководством производителя (Applied Biosystems). Достоверных изменений уровня порогового цикла для бета-актина между группами обнаружено не было, что позволяет заключить, что экспрессия бета-актина оставалась неизменной.

2.11 Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга

Через 1 час после теста взрослых крыс наркотизировали авертином в дозе 20 мг на 100 г веса тела, транскардиально перфузировали 1xPBS и 4% PFA, извлекали мозг, постфиксировали 4 часа в 4% PFA и сутки в 30% растворе сахарозы. После этого образцы мозга замораживали в геле Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при

температуре -70℃. Для иммуногистохимического анализа готовили срезы толщиной 20 мкм на криотоме Microm. Приготовленные срезы головного мозга промывали 10 мин в PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 1.5% BSA в течение часа в PBST. С первичными антителами (Табл. 2) срезы инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Антитела разводили в PBS, содержащем 1.5 % BSA и 0.2% Triton X-100 в разведении 1:200. После инкубации с первичными антителами срезы промывали дважды по 15 минут в PBST и инкубировали с вторичными антителами (Табл. 2) в разведении 1:500 в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем дважды промывали в PBST и заключали в среду с мовеолом и ядерным красителем DAPI.

Табл. 2 Антитела, использованные для выявления белков

Выявляемый белок	**Первичные антитела**	**Вторичные антитела**
c-Fos (в эксперименте с кетамином без оптогенетики)	9F6, Rabbit, «Cell Signaling»	711-546-152, **Alexa Fluor 488** AffiniPure F(ab') Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), «Jackson ImmunoResearch Laboratories»
c-Fos (в экспериментах с оптогенетикой в гиппокампе)	9F6, Rabbit, «Cell Signaling»	711-166-152, **Cy3** AffiniPure F(ab') Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), «Jackson ImmunoResearch Laboratories»
c-Fos (в экспериментах с оптогенетикой в DRN)	9F6, Rabbit, «Cell Signaling»	711-606-152 **Alexa Fluor 647**-conjugated AffiniPure F(ab')2 Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), «Jackson ImmunoResearch Laboratories»
Satb2	SATBA4B10, Mouse, «Santa Cruz»	715-166-151, **Cy3**-conjugated AffiniPure F(ab') Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), «Jackson ImmunoResearch Laboratories»
eYFP/Venus (для усиления сигнала)	AB1218, «Rabbit, Abcam»	711-545-152 **Alexa Fluor 488** AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), «Jackson ImmunoResearch Laboratories»
TPH2	AB1541, Sheep, «Millipore»	20095, Donkey Anti-Sheep IgG (H+L), **CF568**, «Biotium»

Окрашенные антителами препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO («Carl Zeiss», Германия) при 20х увеличении, далее фотографии анализировали с помощью программы ZEN («Carl Zeiss», Германия) и/или QuPath

(Bankhead, et al., 2017). При этом подсчитывалось средняя интенсивность флуоресценции красного сигнала или нормированное на 1 мм^2 количество клеток, экспрессирующих белок раннего ответа c-Fos, флуоресцентные белки ChR2(H134R)-EYFP, EGFP, eArchT3.0-eYFP, Venus и белки маркеры клеточного типа Satb2, а также количество клеток, коэкпрессирующих комбинации этих белков. В программе QuPath для этого использовалась детекция клеток по ядрам, окрашенным DAPI с последующей классификацией, осуществленной на основе подсчета зеленых и красных пикселей. Порог интенсивности для детекции пикселей и классификации был установлен для каждого типа окрашивания отдельно и применен ко всем образцам в выборке одинаково.

2.12 Статистическая обработка результатов

По количественным данным рассчитывалось среднее значение со стандартным отклонением от среднего. Для оценки экспрессии c-Fos в экспрессирующих вектор нейронах рассчитывался процент коэкспрессирующих eArchT3.0-eYFP/Venus+c-Fos от общего числа экспрессирующих вектор клеток по формуле (количество коэкспрессирующих клеток/количество экспрессирующих вектор клеток) *100%.

Для проверки нормальности распределения данных был использован тест Колмогорова-Смирнова. Показатели поведенческого теста обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента или одно- или двухфакторным дисперсионным анализом для повторных измерений (факторы: вектор, оптостимуляция, кетамин), а результаты анализа экспрессии мРНК, кортикостерона и иммуногистохимического анализа экспрессии белков – однофакторным или двухфакторным дисперсионным анализом (факторы: вектор, кетамин) с последующим апостериорным сравнением по Фишеру или с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимым результат считали при $p < 0,05$. Статистические расчеты проводили в пакете программ STATISTICA 10.0. На графиках данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Глава 3. Результаты

3.1 Влияние субанестетической дозы кетамина на поведение и активность нейронов головного мозга в условиях острого стресса

3.1.1 Влияние кетамина на поведенческий ответ в тесте «подвешивание за хвост»

Введение субанестетической дозы кетамина снизило продолжительность неподвижности в тесте «подвешивание за хвост». Однократная доза кетамина, введённая внутрибрюшинно интактным крысам за 1 час до теста, статистически значимо снизила как суммарное время неподвижности (t_{14} = 3,73; p < 0,01; Рис. 10 А), так и среднюю продолжительность одного эпизода замирания (t_{13} = 2,99; p < 0,05; Рис. 10 Б), не влияя на общее число таких эпизодов (контроль: 12,25 ± 0,94, кетамин: 13,00 ± 2,46; t_{15} = 0,322; p = 0,752) по сравнению с контролем.

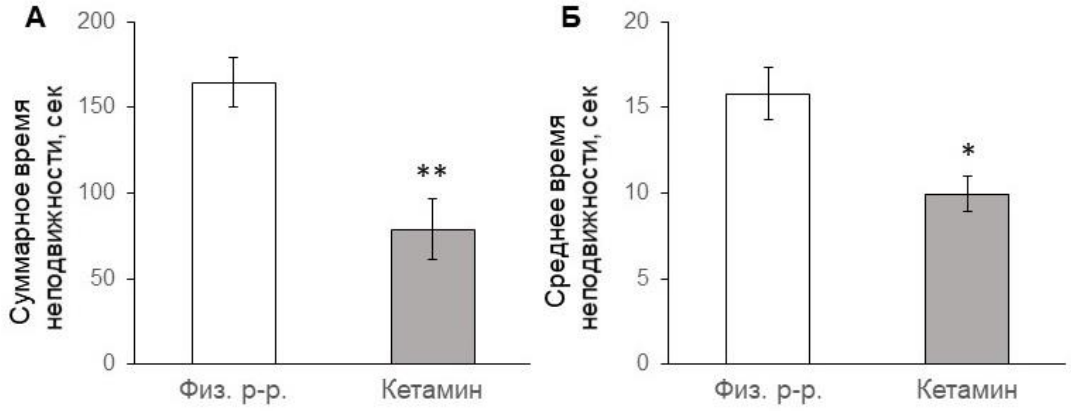


Рис. 10 Влияние кетамина на поведение в тесте «подвешивание за хвост». **А** – общая продолжительность неподвижности; **Б** – средняя продолжительность одного эпизода замирания; * - p < 0,05, ** - p < 0,01 по сравнению с контрольной группой (Физ. р-р).

3.1.2 Уровень кортикостерона в плазме крови

Через час после теста «подвешивание за хвост» уровень кортикостерона в плазме крови был измерен с помощью иммуноферментного метода. Было обнаружено, что однократное введение кетамина ослабляло гормональную реакцию на острый неизбегаемый стресс, вызванный процедурой тестирования животных, и предотвращало увеличение уровня глюкокортикоидов (Рис. 11 А). Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали статистически значимое влияние острого стресса ($F_{1,20}$ =

7,35; $p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,20} = 4,63$; $p < 0,05$).

Сниженный кетамином уровень кортикостерона положительно коррелировал с продолжительностью неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» ($r = 0,64$; $p < 0,02$; $n = 10$, рис. 11 Б)

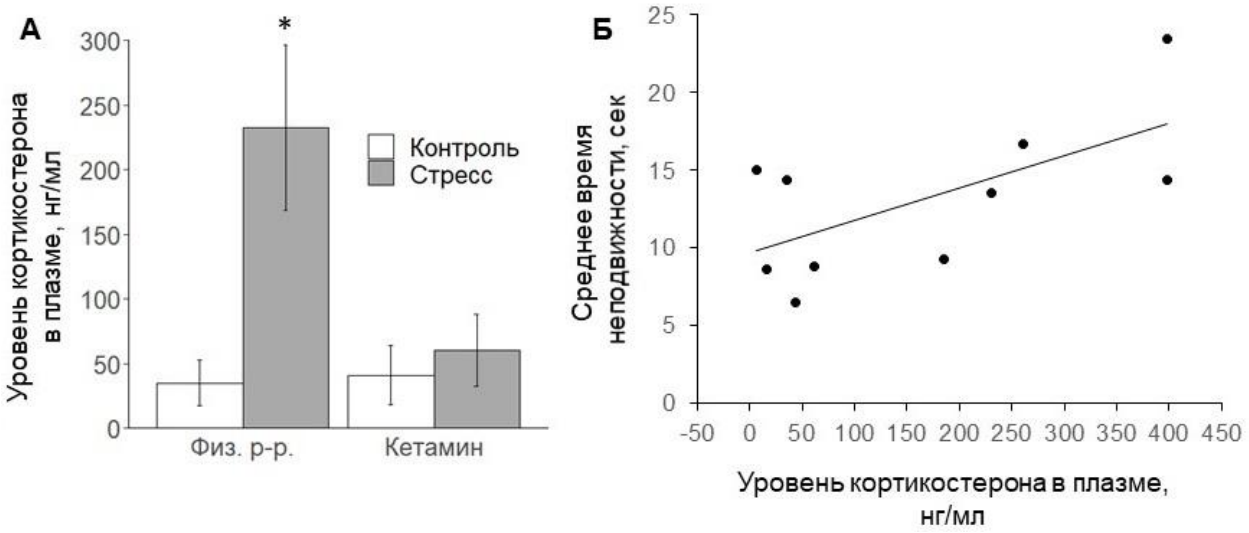


Рис. 11 Влияние кетамина на уровень кортикостерона и его связь с поведенческим ответом. **А** – Уровень кортикостерона в плазме крови через 1 час после острого неизбегаемого стресса; * - $p < 0,05$ по сравнению группами Физ. р-р. – Контроль и Кетамин – Стресс; **Б** – Корреляция между уровнем кортикостерона в плазме крови и средней продолжительностью одного эпизода замирания в тесте «подвешивание за хвост».

3.1.3 Уровни мРНК гена c-fos в отделах головного мозга

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени был оценен уровень экспрессии гена раннего ответа *c-fos,* показателя активации нейронов, в нескольких отделах головного мозга. Было установлено статистически значимое увеличение уровня экспрессии мРНК гена *c-fos* при действии острого неизбегаемого стресса во всех исследованных структурах: в ПФК ($F_{1,18} = 93,53$; $p < 0,001$), гиппокампе ($F_{1,18} = 10,72$; $p < 0,01$), миндалине ($F_{1,17} = 105,67$; $p < 0,001$), среднем мозге ($F_{1,19} = 60,12$; $p < 0,001$) и стволе ($F_{1,19} = 8,20$; $p < 0,01$). В то же время статистически значимое влияние фактора «Кетамин» было обнаружено только в миндалине ($F_{1,17} = 15,10$; $p < 0,01$), а статистически значимое взаимодействие факторов во всех исследованных структурах, за исключением гиппокампа: в ПФК ($F_{1,18} = 12,29$; $p < 0,01$), миндалине ($F_{1,17} = 16,93$; $p < 0,001$), среднем мозге ($F_{1,19} = 5,21$; $p < 0,05$) и в стволовой части ($F_{1,19} = 8,20$; $p < 0,01$).

Межгрупповые сравнения выявили статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение

уровня мРНК гена *c-fos* при процедуре теста подвешивания за хвост (Рис. 12): коре (в 5 раз), миндалине (в 5 раз), гиппокампе (в 2,8 раза), среднем мозге (в 2,5 раза) и стволе (в 2,4 раза). Кетамин повышал уровень мРНК *c-fos* у нестрессированных животных в ПФК (в 2,3 раза, $p < 0,01$) и в стволовой части мозга (в 1,7 раза, $p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой, получившей физ. р-р. При этом кетамин статистически значимо снижал индуцируемое стрессом повышение уровня мРНК *c-fos* в миндалине и среднем мозге. В ПФК и стволовой части, несмотря на то, что и острый стресс, и кетамин вызывали увеличение уровня мРНК *c-fos*, при воздействии обоих факторов это увеличение не превышало таковое, вызванное острым стрессом. (Рис. 12).

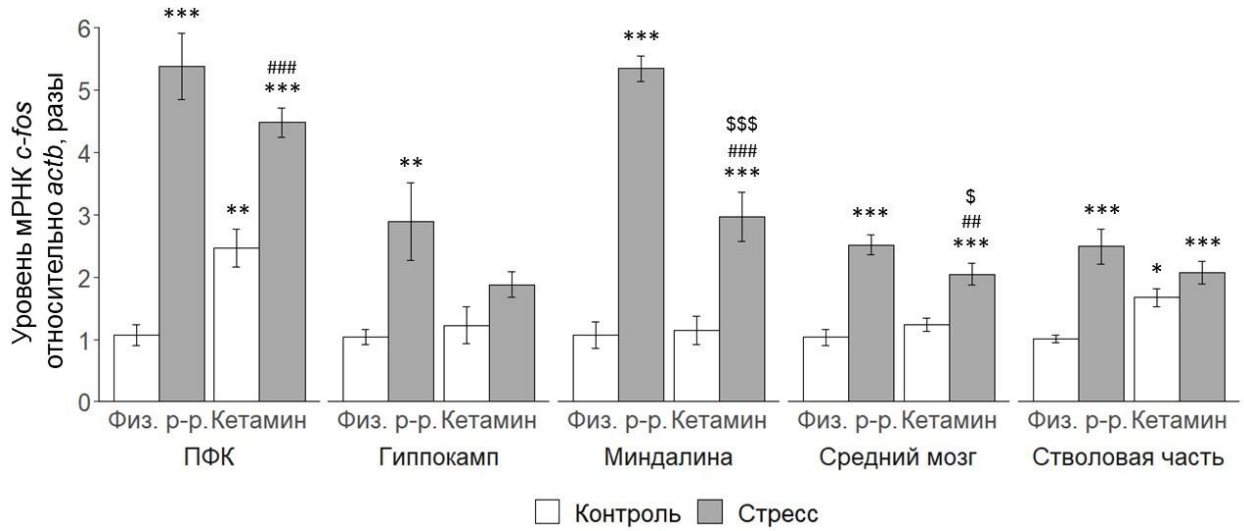


Рис. 12 Уровни мРНК гена *c-fos* в отделах головного мозга после введения субанестетической дозы кетамина; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой Физ. р-р. – Контроль, ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$ по сравнению с группой Кетамин – Контроль, $ - $p < 0,05$, $$$ - $p < 0,001$ по сравнению с группой Физ. р-р. – Стресс.

3.1.4 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах ПФК

Оценка иммуногистохимического окрашивания белка c-Fos выявила согласованные изменения экспрессии гена и белка в ПФК. Острый неизбегаемый стресс повышал общее число нейронов, экспрессирующих c-Fos ($F_{1,26} = 30,23$; $p < 0,001$), но не влиял на количество клеток, коэкпрессирующих c-Fos и Satb2 (Рис. 13). Введение кетамина увеличивало общее число c-Fos+ нейронов в ПФК как в покое, так и при действии стресса ($F_{1,26} = 20,37$; $p < 0,001$).

Стимулирующий эффект кетамина наблюдался как для всей популяции клеток ПФК, так и для глутаматергических нейронов этого отдела мозга, экспрессирующих

транскрипционный фактор Satb2 (Рис. 13). Предварительное введение кетамина вызывало увеличение экспрессии c-Fos в глутаматергических Satb2+ нейронах ($F_{1,26}$ = 5,99; $p < 0,05$) в покое, но не приводило к дополнительному росту экспрессии при стрессе ($F_{1,26}$ = 3,07; $p > 0,05$).

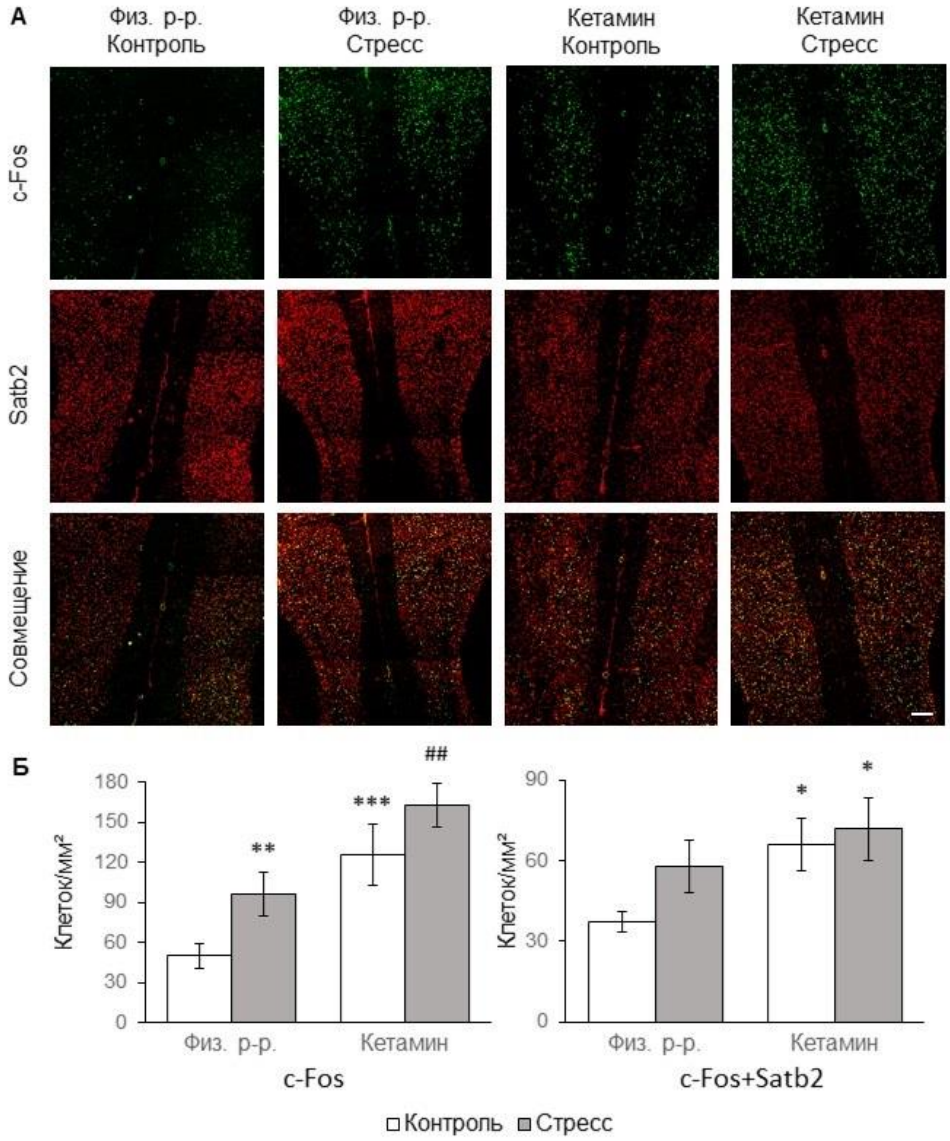


Рис. 13 Влияние кетамина и острого неизбегаемого стресса на экспрессию c-Fos и Satb2 в нейронах ПФК. **А** – Репрезентативные фотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos и Satb2 в нейронах ПФК после острого неизбегаемого стресса и введения кетамина. Шкала 200 мкм; **Б** – Количество экспрессирующих c-Fos и коэкспрессирующих c-Fos и Satb2 нейронов в ПФК после введения кетамина и острого неизбегаемого стресса; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с группой Физ. р-р. – Контроль, ## - $p < 0,01$ по сравнению с группами Физ. р-р. – Контроль, Физ. р-р. – Стресс и Кетамин – Контроль.

В целом, полученные нами данные свидетельствуют об активации кетамином базального уровня экспрессии гена и белка c-Fos в ПФК как в покое, так и при остром неизбегаемом стрессе (подвешивание за хвост). При этом в реакцию на острый стресс Satb2+ нейроны не вовлекаются.

3.1.5 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах гиппокампа

Анализ экспрессии белка c-Fos в гиппокампе проводили в его традиционно выделяемых областях – CA1, CA2, CA3 и DG (Рис. 14). Статистически значимое влияние фактора «Стресс» на количество экспрессирующих c-Fos нейронов было выявлено в CA3 ($F_{1,8} = 11,74$; $p < 0,01$) и DG ($F_{1,8} = 13,14$; $p < 0,01$). Статистически значимое взаимодействие факторов наблюдалось в CA3 ($F_{1,8} = 10,99$; $p < 0,05$) и DG ($F_{1,8} = 7,12$; $p < 0,05$). В областях CA1 и CA2 дорсального гиппокампа статистически значимых влияний факторов или их взаимодействия не было обнаружено. Количество экспрессирующих c-Fos нейронов увеличивалось в области CA3 и DG только при совместном действии кетамина и острого неизбегаемого стресса, но не изменялось при отдельном воздействии этих факторов (Рис 14).

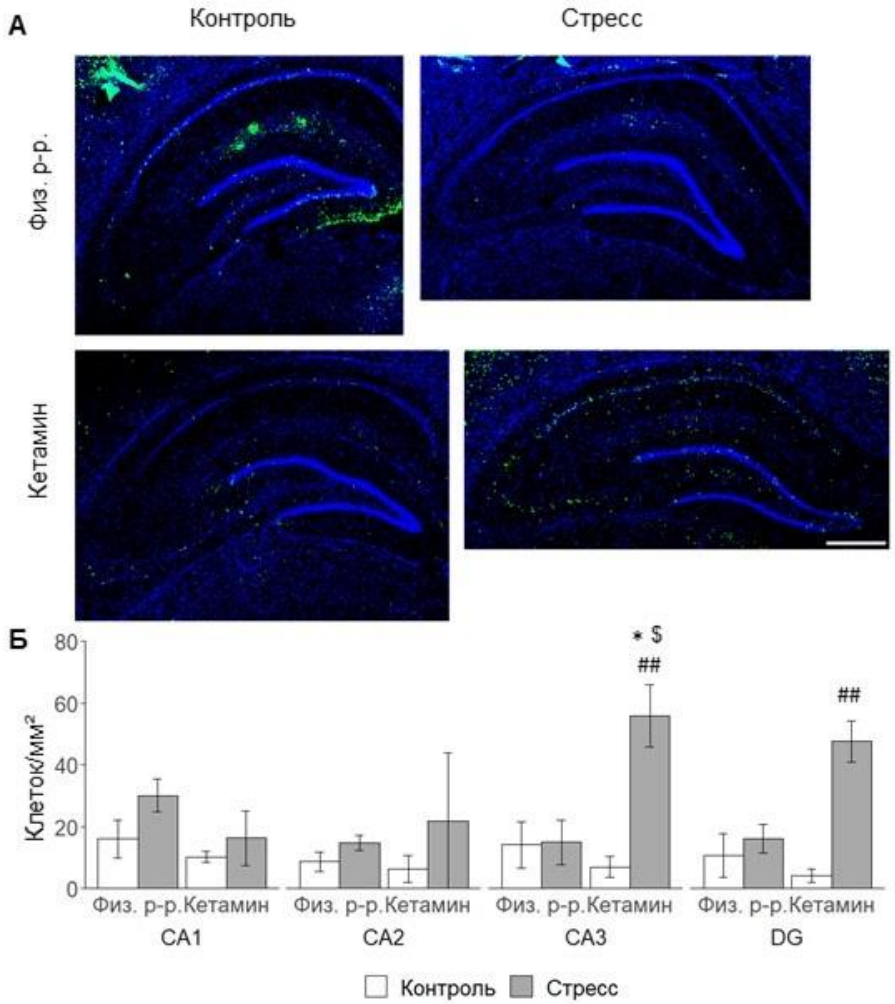


Рис. 14 Влияние кетамина и острого неизбегаемого стресса на экспрессию c-Fos и в нейронах гиппокампа. **А** – Репрезентативные фотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos (зеленый) в нейронах гиппокампа после введения кетамина и острого стресса; синим окрашены ядра клеток, шкала 500 мкм; **Б** – Количество экспрессирующих c-Fos нейронов в областях CA1, CA2, CA3 и DG гиппокампа после введения кетамина и острого стресса; * - $p < 0,05$ по сравнению с группой Кетамин – Контроль, ## - $p < 0,01$ по сравнению с группой Кетамин – Контроль, $ - $p < 0,05$ по сравнению с группой Физ. р-р. – Стресс.

3.1.6 Влияние кетамина на экспрессию белка c-Fos в нейронах DRN среднего мозга

DRN расположено в блоке ткани среднего мозга и является одним из основных мест локализации 5-НТ нейронов. В этом ядре проводили анализ экспрессии c-Fos после введения кетамина и острого неизбегаемого стресса. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимое влияние фактора «Кетамин» ($F_{1,11} = 8,58$, $p = 0,014$) и фактора «Стресс» ($F_{1,11} = 5,36$, $p = 0,041$), тогда как взаимодействие факторов было

незначимым.

Апостериорный анализ показал, что количество c-Fos-позитивных нейронов было статистически значимо увеличено только у животных, получавших кетамин и подвергнутых стрессу, по сравнению с контрольной группой, получавшей физ. р-р. без стресса (Рис. 15). Ни кетамин сам по себе, ни стресс сам по себе не вызывали значимых изменений экспрессии c-Fos по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффекты кетамина и стресса суммируются в DRN, приводя к выраженному увеличению нейрональной активации только при совместном действии обоих факторов.

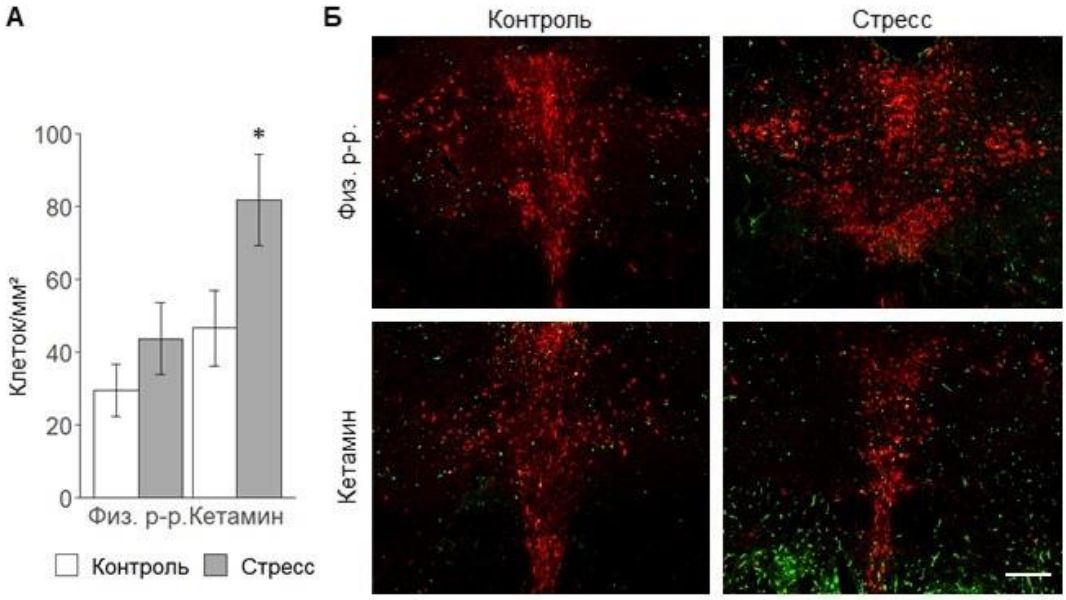


Рис. 15 Влияние кетамина и острого неизбегаемого стресса на экспрессию c-Fos и в нейронах DRN. **А** – Количество экспрессирующих c-Fos нейронов в DRN после введения кетамина и острого стресса; * - $p < 0,05$ по сравнению с группой Физ. р-р. –Контроль; **Б** – Репрезентативные фотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos (зеленый) и TPH2 (красный) в нейронах DRN после введения кетамина и острого стресса, шкала 200 мкм.

Таким образом, в данном разделе работы показано, что при действии острого неизбегаемого стресса, обусловленного тестом «подвешивание за хвост», кетамин уменьшал продолжительность пассивного поведенческого ответа и снижал уровень кортикостерона в крови. Также кетамин значительно влиял на уровень экспрессии мРНК гена *c-fos* в разных отделах головного мозга. В ПФК кетамин действовал подобно острому стрессу: увеличивал уровень мРНК *c-fos* и количество нейронов, экспрессирующих белок c-Fos. Однако увеличение числа Satb2-положительных нейронов (с внутрикортикальными

проекциями) вызывалось только кетамином, но не острым стрессом. В гиппокампе только острый стресс повышал уровень мРНК *c-fos*, тогда как увеличение экспрессии белка c-Fos происходило исключительно при сочетанном действии кетамина и стресса в области CA3 и DG. В миндалине и блоке ткани среднего мозга острый стресс также вызывал повышение уровня мРНК *c-fos*, однако кетамин препятствовал полному развитию этой реакции. В дорсальном ядре шва, расположенном в этом блоке, при сочетанном действии кетамина и стресса, напротив, происходило увеличение экспрессии белка c-Fos. Полученные в разделе 3.1 результаты опубликованы в статье [Drozd и др., 2027]

3.2 Роль активности нейронов дорсального гиппокампа в формировании пассивного поведенческого ответа и его предотвращение кетамином

3.2.1 Влияние оптогенетической активации нейронов дорсального гиппокампа на пассивный поведенческий ответ крыс в тесте «подвешивание за хвост»

Тест «подвешивание за хвост» провели для оценки влияния оптогенетической активации глутаматергических нейронов области dCA1 на пассивный поведенческий ответ крыс. В ходе эксперимента стимуляция дорсального гиппокампа светом проводилась на 2, 4 и 6 минуты теста, а на 1, 3 и 5 минуты — нет. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил статистически значимые влияния факторов «Вектор» ($F_{1,18}$ = 8,30; $p < 0,01$), «Оптостимуляция» ($F_{1,18}$ = 5,75; $p < 0,05$) и «Минута теста» (повторяющееся измерение, $F_{2,36}$ = 11,71; $p < 0,001$). В периоды без оптостимуляции продолжительность неподвижности у животных, нейроны которых экспрессировали фоточувствительный белок ChR2(H134R)-EYFP, не отличалась от таковой у животных, экспрессирующих контрольный вектор ($p = 0,19$). Стимуляция светом нейронов дорсального гиппокампа у контрольных животных не оказывала влияния на поведение в тесте ($p = 0,35$). Однако у животных, с экспрессией ChR2(H134R)-EYFP, при стимуляции светом наблюдалось значительное увеличение времени неподвижности ($p < 0,05$; Рис. 16 А). Таким образом, можно заключить, что оптогенетическая активация глутаматергических нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа вызывала увеличение пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост».

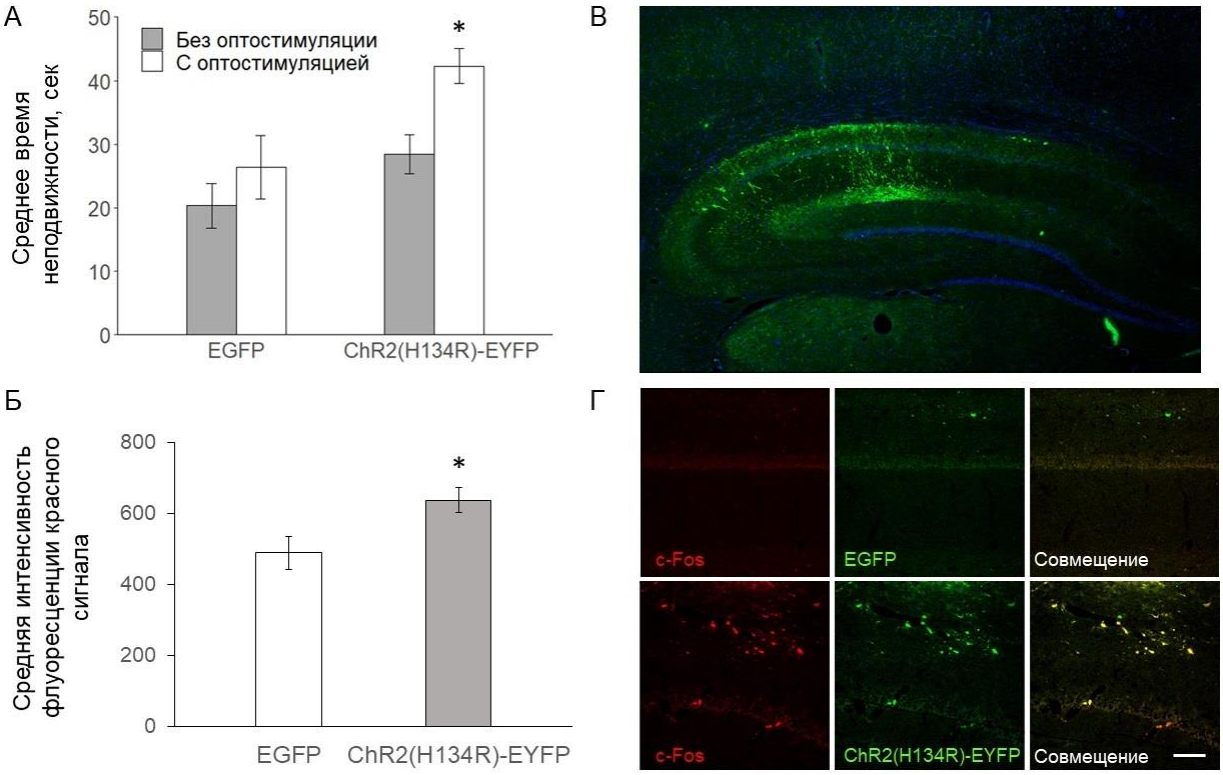


Рис. 16 Влияние оптогенетической активации глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа на поведенческий ответ и экспрессию c-Fos в области CA1. **А** – средняя продолжительность неподвижности за 3 минуты с оптостимуляцией и без неё в тесте «подвешивание за хвост»; * – $p < 0,05$ по сравнению группами ChR2(H134R)-EYFP – без оптостимуляции и EGFP – с оптостимуляцией; **Б** – средняя интенсивность красного флуоресцентного сигнала, соответствующего иммуногистохимической окраске c-Fos, в области CA1 дорсального гиппокампа после оптостимуляции во время острого неизбегаемого стресса; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой EGFP; **В** – панорамная микрофотография, иллюстрирующая экспрессию вектора в гиппокампе; **Г** – репрезентативные микрофотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos и экспрессии флуоресцентных репортерных белков в области поля CA1 дорсального гиппокампа после оптостимуляции во время острого неизбегаемого стресса; шкала – 100 мкм.

3.2.2 Экспрессия белка c-Fos в нейронах гиппокампа после оптостимуляции во время острого неизбегаемого стресса

Для подтверждения активации нейронов при оптогенетической стимуляции белок раннего ответа c-Fos был выявлен иммуногистохимически в области dCA1. Оптостимуляция приводила к увеличению средней интенсивности красного

флуоресцентного сигнала, соответствующего иммуногистохимической окраске c-Fos, у животных, нейроны которых были чувствительны к свету, по сравнению с контрольной группой (F1,9 = 7,26; p < 0,05, Рис. 16 Б-Г). Увеличение экспрессии c-Fos после оптостимуляции свидетельствует об активации экспрессирующих ChR2(H134R)-EYFP нейронов.

Таким образом, оптогенетическая стимуляция глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа у взрослых крыс приводила к увеличению продолжительности пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост» и росту экспрессии белка c-Fos в области dCA1.

3.2.3 Влияние кетамина на пассивный поведенческий ответ, вызванный оптостимуляцией дорсального гиппокампа, в тесте «подвешивание за хвост»

Введение субанестетической дозы кетамина за 1 час до оптостимуляции предотвращало увеличение продолжительности неподвижности в тесте «подвешивание за хвост». В периоды теста, когда оптостимуляция не проводилась, поведение животных с фоточувствительными нейронами не отличалось от поведения животных контрольной группы ($F_{1,22}$ = 0,55; p = 0,47). Введение кетамина не влияло на продолжительность неподвижности во время этих периодов ($F_{1,22}$ = 1,60; p = 0,22). В ходе эксперимента, когда на гиппокамп воздействовали светом, у животных с экспрессией ChR2(H134R)-EYFP наблюдалось увеличение пассивного поведенческого ответа ($F_{1,22}$ = 7,04; p < 0,05). Однако введение кетамина полностью устраняло этот эффект ($F_{1,22}$ = 7,92; p < 0,01; Рис. 17 А). Таким образом, увеличение пассивного поведенческого ответа, вызванное оптостимуляцией глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа, предотвращалось предварительным введением субанестетической дозы кетамина.

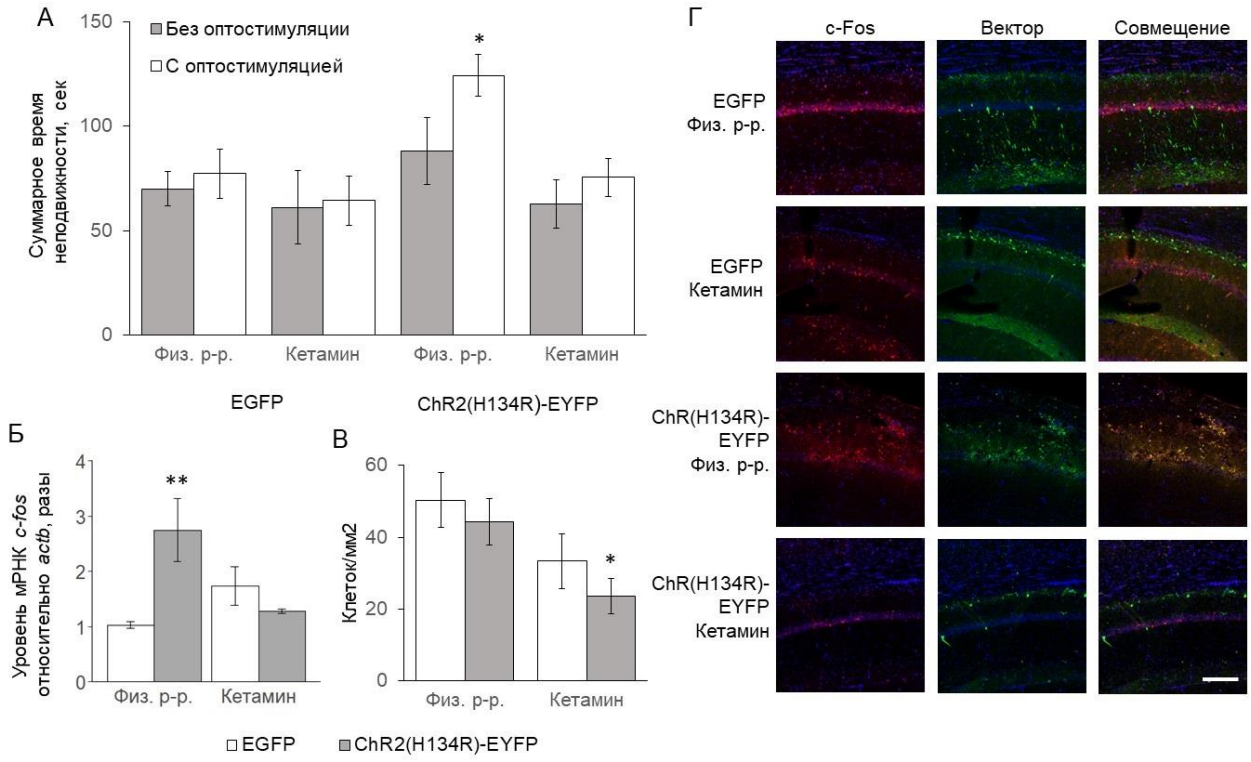


Рис. 17 Влияние кетамина на поведенческий ответ и экспрессию c-Fos, вызванные оптогенетической активацией глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа. **А** – Суммарная продолжительность неподвижности за 3 минуты с оптостимуляцией и без неё в тесте «подвешивание за хвост» через 1 час после введения кетамина; * – $p < 0,05$ по сравнению со всеми группами с оптостимуляцией: EGFP – Физ. р-р., EGFP – Кетамин, ChR2(H134R)-EYFP – Кетамин; **Б** – уровень мРНК *c-fos* в гиппокампе после введения кетамина и оптостимуляции дорсального гиппокампа; ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой EGFP – Физ. р-р. и ChR2(H134R)-EYFP – Кетамин; **В** – количество экспрессирующих c-Fos клеток в области CA1 гиппокампа после введения кетамина и оптостимуляции дорсального гиппокампа; * – $p < 0,05$ по сравнению с группами EGFP – Физ. р-р и ChR2(H134R)-EYFP – Физ. р-р; **Г** – репрезентативные микрофотографии иммуногистохимического окрашивания c-Fos и флуоресцентных репортёрных белков (EGFP или ChR2(H134R)-EYFP) в области CA1 дорсального гиппокампа после введения кетамина и оптостимуляции. Шкала – 200 мкм.

3.2.4 Влияние кетамина на экспрессию мРНК гена *c-fos* и белка c-Fos в гиппокампе при оптостимуляции

Через час после оптостимуляции и подвешивания за хвост влияние кетамина на вызванную оптостимуляцией активацию нейронов оценивали по уровню мРНК *c-fos* и количеству экспрессирующих c-Fos нейронов в дорсальном гиппокампе. Исследование

уровня мРНК *c-fos* в гиппокампе через час после теста показало статистически значимое взаимодействие факторов «Кетамин» и «Вектор» ($F_{1,16} = 12{,}62$; $p < 0{,}01$). Оптогенетическая активация нейронов дорсального гиппокампа повышала экспрессию мРНК *c-fos* в этой области мозга, а предварительное введение кетамина предотвращало это повышение у оптостимулированных крыс, чувствительных к воздействию света (Рис. 17 Б).

Иммуногистохимический анализ количества нейронов, экспрессирующих белок c-Fos в CA1 гиппокампа, показал статистически значимое снижение экспрессии c-Fos под действием кетамина ($F_{1,12} = 4{,}69$; $p < 0{,}05$) у животных с введением ChR2(H134R)-EYFP (Рис. 17 В, Г). Таким образом, кетамин предотвращал вызванное оптостимуляцией увеличение экспрессии c-Fos в нейронах дорсального гиппокампа.

В целом, по результатам данного раздела работы можно заключить, что кетамин препятствует эффекту оптогенетической активации глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа: снижает продолжительность пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», предотвращает повышение уровня мРНК *c-fos* в гиппокампе и уменьшает число c-Fos-позитивных клеток в области dCA1. Полученные в разделе 3.2 результаты опубликованы в статье [Drozd и др., 2025]

3.3 Роль активности 5-HT нейронов DRN в модуляции поведенческого ответа кетамином

3.3.1 Оптогенетическое ингибирование 5-HT нейронов DRN: первичная валидация метода

Для проверки того, что введённые в мозг животных оптогенетические векторы экспрессируются в 5-HT нейронах и оказывают на них ингибирующий эффект, сначала провели оптостимуляцию DRN зелёным светом на наркотизированных животных. Часть срезов головного мозга на уровне DRN иммуногистохимически окрасили по TPH2 для маркировки 5-HT нейронов, а другие срезы – по c-Fos, используемому как маркер нейрональной активности. Экспрессию векторов определяли по флуоресцентным белкам eYFP и Venus.

В пределах DRN наблюдалась экспрессия флуоресцентных белков в большинстве TPH2-позитивных нейронов (рис. 18).

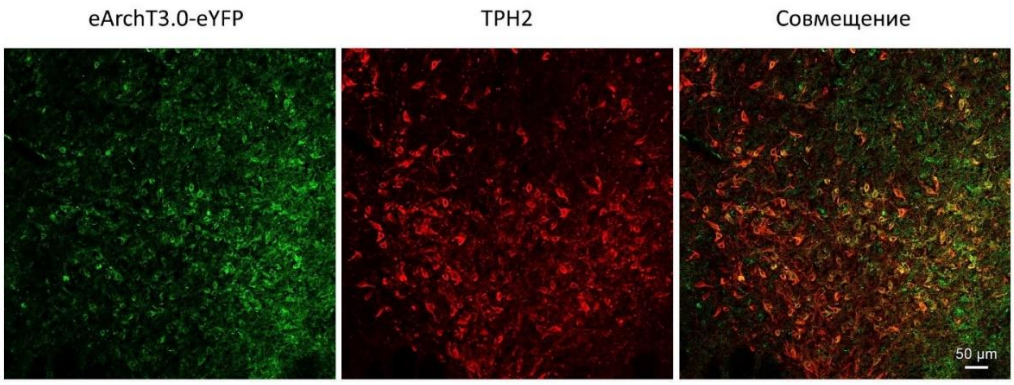


Рис. 18 Экспрессия eArchT3.0-eYFP в 5-НТ нейронах DRN через 1 неделю после введения лентивирусных частиц.

Для оценки ингибирующего эффекта зелёного света на нейроны, экспрессирующие eArch3.0, подсчитали количество клеток, экспрессирующих векторы, и количество клеток с коэкспрессией c-Fos и eYFP/Venus, после чего рассчитали процент eYFP/Venus-позитивных нейронов, коэкспрессирующих c-Fos. Через 30 минут после фотостимуляции у животных, экспрессирующих оптогенетический вектор, процент нейронов с коэкспрессией c-Fos и eYFP был ниже, чем процент нейронов с коэкспрессией c-Fos и Venus в контрольной группе ($t = 4{,}26$; $p < 0{,}05$, Рис. 19). Снижение доли c-Fos-позитивных клеток среди трансфицированных оптогенетическим вектором нейронов подтверждает эффективность подавления их активности.

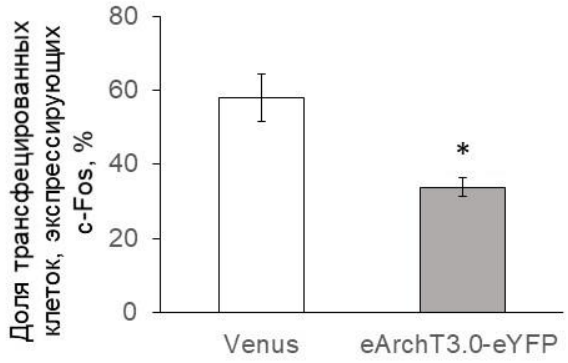


Рис. 19 Влияние оптогенетического ингибирования активности 5-НТ нейронов DRN, экспрессирующих фоточувствительный вектор eArchT3.0-eYFP или контрольный вектор Venus, на экспрессию в них белка раннего ответа c-Fos, * - $p<0{,}05$ по сравнению с Venus.

В данном разделе показано, что при введении в DRN векторов, кодирующих белки под контролем специфического для 5-НТ нейронов промотора гена TPH2, эти белки

экспрессируются в 5-НТ нейронах с высокой специфичностью. Стимуляция зелёным светом вызывает снижение экспрессии маркера нейрональной активности – белка c-Fos – в нейронах, экспрессирующих фоточувствительный белок, у наркотизированных животных. Полученные в разделе 3.3.1 результаты опубликованы в статье [Drozd, Lanshakov, 2020]

3.3.2 Количественная оценка специфичности экспрессии вирусных векторов в 5-НТ нейронах DRN

Специфичность экспрессии вируса в 5-НТ нейронах оценивали на животных, участвовавших в основном эксперименте с тестом «подвешивание за хвост». Для этого на 6 срезах от каждого животного подсчитали общее количество нейронов, экспрессирующих флуоресцентный белок eArchT3.0-eYFP/Venus (маркер вектора), и количество нейронов с коэкспрессией вектора и ТРН2, после чего рассчитали процентное соотношение.

Через 2 недели после введения вирусных векторов 90,72 ± 1,13% нейронов, экспрессировавших Venus, и 94,05 ± 1,03% нейронов, экспрессировавших eArchT3.0-eYFP, также экспрессировали ТРН2 (рис. 20А). Это свидетельствует о высокой специфичности экспрессии векторов в 5-НТ нейронах.

Также рассчитали процент ТРН2-позитивных нейронов, экспрессировавших вектор: 42,46 ± 2,16% ТРН2-позитивных нейронов экспрессировали Venus и 41,64 ± 2,12% – eArch3.0-eYFP (рис. 20Б).

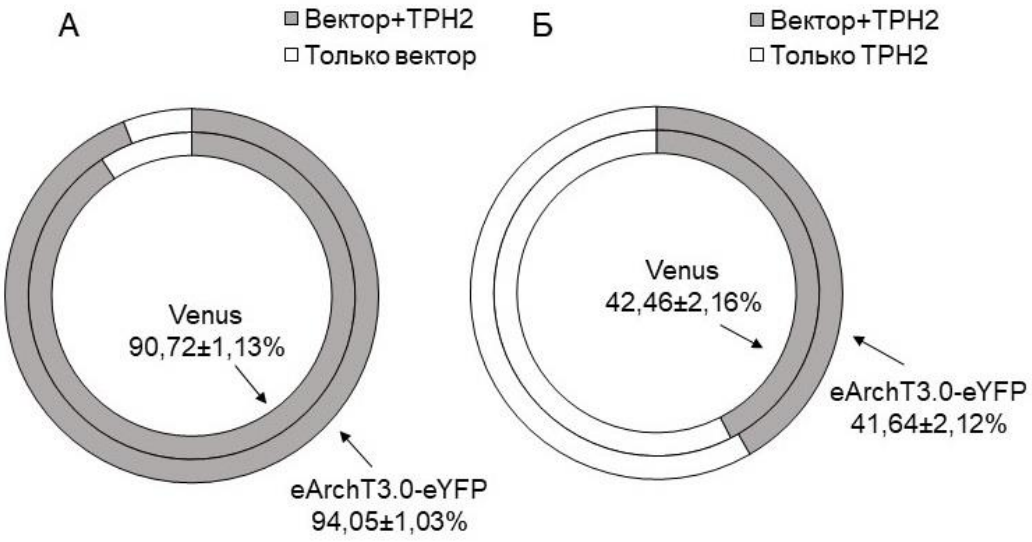


Рис. 20 А – Специфичность экспрессии векторов eArchT3.0-eYFP и Venus в окрашенных по ТРН2 нейронах DRN; **Б** – Экспрессируемость векторов eArchT3.0-eYFP и Venus в окрашенных по ТРН2 нейронах DRN.

3.3.3 Влияние оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов DRN на модулирующий эффект кетамина в тесте «подвешивание за хвост»

Анализ поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост» при оптостимуляции выявил статистически значимое влияние фактора «Вектор» (фоточувствительный eArchT3.0-eYFP или контрольный Venus) на продолжительность неподвижности ($F_{1,11}$ = 12,68; $p < 0,01$) и взаимодействие факторов «Вектор» и «Кетамин» ($F_{1,11}$ = 18,51; $p < 0,001$). У животных с введением контрольного вектора наблюдалось вызванное кетамином снижение продолжительности неподвижности, что особенно проявлялось на 2 и 3 минутах теста. При оптогенетическом подавлении активности 5-НТ нейронов DRN модулирующий эффект кетамина трансформировался: продолжительность неподвижности в тесте увеличивалась. Также наблюдалось увеличение времени неподвижности на каждой минуте теста по мере его продолжительности (фактор «Минута теста»: $F_{4,44}$ = 15,67; $p < 0,001$). Эффект кетамина также зависел от продолжительности теста (взаимодействие «Кетамин × Минута»: $F_{4,44}$ = 3,68; $p < 0,05$). Статистически значимых различий между средней продолжительностью неподвижности в периоды с оптостимуляцией и без неё не обнаружено ($F_{1,11}$ = 0,49; p = 0,5), что свидетельствует об отсутствии быстрого поведенческого ответа на включение и выключение оптостимуляции (рис. 21).

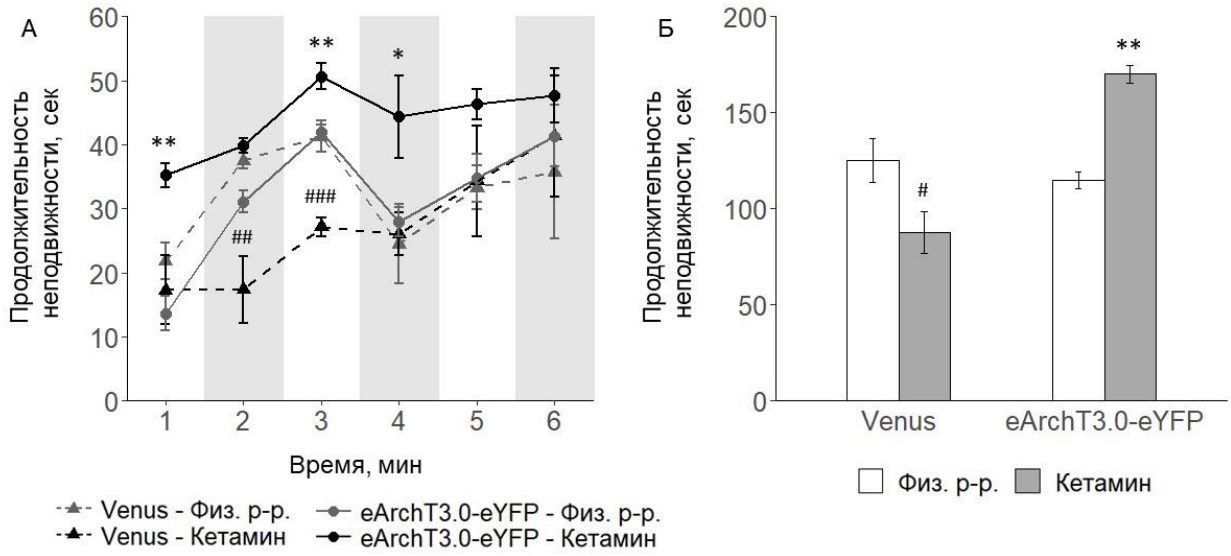


Рис. 21 Изменение продолжительности неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» при оптогенетическом подавлении активности 5-НТ нейронов DRN на фоне предварительного введения кетамина; **А** – Динамика изменения продолжительности неподвижности; * - $p < 0,05$ по сравнению с группами Venus – Кетамин и eArchT3.0-eYFP – Физ. р-р., ** - $p < 0,01$ по сравнению с группами Venus – Кетамин и eArchT3.0-eYFP – Физ. р-р., ## - $p < 0,01$ по сравнению с группами Venus – Физ. р-р. и eArchT3.0-eYFP – Кетамин, ### - $p < 0,001$ по сравнению с группами Venus – Физ. р-р. и eArchT3.0-eYFP – Кетамин; **Б** – Суммарное время неподвижности за первые 4 минуты теста; ** - $p < 0,01$ по сравнению с группами Venus – Кетамин и eArchT3.0-eYFP – Физ. р-р., # - $p < 0,05$ по сравнению с группами Venus – Физ. р-р. и eArchT3.0-eYFP – Кетамин.

3.3.4 Влияние оптогенетического подавления активности 5-НТ нейронов DRN на экспрессию c-Fos в DRN после теста «подвешивание за хвост» с предварительным введением кетамина

Для оценки изменения активности нейронов DRN белок c-Fos иммуногистохимически выявили на срезах головного мозга всех животных, участвовавших в тесте (рис. 22А). Результаты показали статистически значимое влияние кетамина ($F_{1,10} = 5,61$; $p < 0,05$) и взаимодействия факторов «Кетамин» и «Вектор» ($F_{1,10} = 6,82$; $p < 0,05$) на экспрессию c-Fos в клетках, экспрессирующих вектор. У животных с контрольным вектором кетамин повышал процент нейронов, экспрессирующих c-Fos, среди клеток, экспрессирующих вектор Venus. Однако у животных с вектором, кодирующим

фоточувствительный белок, экспрессия c-Fos в клетках, иммунопозитивных по eArchT3.0-eYFP, после введения кетамина и фотостимуляции не изменялась (рис. 22Б).

Кетамин также влиял на экспрессию c-Fos в нейронах, не экспрессирующих ни TPH2, ни вектор ($F_{1,10}$ = 6,47; $p < 0,05$). В DRN контрольных животных этот препарат увеличивал количество нейронов, экспрессирующих только c-Fos (без экспрессии вектора и/или TPH2). Однако у животных с оптогенетически подавленной активностью 5-HT нейронов такого увеличения не происходило (рис. 22В). У животных, получавших физиологический раствор, экспрессия c-Fos в DRN после оптогенетического подавления активности 5-HT нейронов в процессе теста не изменялась.

Таким образом, оптогенетическое ингибирование активности 5-HT нейронов DRN не только предотвращает модулирующий эффект кетамина, но и обращает его: оптостимуляция животных, предварительно получавших кетамин, вызывает увеличение продолжительности пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост» и препятствует вызванному кетамином увеличению экспрессии c-Fos в DRN. Полученные в разделах 3.3.3 и 3.3.4 результаты опубликованы в статье [Drozd, Lanshakov, Dygalo, 2023].

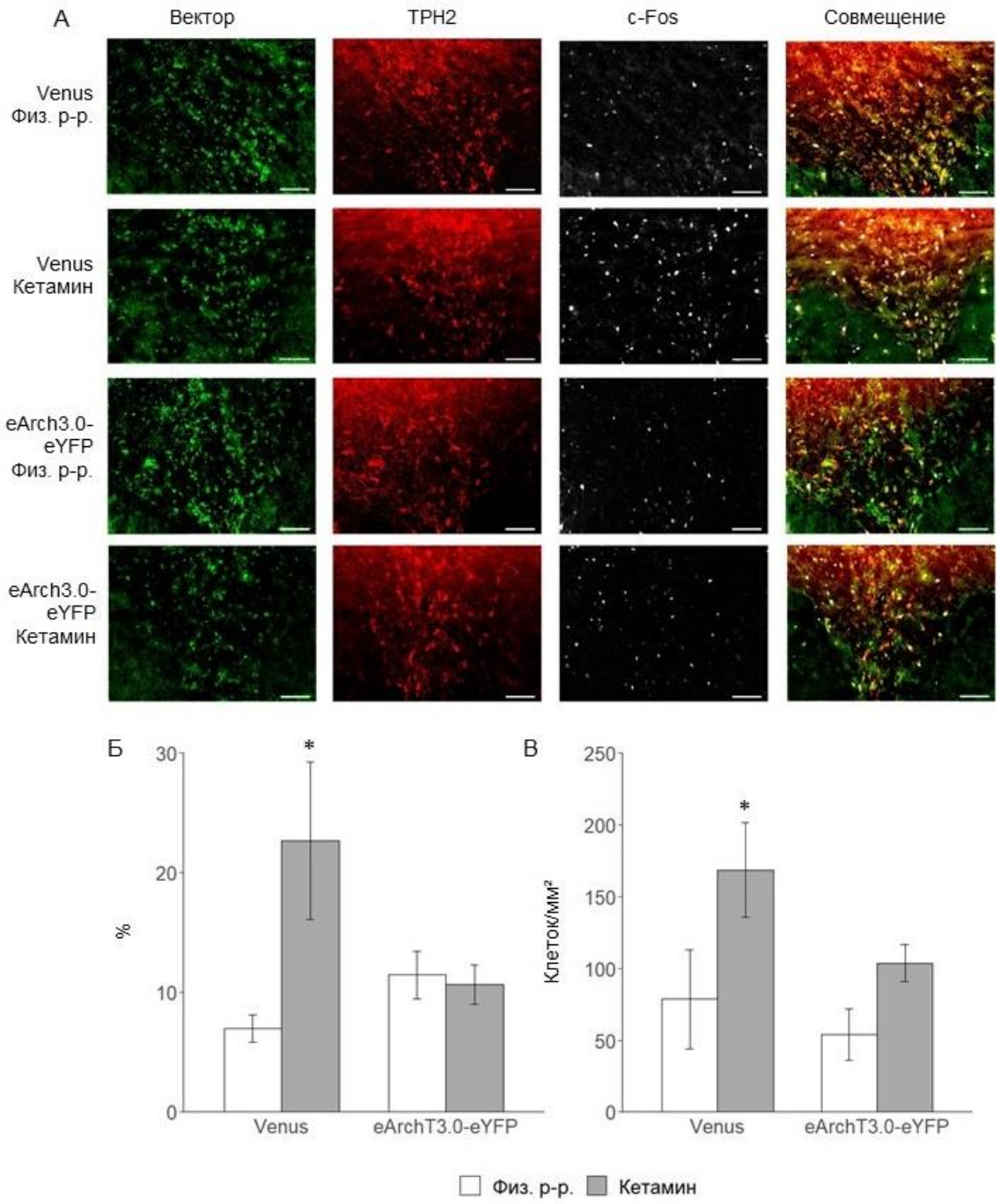


Рис. 22 Влияние оптогенетического ингибирования 5-НТ нейронов DRN на экспрессию c-Fos в тесте «подвешивание за хвост» с предварительным введением кетамина. **А** – Экспрессия c-Fos и векторов в нейронах, экспрессирующих TPH2, после оптогенетического ингибирования 5-НТ нейронов DRN в тесте «подвешивание за хвост» с предварительным введением субанестетической дозы кетамина; шкала 100 мкм.; **Б** – Процент экспрессирующих c-Fos нейронов DRN среди клеток, экспрессирующих оптогенетический вектор eArchT3.0-eYFP или контрольный вектор Venus; * - $p < 0,05$ по сравнению с группами Venus – Физ. р-р. и eArchT3.0-eYFP – Кетамин; **В** – Изменение количества экспрессирующих только c-Fos, но не вектор и/или TPH2 нейронов DRN; * - $p < 0,05$ по сравнению с группой Venus – Физ. р-р.

Глава 4. Обсуждение

Несмотря на большое количество данных, свидетельствующих об модулирующем поведенческий ответ эффекте кетамина на моделях хронического стресса, его влияние на стресс-реактивность и поведение интактных животных остается малоизученным и противоречивым. В данной работе мы показали, что однократная субанестетическая доза кетамина, введенная нестрессированным крысам за 1 час до теста, не только уменьшала продолжительность пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», но и модулировала эндокринный ответ на острую стрессорную нагрузку. Эти результаты позволяют предположить, что поведенческие эффекты кетамина могут быть опосредованы его воздействием на ГГН систему, которая практически не исследовалась в этом контексте [Besnier, Clavier, Compere, 2017]. В литературе имеются лишь единичные указания на то, что высокие дозы кетамина (40 мг/кг) способны снижать базальный уровень кортикостерона, а доза 15 мг/кг может ослаблять гормональный ответ на хронический стресс [Diaz-Gil и др., 2014; Garcia и др., 2009]. Наши результаты впервые указывают на то, что субанестетическая доза кетамина способна ослаблять глюкокортикоидный ответ на острый стресс, вызванный процедурой теста «подвешивание за хвост», у интактных животных. Таким образом, наблюдаемое снижение уровня кортикостерона после теста может представлять собой важный физиологический механизм, способствующий быстрому модулирующему влиянию кетамина даже в отсутствие предварительного воздействия хроническим стрессом.

Для выяснения центральных механизмов модулирующего эффекта кетамина при остром стрессе в настоящей работе оценивалось его влияние на активность нейронов в ряде ключевых отделов головного мозга, ассоциированных с формированием стрессового ответа и регуляцией поведенческих реакций. В качестве маркера нейрональной активации использовалась экспрессия гена раннего ответа *c-fos*, чья базальная транскрипция в большинстве регионов мозга крайне низка, но значительно индуцируется под действием острых стрессорных стимулов различной модальности [Martinez, Calvo-Torrent, Herbert, 2002].

Проведенный анализ показал, что острый стресс (подвешивание за хвост) статистически значимо повышал уровень мРНК *c-fos* в ПФК, гиппокампе, миндалине, среднем мозге и стволовых структурах. Особый интерес представляют данные, полученные для ПФК. В этом регионе увеличение экспрессии мРНК *c-fos* вызывалось не только стрессом, но и введением субанестетической дозы кетамина, хотя вызванный им эффект и был менее выражен. Этот результат согласуется с концепцией растормаживающего

действия кетамина на глутаматергическую передачу. Несмотря на то, что кетамин является антагонистом NMDA-рецепторов, его способность повышать активность нейрональных сетей ПФК хорошо документирована и объясняется селективным ингибированием тормозных ГАМК-ергических интернейронов, что приводит к опосредованному растормаживанию и усилению возбуждения пирамидных нейронов [Ballard, Zarate, 2020; Duman, Sanacora, Krystal, 2019]. Таким образом, наблюдаемая индукция экспрессии мРНК *c-fos* в ПФК после введения кетамина может отражать его модулирующий эффект, связанный с усилением синаптической пластичности и изменением активности корковых сетей.

На уровне белка, иммуногистохимический анализ подтвердил, что как острый стресс, так и введение кетамина статистически значимо увеличивали количество c-Fos-позитивных нейронов в ПФК. Принципиально важным является наблюдение, что при сочетанном воздействии кетамина и острого стресса количество активированных нейронов значимо превышало показатели в группах, подвергнутых каждому из этих стимулов в отдельности. Этот результат прямо указывает на то, что в общий ответ вовлекаются как перекрывающиеся, так и различные нейронные популяции.

Для проверки этой гипотезы был проведен анализ активности специфического типа клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор Satb2 – ассоциативных глутаматергических нейронов II-IV слоев коры, которые связывают разные зоны коры больших полушарий между собой [Molyneaux и др., 2007]. Было обнаружено, что активирующее влияние на эту популяцию оказывал исключительно кетамин, тогда как острый стресс сам по себе не вызывал достоверного увеличения числа коэкспрессирующих c-Fos и Satb2 клеток. При этом Satb2-позитивные нейроны составляли лишь малую часть (на порядок меньше) от общего пула активированных клеток ПФК. Это означает, что в ответ на сочетанное действие кетамина и острого стресса вовлекаются преимущественно иные, не-Satb2 нейронные популяций. В состав гетерогенного пула активированных c-Fos-позитивных клеток, вероятно, входят как другие подтипы пирамидных нейронов, не относящиеся к Satb2-экспрессирующим ассоциативным клеткам, так и разнообразные классы ГАМК-ергических интернейронов.

Среди потенциальных кандидатов из числа пирамидных нейронов особый интерес представляют те, что формируют нисходящие проекции из ПФК в DRN. Важность этой связи подтверждается данными о том, что именно пирамидные нейроны ПФК, проецирующиеся в DRN и не экспрессирующие Satb2, вовлечены в молекулярный каскад быстрого модулирующего ответа на кетамин, способствуя усилению 5-НТ-ергического тонуса [Warden и др., 2012]. Активация же ГАМК-ергических интернейронов может носить

вторичный, опосредованный характер. Она может быть следствием либо прямого растормаживающего действия кетамина на корковые сети, либо регулирующего влияния стресс-индуцированного выброса глюкокортикоидов. Последние, как известно, способны модулировать глутаматергическую передачу в ПФК, изменяя плотность постсинаптических рецепторов и усиливая пресинаптическое высвобождение глутамата [Popoli и др., 2012], что, в свою очередь, может приводить к активации связанных с ними тормозных интернейронов.

Важно отметить, что эффективность выявления c-Fos и белков-маркеров клеточного типа при помощи антител может отличаться, поэтому данная гипотеза требует дальнейшего изучения. Несмотря на это, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что ПФК является критически важной областью для реализации быстрого модулирующего эффекта кетамина у интактных животных. Важным открытием является выявление разных эффектов стресса и кетамина на уровне клеточных мишеней: в то время как общая возбудимость корковой сети повышается под действием обоих факторов, конкретный контур ассоциативных Satb2-положительных нейронов реагирует избирательно только на введение кетамина. Это позволяет предположить, что модулирующее действие кетамина может быть связано с точечной модуляцией специфических высших интегративных нейронных сетей, в обход неспецифических путей общей стресс-реактивности.

В отличие от ПФК, в гиппокампе наблюдался иной паттерн активации. Острый стресс вызывал ожидаемое повышение уровня мРНК *c-fos*, однако это не приводило к накоплению белка c-Fos через 1 час после теста. При этом предварительное введение кетамина, само по себе не влиявшее ни на мРНК, ни на белок, в комбинации со стрессом вызывало значимое увеличение количества c-Fos-позитивных нейронов в поле CA3 и DG дорсального гиппокампа.

Наиболее простое объяснение этого расхождения может заключаться в разной кинетике ответа мРНК и белка. Известно, что пик уровня мРНК *c-fos* наступает раньше (через 30-60 минут после стимула), чем пик концентрации белка (90-120 минут) [Kovács, 1998]. В нашем протоколе забор ткани проводился через 1 час после стресса и через 2 часа после введения кетамина. У группы Физ.р-р. – Стресс мы, вероятно, наблюдали фазу, когда транскрипционный всплеск уже снижался, а накопление белка еще не достигло порога детекции. Субанестетическая доза кетамина, согласно литературным данным, вызывает у интактных грызунов яркое, но транзиторное увеличение содержания c-Fos в поле CA1, пик которого приходится примерно на 1 час после введения [Alijanpour, Rezayof, 2023; Yoon и др., 2024], а к 2 часам концентрация белка может возвращаться к базальному [Zhang и др., 2019; Zhang и др., 2021]. Это объясняет, почему в группе Кетамин – Контроль мы не

наблюдали повышения c-Fos. Однако в группе комбинированного воздействия стресс, примененный через 1 час после инъекции, по-видимому, запускает новую волну активации на фоне сохраняющейся концентрации препарата и активных внутриклеточных каскадов (таких как mTOR-сигналинг), инициированных им ранее [Zhou и др., 2014]. Таким образом, стресс в нашем эксперименте выступал как синхронизирующий и потенцирующий фактор, который «перезапускает» или резко усиливает ответ гиппокампальных нейронов, приводя к детектируемому накоплению c-Fos в более поздней временной точке.

Для полного объяснения наблюдаемых изменений, вероятно, требуется учитывать контекст-зависимость действия кетамина, которое сильно определяется исходной активностью нейронов. На высокоактивных нейронах кетамин эффективно блокирует NMDA-рецепторы, что может приводить к дополнительному растормаживанию и кальциевому сигналу, усиливающему синтез белка. Показательно, что в условиях хронического стресса кетамин блокировал NMDA-рецепторы в латеральной хабенуле с высокой фоновой активностью, но не действовал на пирамидные нейроны гиппокампа, активность которых была снижена [Chen и др., 2024]. В нашем эксперименте низкий базальный уровень экспрессии *c-fos* у интактных животных также указывает на относительно низкую фоновую активность гиппокампальных нейронов, что может объяснять отсутствие выраженного эффекта изолированного введения кетамина. Последующий острый стресс резко повышает возбудимость нейронов гиппокампа, тем самым переводя NMDA-рецепторы в активное, чувствительное к блокаде кетамином состояние. Этот принцип подтверждается данными о том, что искусственное усиление активности пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа (хемогенетически или в ходе обучения) делает их NMDA-рецепторы восприимчивыми к кетамину [Chen и др., 2024]. Таким образом, кетамин проявляет свое действие *in vivo* преимущественно на «подготовленном» стрессом фоне.

В тоже время существуют данные, что кетамин оказывает прямое возбуждающее влияние на гиппокамп: *in vitro* он увеличивает спайковую активность пирамидных нейронов CA1 [Izumi, Zorumski, 2014] и уже через 30 минут активирует синтез ключевых для пластичности белков, таких как BDNF [Autry и др., 2011; Nosyreva и др., 2013]. Вероятно, *in vivo* для реализации этого эффекта также необходим определенный уровень исходной возбудимости, достигаемый при стрессе. Таким образом, наблюдаемый нами эффект сочетанного действия кетамина и острого стресса можно объяснить взаимным потенцированием: стресс создает транскрипционный сигнал (мРНК *c-fos)* и повышает чувствительность сети к кетамину, а кетамин, в свою очередь, ускоряет и усиливает трансляцию этого сигнала в белок. Это объясняет, почему увеличение количества c-Fos-

положительных клеток в дорсальном гиппокампе наблюдается только при совместном действии обоих факторов. Эти данные свидетельствуют о том, что модулирующий эффект кетамина в значительной степени контекст-зависим и проявляется в полной мере именно при взаимодействии со стрессовой нагрузкой.

Если в гиппокампе проявление эффекта кетамина было строго зависимо от последующего стресса, то в других структурах кетамин, напротив, ограничивал развитие стрессового ответа. В миндалине и среднем мозге кетамин не вызывал изменений уровня мРНК *c-fos* у контрольных животных, однако не давал развиться этой реакции в полной мере при остром стрессе (подвешивание за хвост). Это указывает на то, что в данных регионах кетамин действует не как самостоятельный активатор, а как модулятор, ограничивающий выраженность нейронального ответа на стрессовый вызов.

Миндалина является ключевым узлом формирования реакций на угрозу, страха и тревоги, а ее функциональная связь с ПФК критически важна для обработки эмоциональных сигналов и изменяется при стрессовых состояниях [Zhang и др., 2021b]. Данные литературы о влиянии кетамина на активность миндалины, оцененную по экспрессии мРНК *c-fos*, остаются противоречивыми: в некоторых работах сообщается об увеличении экспрессии в условиях условно-рефлекторного страха при отсутствии эффекта у контрольных животных [Zhang и др., 2019b], тогда как другие исследования отмечают как повышение [Imre и др., 2006], так и отсутствие изменений [Väisänen и др., 2004] базального уровня мРНК *c-fos*. Эта неоднозначность, по-видимому, отражает контекст-зависимый характер действия кетамина, который может определяться условиями, в которых находилось животное, в особенности от наличия или отсутствия стрессоров и их характера.

Полученный нами результат, а именно подавление стресс-индуцированной активации миндалины при отсутствии влияния на ее базальную активность, вносит важное уточнение в эту картину. Он согласуется с данными о том, что локальное блокирование NMDA-рецепторов в ПФК может изменять активность лишь отдельных ядер миндалины [Nowak и др., 2012], и позволяет предположить, что системное введение кетамина может нормализовать гиперактивность миндалины, вызванную острым стрессом. Этот эффект вероятно связан с выявленным нами ранее ослаблением глюкокортикоидного ответа и снижением продолжительности пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», что в совокупности создает состояние пониженной периферической и центральной стресс-реактивности. Таким образом, в отличие от прямого стимулирующего действия на специфические нейронные популяции в ПФК и контекст-зависимого эффекта в гиппокампе, в миндалине его роль принципиально иная – ограничение избыточной активации этой структуры в ответ на угрозу. Эта способность подавлять гиперактивность

ключевого узла страха является, вероятно, важнейшим элементом быстрого модулирующего влияния кетамина. Однако конкретные нейронные механизмы, обуславливающие такой ответ миндалины, требуют дальнейшего изучения.

Учитывая, что аналогичный паттерн модуляции стресс-индуцированной транскрипции *c-fos* наблюдался не только в миндалине, но и среднем мозге, можно предположить, что ограничивающее влияние кетамина на острый стрессовый ответ может быть свойством ряда подкорковых структур. Для проверки этой гипотезы было проведено иммуногистохимическое исследование в DRN – одном из ключевых ядер среднего мозга, основном источнике 5-НТ-ергической иннервации переднего мозга. Анализ показал, что ни острый стресс, ни изолированное введение кетамина не изменяли количество c-Fos-положительных нейронов в DRN у интактных животных. Однако предварительное введение кетамина с последующим стрессом вызывало статистически значимое увеличение количества c-Fos-позитивных клеток в этом ядре. Несмотря на то, что картина изменения уровня белка c-Fos сходна с таковой в гиппокампе, ее интерпретация может быть иной ввиду отсутствия данных об уровне мРНК *c-fos* конкретно в DRN.

Известно, что локальная микроинъекция кетамина непосредственно в DRN не влияет на высвобождение 5-НТ нейронами этой структуры [Nishitani и др., 2014]. Следовательно, полученный результат позволяет предположить, что DRN функционирует как интегративный узел, активация которого требует одновременного поступления нескольких различных сигналов. Первым, вероятно, является усиленный глутаматергический тонус от активированной кетамином ПФК [Fukumoto, Iijima, Chaki, 2016]. Далее – специфический стресс-зависимый сигнал от лимбических или сенсорных структур, включая латеральную хабенулу [Dolzani и др., 2016], центральную миндалину [Prakash и др., 2020], ядро ложа терминальной полоски и спино-парабрахиальный путь [Hale, Shekhar, Lowry, 2012]. По отдельности эти сигналы недостаточны для преодоления порога массовой активации нейронов DRN, но их совместное присутствие создает условия для рекрутирования определенных клеточных популяций внутри ядра. Таким образом, в DRN кетамин, по-видимому, не просто модулирует существующий стресс-ответ, а выступает в качестве необходимого компонента для формирования адаптивного состояния в ответ на острую угрозу. Этот механизм может лежать в основе быстрой модуляции выброса 5-НТ в ПФК, связанной с действием кетамина [López-Gil и др., 2019; Pham и др., 2017].

При этом важно отметить, что наблюдаемый на уровне белка эффект комбинированного воздействия в DRN не согласуется напрямую с данными по мРНК *c-fos* в гетерогенном блоке среднего мозга, где кетамин блокировал ее стресс-индуцированное повышение. Это несоответствие, вероятно, отражает методологические ограничения

анализа транскрипции в смешанной ткани. Средний мозг содержит множество различных ядер, и подавляющее влияние кетамина на мРНК *c-fos* в одних из них могло маскировать ее потенциальный прирост в других, включая DRN. Следует подчеркнуть, что для корректной интерпретации транскрипционных изменений критически важен клеточно- и регион-специфичный анализ, который в случае DRN был обеспечен иммуногистохимией. Следовательно, активация DRN, выявленная на белковом уровне, указывает на то, что это ядро является исключением из общей картины подавления ответа на стресс в среднем мозге, подчиняясь уникальной логике, требующей сочетанного действия кетамина и стресса.

Анализ уровня мРНК *c-fos* в блоке стволовых структур (не включающем DRN) выявил иной паттерн, сходный с ПФК: как острый стресс, так и введение кетамина по отдельности повышали уровень мРНК *c-fos*. Однако, в отличие от ПФК, сочетанное действие этих факторов не приводило к дополнительному усилению транскрипционного ответа. Этот результат указывает, что в данных стволовых отделах кетамин и стресс, по-видимому, активируют перекрывающиеся или одни и те же нейронные популяции, достигая «потолка» ответа уже при изолированном воздействии. Важно учитывать, что данный вывод, в силу гетерогенности образца ткани, носит предварительный характер. Более точное определение вовлеченных ядер и клеточных типов потребует применения методов с большим анатомическим разрешением. Тем не менее, даже на этом уровне анализа видно, что среди регионов, где кетамин выступает как самостоятельный активатор транскрипции, наблюдаются различия в способности к интеграции сигналов: в ПФК эффекты суммируются, а в исследованных стволовых структурах – нет.

Совокупность полученных данных соответствует модели, в которой кетамин инициирует изменения в взаимосвязанных узлах сети. Эти изменения носят разную направленность. В ПФК кетамин избирательно активирует высшие интегративные контуры. В гиппокампе и DRN активация нейронов кетамином проявляется только в условиях сопутствующего стрессового воздействия. В миндалине же, напротив, кетамин подавляет вызванную стрессом гиперактивацию. С функциональной точки зрения, такая многоуровневая модуляция обеспечивает одновременное решение нескольких задач: ослабление периферического стресс-ответа (ГГН-ось), усиление когнитивно-пластических ресурсов (ПФК, гиппокамп), ограничение генерации страха (миндалина) и запуск адаптивной нейромодуляции (DRN). Таким образом, можно предположить, что модулирующий эффект кетамина может быть связан не с изолированным воздействием на отдельные звенья, а со способностью индуцировать скоординированное, сбалансированное состояние нейросети, которое развивается у интактных животных.

Накопленные данные свидетельствуют о ключевой роли гиппокампа в регуляции поведенческого ответа на стресс. Дорсальный гиппокамп, наряду с общепризнанной ролью в регуляции памяти и пространственном ориентировании, так же может принимать участие в регуляции функций, связанных с эмоциональными реакциями. Однако конкретный вклад активности пирамидных нейронов поля dCA1 в формирование пассивного поведенческого ответа остается малоизученным, и прямые причинно-следственные доказательства отсутствуют.

Традиционно дорсальный гиппокамп рассматривается как ключевая структура для пространственной навигации и процессов запоминания. Например, хемогенетическое подавление активности глутаматергических нейронов области CA1 достоверно нарушает восстановление объектной и пространственной памяти, не влияя при этом на общую двигательную активность [Cinalli и др., 2023]. Однако накапливаются данные, указывающие на его вовлеченность и в регуляцию поведенческих реакций [Besnard, Miller, Sahay, 2020; Luchetti и др., 2020]. Косвенные свидетельства, такие как изменение поведенческих реакций, сходных с тревожными и депрессивноподобными, при модуляции экспрессии HCN-каналов в пирамидных нейронах CA1 [Günther и др., 2019; Kim, Chang, Johnston, 2012], позволяют предположить, что их активность может напрямую влиять на эмоционально-поведенческие паттерны. Полученные нами результаты о том, что комбинированное воздействие кетамина и острого стресса вызывает активацию дорсального гиппокампа, позволили выдвинуть гипотезу о его непосредственном участии в регуляции поведенческого ответа на стресс. Для ее прямой проверки мы использовали оптогенетический подход. Валидировав методику на неонатальных животных [Lanshakov и др., 2016; Lanshakov, Drozd, Dygalo, 2017], мы провели оптогенетическую стимуляцию глутаматергических нейронов области dCA1 у взрослых крыс непосредственно во время теста «подвешивание за хвост». Мы впервые продемонстрировали, что такая кратковременная активация вызывает быстрое увеличение времени неподвижности – ключевого признака пассивного поведенческого ответа. Выявленное увеличение интенсивности флюоресценции, соответствующей иммуногистохимической окраске c-Fos, в области dCA1 после стимуляции светом подтвердило эффективность оптогенетического воздействия [Drozd и др., 2025].

Это открытие является прямым экспериментальным доказательством того, что кратковременное повышение активности основных эфферентных нейронов dCA1 достаточно для индукции пассивного поведенческого ответа. Это расширяет понимание функционального репертуара дорсального гиппокампа, традиционно связываемого с когнитивными функциями, и переводит его в разряд структур, активно контролирующих

поведенческие реакции.

Вероятно, влияние активации этих нейронов на поведение опосредовано их проекциями на ключевые лимбические структуры. Дорсальный гиппокамп имеет эфференты в латеральных областях миндалины, важной для регуляции эмоциональных реакций структуры [Grigoryan, Segal, 2016]. Кроме того, оптогенетическая активация пирамидных нейронов dCA1 может функционально вовлекать и вентральный гиппокамп, о чем свидетельствует усиление его оксигенации, зарегистрированное с помощью фМРТ на мышах [Takata и др., 2015]. Поскольку вентральный гиппокамп играет установленную роль в модуляции поведенческих реакций на стресс и тревоги [Hong, Kaang, 2022], согласованная активация обеих частей гиппокампа может быть важным компонентом наблюдаемого поведенческого эффекта.

Учитывая, что кетамин продемонстрировал способность модулировать стресс-индуцированную активацию гиппокампа и других лимбических структур, следующим логичным шагом была проверка его способности противодействовать не внешнему стрессору, а целенаправленно вызванной активности в пределах самого гиппокампа. Созданная нами модель предоставляет для этого уникальную возможность напрямую проверить модулирующий потенциал кетамина в новых условиях. Мы исследовали, способно ли предварительное введение кетамина предотвратить развитие пассивного поведенческого ответа, индуцированного оптогенетической активацией пирамидных нейронов CA1 дорсального гиппокампа. Полученные нами данные свидетельствуют, что субанестетическая доза кетамина предотвращает увеличение продолжительности пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», которое вызывается оптостимуляцией. Оптогенетическая активация глутаматергических нейронов в этом эксперименте повышало уровень мРНК *c-fos* в гиппокампе, но влияния на количество клеток, экспрессирующих этот белок, не было зарегистрировано. Тем не менее результаты ясно говорят о том, что кетамин предотвращает вызванное оптостимуляцией увеличение уровня мРНК *c-fos* и снижает экспрессию этого белка в нейронах в CA1 области дорсального гиппокампа у животных с введением каналородопсина [Drozd и др., 2025].

Интересно, что модулирующий эффект кетамина на поведение в нашем эксперименте сопутствовал его специфическому молекулярному действию: препарат снижал как транскрипционный (мРНК *c-fos*), так и трансляционный (белок c-Fos) ответ на оптостимуляцию, но не влиял на эти параметры у контрольных животных (EGFP). Это указывает на избирательность действия кетамина, направленную именно на паттерн гиперактивации, создаваемый оптогенетическим вмешательством. Вероятно, для проявления этого эффекта требовалось искусственное повышение активности нейронов,

поскольку чувствительность NMDA-рецепторов к блокаде кетамином зависит от уровня их активности [Chen и др., 2024]. Таким образом, в нашей модели кетамин проявлял себя не как стимулятор активности нейронов, а как корректор специфической, опто-индуцированной гиперактивности в нейронах CA1.

Полученные результаты позволяют выдвинуть гипотезу о том, что в основе как пассивного поведенческого ответа, вызванного оптостимуляцией, так и модулирующего действия кетамина лежит модуляция активности перекрывающихся групп нейронов в дорсальном гиппокампе. Это, в свою очередь, подкрепляет тезис о ключевой роли этой структуры в регуляции не только в когнитивных, но и поведенческих реакций. Важно подчеркнуть, что в данном исследовании впервые показана способность кетамина предотвращать увеличение продолжительности пассивного поведенческого ответа, специфически индуцированного прямой оптогенетической активацией пирамидных нейронов CA1. Наша работа дополняет обширные данные о модулирующем влиянии кетамина [Hashimoto, 2022] и указывает на возможный механизм: блокирующее действие кетамина на развитие данного поведения может быть опосредовано подавлением локально вызванных паттернов гиперактивности в гиппокампе – одном из центральных узлов нейросети, вовлеченных в регуляцию поведенческого ответа на стресс.

Полученные в первом эксперименте данные свидетельствуют, что DRN, подобно гиппокампу, активируется только при комбинации кетамина и острого стресса, выступая, вероятно, в роли интегративного узла. Для проверки функциональной значимости этой активации была проведена отдельная серия экспериментов с прямым оптогенетическим подавлением активности 5-HT-ергических нейронов DRN. Целью было оценить, как искусственное ингибирование этих нейронов на фоне введения кетамина влияет на поведение в тесте «подвешивание за хвост» и на количество c-Fos-позитивных нейронов в самой этой структуре. Предварительно мы подтвердили эффективность трансдукции векторов и специфичность экспрессии eArchT3.0-eYFP в 5-HT-ергических нейронах DRN, а также надежное подавление их активности при световой стимуляции на наркотизированных животных [Drozd, Lanshakov, 2020].

Применив этот подход в основном эксперименте, мы обнаружили ключевой результат – инверсию поведенческого эффекта кетамина на фоне оптогенетического вмешательства. Если у контрольных животных с интактной активностью DRN кетамин ожидаемо снижал продолжительность неподвижности, то у животных с подавленными 5-HT-ергическими нейронами DRN тот же препарат, напротив, увеличивал неподвижность, что указывает на усиление пассивного поведенческого ответа [Drozd, Lanshakov, Dygalo,

2023]. Этот результат согласуется с данными о том, что фармакологическая блокада синтеза 5-НТ парахлорфенилаланином предотвращает модулирующее действие кетамина в тесте принудительного плавания [Fukumoto, Iijima, Chaki, 2015; Jardin и др., 2016]. Однако в нашем исследовании кратковременное оптогенетическое подавление не просто блокировало, а инвертировало эффект кетамина. Важно, что само по себе подавление DRN у животных, получивших физиологический раствор, не влияло на поведение. Это согласуется с данными другой группы, которая не обнаружила влияния ингибирования 5-НТ-ергических нейронов DRN на продолжительность неподвижности в тесте принудительного плавания [Nishitani и др., 2019b], и подчеркивает специфичность выявленного взаимодействия именно для состояния, индуцированного кетамином.

В то же время, наши результаты могут казаться противоречивыми на фоне других исследований. Так, оптогенетическая активация 5-НТ-ергических нейронов DRN [Nishitani и др., 2019b] или возбуждающих проекций из мПФК в DRN [Warden и др., 2012] вызывает модулирующий эффект, сходный с антидепрессантным. При этом в других экспериментальных условиях, например, в условиях хронического социального стресса, модулирующий эффект может наблюдаться и при торможении тех же префронтальных проекций в DRN [Challis и др., 2013]. Кроме того, ингибирование 5-НТ-ергических нейронов DRN может повышать тревожность в тестах на избегание, не влияя на поведение в тесте открытого поля [Nishitani и др., 2019b]. Эта кажущаяся противоречивость, вероятно, отражает несколько факторов. Отчасти это можно объяснить тем, что различные поведенческие парадигмы (тест подвешивания за хвост, принудительное плавание, модели социального стресса) задействуют разные типы защитных реакций (замирание, активное избегание), которые могут по-разному модулироваться активностью DRN. Кроме того, решающую роль играет сложная внутренняя архитектура DRN, где конечный поведенческий ответ определяется динамическим балансом в сети глутамат-, ГАМК- и 5-НТ нейронов [Li, 2020]. В совокупности это означает, что эффект модуляции активности DRN оказывается высоко контекст-зависимым. Он определяется как исходным состоянием системы (например, покой или введение кетамина), так и выбранным экспериментальным методом (фармакологическое или оптогенетическое вмешательство), а также особенностями конкретной поведенческой модели, в которой оценивается эффект.

На молекулярном уровне оптогенетическое подавление предотвращало вызванное кетамином увеличение числа c-Fos-позитивных клеток в DRN [Drozd, Lanshakov, Dygalo, 2023]. Ранее уже было показано, что кетамин увеличивает экспрессию c-Fos в 5-НТ-ергических нейронах DRN [Dolzani и др., 2016; Fukumoto, Iijima, Chaki, 2015], однако в нашей работе было обнаружено, что этот эффект распространялся не только на 5-НТ-

ергические нейроны, но и на нейроны, не содержащие TPH2. Это говорит о том, что подавление даже части 5-НТ-ергических нейронов достаточно для нарушения активации всей локальной сети DRN, индуцированной кетамином. Данный факт, наряду с известной сложностью связей между 5-НТ-ергическими нейронами и ГАМК-ергическими интернейронами внутри ядра [Pham и др., 2017], указывает на то, что кетамин влияет на DRN, изменяя тонкий баланс возбуждения и торможения. Существует гипотеза, что системное введение кетамина активирует глутаматергические проекции из ПФК в DRN [Fukumoto и др., 2018], которые могут воздействовать как на 5-НТ-, так и на ГАМК-ергические нейроны. Подавление же ключевой возбуждающей (5-НТ-ергической) компоненты этого баланса смещает общее состояние сети, делая ее невосприимчивой к активирующему сигналу кетамина. Это может объяснять, почему неизбирательное ингибирование всей популяции 5-НТ нейронов в наших опытах привело к инверсии эффекта кетамина, в то время как в норме он, вероятно, действует на специфические популяции с определенными проекциями [López-Gil и др., 2019a]. Важным аспектом является также то, что у активно бодрствующих животных оптогенетическое подавление не снижало базальный уровень c-Fos-положительных нейронов в DRN, в отличие от наркотизированных животных. Это может быть связано с повышенной фоновой активностью нейронов в процессе поведенческого теста [Zhou и др., 2022] и объясняет, почему мы не наблюдали изменений в поведении контрольной группы.

Таким образом, проведенные эксперименты демонстрируют, что 5-НТ-ергические нейроны DRN играют критическую роль в реализации модулирующего эффекта кетамина. Сохранная активность этих нейронов выступает необходимым условием, определяющим поведенческий вектор эффекта препарата: при ее оптогенетическом подавлении модулирующий эффект кетамина не только исчезает, но и инвертируется (вместо снижения продолжительности неподвижности наблюдается ее увеличение). Это позволяет рассматривать DRN как важную мишень, модулирующую конечный поведенческий ответ на кетамин.

Заключение

В настоящей диссертационной работе была выполнена комплексная экспериментальная оценка нейрональных механизмов быстрого модулирующего влияния субанестетической дозы кетамина на поведенческий ответ при остром стрессе. Применение оптогенетического подхода для направленной модуляции активности специфических клеточных популяций позволило перейти от корреляционных наблюдений к установлению причинно-следственных связей.

Установлено, что модулирующее действие кетамина у интактных животных в условиях острого стресса носит комплексный характер, затрагивая поведенческий, эндокринный и нейрональный уровни. Ключевой особенностью его нейробиологического эффекта является не универсальная активация мозга, а регион-специфическая и контекст-зависимая модуляция активности различных узлов лимбико-кортикальной сети. Так, препарат избирательно активирует ПФК, потенцирует стресс-зависимые ответы гиппокампа и DRN, но при этом подавляет вызванную стрессом гиперактивацию миндалины и ствола мозга.

Решающий вклад в понимание механизмов, лежащих в основе этой регион-специфической модуляции, внесли эксперименты с прямой оптогенетической модуляцией. Они позволили проверить причинно-следственную значимость выявленных изменений. Впервые была продемонстрирована причинно-следственная связь между повышенной активностью глутаматергических нейронов CA1 области дорсального гиппокампа и возникновением пассивного поведенческого ответа. Этот результат не только указывает на непосредственную вовлеченность данной структуры в регуляцию поведенческого ответа на стресс, но и выявляет её как важную мишень действия кетамина, который эффективно предотвращает развитие опто-индуцированного поведения, подавляя вызванную оптогенетической стимуляцией гиперактивацию нейронов.

Не менее важную роль в эффекте кетамина играет состояние 5-НТ-ергических нейронов DRN. Впервые с помощью метода оптогенетического подавления было показано, что эти нейроны выступают критическим модулятором, определяющим поведенческий вектор действия препарата: их активность является необходимым условием для реализации модулирующего эффекта кетамина. Оптогенетическое подавление 5-НТ-ергических нейронов DRN не только блокирует модулирующий эффект препарата, но и инвертирует его (вместо снижения продолжительности неподвижности наблюдается её увеличение), одновременно препятствуя вызванной кетамином активации нейрональной популяции DRN.

Перспективы дальнейших исследований, вытекающие из этих данных, связаны с детализацией выявленных механизмов. Требуется изучение роли специфических проекционных путей и подтипов нейронов внутри гиппокампа и DRN, чья избирательная активация или подавление могут быть ключом к пониманию фундаментальных принципов регуляции поведения. Необходима также проверка принципов контекст-зависимости на различных моделях стресс-индуцированных состояний и разработка подходов для оценки индивидуальных различий в функционировании нейрональных сетей.

Таким образом, настоящее исследование расширяет понимание механизмов быстрой модуляции поведенческого ответа на стресс, смещая фокус с поиска единой мишени-триггера на анализ критически важных взаимодействий между фармакологическим агентом и функциональным состоянием специфических нейрональных сетей. Полученные данные обосновывают важность учёта индивидуальных различий в исходной активности лимбико-кортикальной сети для понимания механизмов действия препарата и определяют модуляторные системы мозга, такие как 5-НТ-ергическая иннервация из DRN, в качестве потенциальных точек приложения для направленной модуляции поведенческих реакций.

Выводы

1. У интактных крыс введение субанестетической дозы кетамина вызывает быстрое снижение продолжительности пассивного поведенческого ответа в условиях острого неизбегаемого стресса, что сопровождается ослаблением стресс-индуцированного повышения уровня кортикостерона;
2. Действие кетамина характеризуется регион-специфичностью и контекст-зависимостью: препарат избирательно активирует определенные популяции нейронов ПФК, потенцирует стресс-индуцированную активацию гиппокампа и DRN, но подавляет вызванную стрессом гиперактивацию миндалины и ствола мозга;
3. Оптогенетическая активация пирамидных нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа увеличивает продолжительность пассивного поведенческого ответа в тесте «подвешивание за хвост», что сопровождается увеличением количества c-Fos-позитивных нейронов и указывает на вовлеченность дорсального гиппокампа в регуляцию поведенческого ответа на острый неизбегаемый стресс;
4. Предварительное введение кетамина предотвращает увеличение продолжительности пассивного поведенческого ответа, вызываемое оптогенетической активацией глутаматергических нейронов поля CA1 дорсального гиппокампа. Этот эффект сопровождается подавлением вызванной оптогенетической стимуляцией гиперактивации нейронов гиппокампа;
5. 5-HT-ергические нейроны DRN являются критическим модулятором поведенческого эффекта кетамина: оптогенетическое подавление их активности на фоне введения препарата не только блокирует его модулирующее влияние, но и усиливает пассивный поведенческий ответ, одновременно предотвращая вызванную кетамином активацию нейрональной популяции DRN.

Список сокращений

5-HT — серотонин (5-гидрокситриптамин)

AAV — аденоассоциированные вирусы

AMPA — α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота (рецептор AMPA)

Arch — археародопсин-3

BDNF — мозговой нейротрофический фактор

BSA — бычий сывороточный альбумин

CAMK2a — кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа IIα

ChR — каналородопсин

ChR2 — каналородопсин-2

CRF — кортикотропин-рилизинг-фактор

DAPI — 4′,6-диамидино-2-фенилиндол

dCA1 — дорсальное поле CA1

DG — зубчатая извилина

DRN — дорсальное ядро шва

eEF2 — эукариотический фактор элонгации 2

EGFP — зелёный флуоресцентный белок

EYFP — жёлтый флуоресцентный белок

FBS — фетальная бычья сыворотка

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота

ГГН — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось

ГР — глюкокортикоидный рецептор

HCN — ионные каналы, активируемые гиперполяризацией и регулируемые циклическими нуклеотидами

HEK — клетки эмбриональной почки человека

LH — латеральный гипоталамус

LHb — латеральная хабенула

LTD — долговременная депрессия

LTP — долговременная потенциация

мПФК — медиальная префронтальная кора

MRN — медианное ядро шва

mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих

NAc — прилежащее ядро

NMDA — N-метил-D-аспартат

NpHR — галородопсин

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

PAG — периакведуктальное серое вещество

PBS — фосфатно-солевой буфер

PBST — PBS с Tween-20

PFA — параформальдегид

ПФК — префронтальная кора

ПЦР — полимеразная цепная реакция

POA — преоптическая область

SN — чёрная субстанция

TPH2 — триптофангидроксилаза 2

TrkB — рецепторная киназа тропомиозина B

vCA1 — вентральное поле CA1

vCA3 — вентральное поле CA3

VTA — вентральная тегментальная область

фМРТ — функциональная магнитно-резонансная томография

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Список литературы

1. Abbaspoor S., Hoffman K. L. Circuit dynamics of superficial and deep CA1 pyramidal cells and inhibitory cells in freely moving macaques // Cell Reports. 2024. Т. 43. № 8. С. 114519.

2. Adell A. и др. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei // Brain Research Reviews. 2002. Т. 39. № 2–3. С. 154–180.

3. Ago Y. и др. (R)-Ketamine Induces a Greater Increase in Prefrontal 5-HT Release Than (S)-Ketamine and Ketamine Metabolites via an AMPA Receptor-Independent Mechanism // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2019. Т. 22. № 10. С. 665–674.

4. Ahmadlou M. и др. Cell Type-specific Hypothalamic Pathways to Brainstem Drive Context-dependent Strategies in Response to Stressors // Current Biology. 2023. Т. 3. №34(11). С. 2448-2459.e4

5. Aleksandrova L. R., Phillips A. G. Neuroplasticity as a convergent mechanism of ketamine and classical psychedelics // Trends in Pharmacological Sciences. 2021. Т. 42. № 11. С. 929–942.

6. Alijanpour S., Rezayof A. Activation of ventral hippocampal CB1 receptors inhibits ketamine-induced anxiogenic-like behavior: Alteration of BDNF/c-Fos levels in the mouse hippocampus // Brain Research. 2023. Т. 1810. С. 148378.

7. Anagnostaras S. G., Gale G. D., Fanselow M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances // Hippocampus. 2001. Т. 11. № 1. С. 8–17.

8. Andrade R., Nicoll R. A. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. // The Journal of Physiology. 1987. Т. 394. № 1. С. 99–124.

9. Anis N. A. и др. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate // British J Pharmacology. 1983. Т. 79. № 2. С. 565–575.

10. Armario A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2021. Т. 128. С. 74–86.

11. Autry A. E. и др. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses // Nature. 2011. Т. 475. № 7354. С. 91–95.

12. Bagley J., Moghaddam B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: Effects of pretreatment with saline or diazepam: // Neuroscience. 1997. Т. 77. № 1. С. 65–73.

13. Bagot R. C. и др. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression // Nat Commun. 2015. Т. 6. № 1. С. 7062.

14. Ballard E. D., Zarate C. A. The role of dissociation in ketamine's antidepressant effects // Nature Communications. 2020. Т. 11. № 1. С. 643

15. Barth A. M. и др. Aversive stimulus-tuned responses in the CA1 of the dorsal hippocampus // Nat Commun. 2023. Т. 14. № 1. С. 6841.

16. Berman R. M. и др. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients // Biological Psychiatry. 2000. Т. 47. № 4. С. 351–354.

17. Besnard A., Miller S. M., Sahay A. Distinct Dorsal and Ventral Hippocampal CA3 Outputs Govern Contextual Fear Discrimination // Cell Reports. 2020. Т. 30. № 7. С. 2360-2373.e5.

18. Besnier E., Clavier T., Compere V. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anesthetics: A review // Anesthesia and Analgesia. 2017. Т. 124. № 4. С. 1181–1189.

19. Bienkowski M. S. Further refining the boundaries of the hippocampus CA2 with gene expression and connectivity: Potential subregions and heterogeneous cell types // Hippocampus. 2023. Т. 33. № 3. С. 150–160.

20. Borzello M. и др. Assessments of dentate gyrus function: discoveries and debates // Nat. Rev. Neurosci. 2023. Т. 24. № 8. С. 502–517.

21. Boyden E. S. и др. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity // Nat Neurosci. 2005. Т. 8. № 9. С. 1263–1268.

22. Bracha H. S. Freeze, Flight, Fight, Fright, Faint: Adaptationist Perspectives on the Acute Stress Response Spectrum // CNS spectr. 2004. Т. 9. № 9. С. 679–685.

23. Broadbelt K. G. и др. Neuroanatomic relationships between the GABAergic and serotonergic systems in the developing human medulla // Autonomic Neuroscience. 2010. Т. 154. № 1–2. С. 30–41.

24. Cameron H. A., Schoenfeld T. J. Behavioral and structural adaptations to stress // Frontiers in Neuroendocrinology. 2018. Т. 49. С. 106–113.

25. Carhart-Harris R., Nutt D. Serotonin and brain function: a tale of two receptors // J Psychopharmacol. 2017. Т. 31. № 9. С. 1091–1120.

26. Carreno F. R. и др. Activation of a ventral hippocampus–medial prefrontal cortex pathway is both necessary and sufficient for an antidepressant response to ketamine // Mol Psychiatry. 2016. Т. 21. № 9. С. 1298–1308.

27. Casarotto P. C. и др. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors // Cell. 2021. Т. 184. № 5. С. 1299- 1313.e19.

28. Celada P., Puig M. V., Artigas F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks // Frontiers in Integrative Neuroscience. 2013. Т. 7. № 25.

29. Cerniauskas I. и др. Chronic Stress Induces Activity, Synaptic, and Transcriptional Remodeling of the Lateral Habenula Associated with Deficits in Motivated Behaviors // Neuron. 2019. Т. 104. № 5. С. 899- 915.e8.

30. Challis C. и др. Raphe GABAergic Neurons Mediate the Acquisition of Avoidance after Social Defeat // Journal of Neuroscience. 2013. Т. 33. № 35. С. 13978–13988.

31. Chen M. и др. Brain region–specific action of ketamine as a rapid antidepressant // Science. 2024. Т. 385. № 6709. С. eado7010.

32. Cherubini E., Miles R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? // Front. Cell. Neurosci. 2015. Т. 9. № 19.

33. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analytical Biochemistry. 1987. Т. 162. № 1. С. 156–159.

34. Chow B. Y. и др. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps // Nature. 2010. Т. 463. № 7277. С. 98–102.

35. Cinalli D. A. и др. DREADD-inactivation of dorsal CA1 pyramidal neurons in mice impairs retrieval of object and spatial memories // Hippocampus. 2023. Т. 33. № 1. С. 6–17.

36. Coffey K. R. и др. Chemogenetic inhibition of lateral habenula projections to the dorsal raphe nucleus reduces passive coping and perseverative reward seeking in rats // Neuropsychopharmacol. 2020. Т. 45. № 7. С. 1115–1124.

37. Commons K. G. и др. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior // ACS Chem. Neurosci. 2017. Т. 8. № 5. С. 955–960.

38. Conrad C. D. и др. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. // Behavioral Neuroscience. 1999. Т. 113. № 5. С. 902–913.

39. Cools R., Roberts A. C., Robbins T. W. Serotoninergic regulation of emotional and behavioural control processes // Trends in Cognitive Sciences. 2008. Т. 12. № 1. С. 31–40.

40. Cryan J. F., Mombereau C., Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2005. Т. 29. № 4–5. С. 571–625.

41. Cui W. и др. Dopaminergic Signaling in the Nucleus Accumbens Modulates Stress-Coping Strategies during Inescapable Stress // J. Neurosci. 2020. Т. 40. № 38. С. 7241–7254.

42. Culley G. и др. Tonically active NMDA receptors – a signalling mechanism critical for interneuronal excitability in the CA1 stratum radiatum // European Journal of Neuroscience. 2016. Т. 43. № 2. С. 169–178.

43. Dale E. и др. Vortioxetine disinhibits pyramidal cell function and enhances synaptic plasticity in the rat hippocampus // Journal of Psychopharmacology. 2014. Т. 28. № 10. С. 891–902.

44. De Boer S. F., Buwalda B., Koolhaas J. M. Untangling the neurobiology of coping styles in rodents: Towards neural mechanisms underlying individual differences in disease susceptibility // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2017. Т. 74. С. 401–422.

45. Deisseroth K. Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience // Nature Neuroscience. 2015. Т. 18. № 9. С. 1213–1225.

46. Deyama S., Duman R. S. Neurotrophic mechanisms underlying the rapid and sustained antidepressant actions of ketamine // Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2020. Т. 188. С. 172837

47. Deyama S., Kaneda K. Role of neurotrophic and growth factors in the rapid and sustained antidepressant actions of ketamine // Neuropharmacology. 2023. Т. 224. С. 109335.

48. Diaz-Gil D. и др. Etomidate and Ketamine: Residual Motor and Adrenal Dysfunction that Persist beyond Recovery from Loss of Righting Reflex in Rats // Pharmaceuticals 2015, Vol. 8, Pages 21-37. 2014. Т. 8. № 1. С. 21–37.

49. Dolzani S. D. и др. Activation of a Habenulo–Raphe Circuit Is Critical for the Behavioral and Neurochemical Consequences of Uncontrollable Stress in the Male Rat // eNeuro. 2016. Т. 3. № 5. С. ENEURO.0229-16.2016.

50. Dorey R. и др. Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus // Neuropsychopharmacol. 2012. Т. 37. № 13. С. 2870–2880.

51. Doya K., Miyazaki K. W., Miyazaki K. Serotonergic modulation of cognitive computations // Current Opinion in Behavioral Sciences. 2021. Т. 38. С. 116–123.

52. Drozd U. S. и др. Prefrontal Cortical Projection Neurons: Involvement in Shaping Different Types of Behaviors, BDNF Expression and Transport // J Evol Biochem Phys. 2024. Т. 60. № 5. С. 2116–2133.

53. Drozd U. S. и др. Ketamine Reverses Depressive-Like Behavior Induced by Optogenetic Stimulation of Glutamatergic Neurons in the Dorsal Hippocampus // Neurochem. J. 2025. Т. 19. № 3. С. 366–373.

54. Drozd U. S., Lanshakov D. A. Creation of the viral vectors for the inhibition of the serotonergic neurons using light sensitive proton pump // Integrative Physiology. 2020. Т. 1. № 2. С. 144–146.

55. Drozd U. S., Lanshakov D. A., Dygalo N. N. Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neuron Activity is Necessary for the Manifestation of the Antidepressant Effect of Ketamine // Neurochem. J. 2023. Т. 17. № 3. С. 394–401.

56. Drozd U. S., Shaburova E. V., Dygalo N. N. Genetic approaches to the investigation of serotonergic neuron functions in animals // Vestn. VOGiS. 2019. Т. 23. № 4. С. 448–455.

57. Drozd U. S. и др. Subanesthetic ketamine modulates region-specific neural and endocrine responses to acute stress in rats // Neuropharmacology. 2027. Т. 302. С. 111231.

58. Du Jardin K. G. и др. S-Ketamine Mediates Its Acute and Sustained Antidepressant-Like Activity through a 5-HT1B Receptor Dependent Mechanism in a Genetic Rat Model of Depression // Front. Pharmacol. 2018. Т. 8. С. 978.

59. Duman R. S. и др. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants // Nat Med. 2016. Т. 22. № 3. С. 238–249.

60. Duman R. S., Aghajanian G. K. Synaptic Dysfunction in Depression: Potential Therapeutic Targets // Science. 2012. Т. 338. № 6103. С. 68–72.

61. Duman R. S., Sanacora G., Krystal J. H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments // Neuron. 2019. Т. 102. № 1. С. 75–90.

62. Durieux L. и др. Coping switches stress–evoked network disconnection to a new forebrain network state // BioRxiv. 2024. С. 1-29.

63. Elersič K. и др. Behavioral sensitization and tolerance induced by repeated treatment with ketamine enantiomers in male Wistar rats // PLoS ONE. 2024. Т. 19. № 3. С. e0299379.

64. Escobedo A. и др. Glutamatergic Supramammillary Nucleus Neurons Respond to Threatening Stressors and Promote Active Coping // eLife. 2022. С. 12:RP90972.

65. Evans J. W. и др. Hippocampal volume changes after (R,S)-ketamine administration in patients with major depressive disorder and healthy volunteers // Sci Rep. 2024. Т. 14. № 1. С. 4538.

66. Fakhoury M. Optogenetics: A revolutionary approach for the study of depression // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2021. Т. 106. С. 110094.

67. Fanselow M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus // Behavioural Brain Research. 2000. Т. 110. № 1–2. С. 73–81.

68. Farzaneh M. и др. Transduction efficacy and retrograde movement of a lentiviral vector pseudotyped by modified rabies glycoprotein throughout the trisynaptic circuit of the rat hippocampus // The Journal of Gene Medicine. 2018. Т. 20. № 9. С. e3046.

69. Ferraro G. и др. Lateral habenula and hippocampus: A complex interaction raphe cells-mediated // Journal of Neural Transmission. 1997. Т. 104. № 6–7. С. 615–631.

70. Fleury S. и др. Multiply Attenuated, Self-Inactivating Lentiviral Vectors Efficiently Deliver and Express Genes for Extended Periods of Time in Adult Rat Cardiomyocytes In Vivo // Circulation. 2003. Т. 107. № 18. С. 2375–2382.

71. Franceschelli A. и др. Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naïve and “depressed” mice exposed to chronic mild stress // Neuroscience. 2015. Т. 290. С. 49–60.

72. Fukumoto K. и др. Role of 5-HT 1A Receptor Stimulation in the Medial Prefrontal Cortex in the Sustained Antidepressant Effects of Ketamine // International Journal of Neuropsychopharmacology. 2018. Т. 21. № 4. С. 371–381.

73. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. Serotonin-1A receptor stimulation mediates effects of a metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid (LY341495), and an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine, in the novelty-suppressed feeding test // Psychopharmacology. 2014. Т. 231. № 11. С. 2291–2298.

74. Fukumoto K., Iijima M., Chaki S. The Antidepressant Effects of an mGlu2/3 Receptor Antagonist and Ketamine Require AMPA Receptor Stimulation in the mPFC and Subsequent Activation of the 5-HT Neurons in the DRN // Neuropsychopharmacology 2016 41:4. 2015. Т. 41. № 4. С. 1046–1056.

75. Garcia L. S. B. и др. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2009. Т. 33. № 3. С. 450–455.

76. Garduño J. и др. Presynaptic α4β2 nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus // Journal of Neuroscience. 2012. Т. 32. № 43. С. 15148–15157.

77. Gerasimov E. и др. Dynamic changes in the hippocampal neuronal circuits activity following acute stress revealed by miniature fluorescence microscopy imaging // Mol Brain. 2024. Т. 17. № 1. С. 92.

78. Gergues M. M. и др. Circuit and molecular architecture of a ventral hippocampal network // Nat Neurosci. 2020. Т. 23. № 11. С. 1444–1452.

79. Gerhard D. M. и др. GABA interneurons are the cellular trigger for ketamine’s rapid antidepressant actions // Journal of Clinical Investigation. 2020. Т. 130. № 3. С. 1336–1349.

80. Ghasemi M. и др. Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms // Cogn Affect Behav Neurosci. 2022. Т. 22. № 3. С. 431–449.

81. Gigliucci V. и др. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism // Psychopharmacology. 2013. Т. 228. № 1. С. 157–166.

82. Grigoryan G., Segal M. Lasting Differential Effects on Plasticity Induced by Prenatal Stress in Dorsal and Ventral Hippocampus // Neural Plasticity. 2016. Т. 2016. С. 1–10.

83. Guliaeva N. V. Effects of stress factors on adult hippocampus: molecular, cellular mechanisms and dorso-ventral gradient // Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2013. Т. 99. № 1. С. 3–16.

84. Günther A. и др. HCN4 knockdown in dorsal hippocampus promotes anxiety-like behavior in mice // Genes Brain and Behavior. 2019. Т. 18. № 2. С. e12550.

85. Hainmueller T., Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories // Nat Rev Neurosci. 2020. Т. 21. № 3. С. 153–168.

86. Hale M. W., Shekhar A., Lowry C. A. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders // Cell Mol Neurobiol. 2012. Т. 32. № 5. С. 695–708.

87. Hashimoto K. Ketamine: anesthetic, psychotomimetic, antidepressant, or anthelmintic? // Molecular Psychiatry. 2022. Т. 27. № 8. С. 3116–3118.

88. Hayes J. P. и др. Automated measurement of hippocampal subfields in PTSD: Evidence for smaller dentate gyrus volume // Journal of Psychiatric Research. 2017. Т. 95. С. 247–252.

89. Herman J. P. и др. Contribution of the Ventral Subiculum to Inhibitory Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis // J Neuroendocrinology. 1995. Т. 7. № 6. С. 475–482.

90. Hermans E. J., Hendler T., Kalisch R. Building Resilience: The Stress Response as a Driving Force for Neuroplasticity and Adaptation // Biological Psychiatry. 2025. Т. 97. № 4. С. 330–338.

91. Hernández-Vázquez F., Garduño J., Hernández-López S. GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus // Reviews in the Neurosciences. 2019. Т. 30. № 3. С. 289–303.

92. Homayoun H., Moghaddam B. NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons // Journal of Neuroscience. 2007. Т. 27. № 43. С. 11496–11500.

93. Hong I., Kaang B. K. The complexity of ventral CA1 and its multiple functionalities // Genes, Brain and Behavior. 2022. Т. 21. № 7. С. e12826.

94. Imre G. и др. Dose–response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity // Brain Research Bulletin. 2006. Т. 69. № 3. С. 338–345.

95. Izumi Y., Zorumski C. F. Metaplastic effects of subanesthetic ketamine on CA1 hippocampal function // Neuropharmacology. 2014. Т. 86. С. 273–281.

96. Jacobs B. L., Azmitia E. C. Structure and function of the brain serotonin system // Physiological Reviews. 1992. Т. 72. № 1. С. 165–229.

97. Jacobson L., Sapolsky R. The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis* // Endocrine Reviews. 1991. Т. 12. № 2. С. 118–134.

98. Jankord R., Herman J. P. Limbic Regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function during Acute and Chronic Stress // Annals of the New York Academy of Sciences. 2008. Т. 1148. № 1. С. 64–73.

99. Jardin K. G. du и др. Potential involvement of serotonergic signaling in ketamine's antidepressant actions: A critical review // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2016. Т. 71. С. 27–38.

100. Jimenez J. C. и др. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit // Neuron. 2018. Т. 97. № 3. С. 670- 683.e6.

101. Jing L. и др. Despair-associated memory requires a slow-onset CA1 long-term potentiation with unique underlying mechanisms // Sci Rep. 2015. Т. 5. № 1. С. 15000.

102. Joëls M., Baram T. Z. The neuro-symphony of stress // Nat Rev Neurosci. 2009. Т. 10. № 6. С. 459–466.

103. Johnson S. B. и др. Activity in a prefrontal-periaqueductal gray circuit overcomes behavioral and endocrine features of the passive coping stress response // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2022. Т. 119. № 44. С. e2210783119.

104. Jørgensen H. и др. Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release // Brain Research. 1998. Т. 811. № 1–2. С. 10–20.

105. Kamali A. и др. The Cortico-Limbo-Thalamo-Cortical Circuits: An Update to the Original Papez Circuit of the Human Limbic System // Brain Topogr. 2023. Т. 36. № 3. С. 371–389.

106. Keay K. A., Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2001. Т. 25. № 7–8. С. 669–678.

107. Kempermann G. What Is Adult Hippocampal Neurogenesis Good for? // Front. Neurosci. 2022. Т. 16. С. 852680.

108. Kim C. S., Chang P. Y., Johnston D. Enhancement of Dorsal Hippocampal Activity by Knockdown of HCN1 Channels Leads to Anxiolytic- and Antidepressant-like Behaviors // Neuron. 2012. Т. 75. № 3. С. 503–516.

109. Kim C. S., Kim J., Michael S. Effects of post-stress corticosterone on hippocampal excitability and behavior involving hyperpolarization-activated cation channel 1 function // Transl Psychiatry. 2026. Т. 16. № 1. С. 74.

110. Kim J. и др. Glucocorticoid-glucocorticoid receptor-HCN1 channels reduce neuronal excitability in dorsal hippocampal CA1 neurons // Mol Psychiatry. 2022. Т. 27. № 10. С. 4035–4049.

111. Kovács K. J. c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map // Neurochemistry International. 1998. Т. 33. № 4. С. 287–297.

112. Krugers H. J., Joëls M. The Stress Response Is Adaptive in a Context- and State-Dependent Manner // Cells. 2025. Т. 14. № 24. С. 1957.

113. Lanshakov D. A. и др. Transfer of optogenetic vectors into the brain of neonatal animals to study neuron functions during subsequent periods of development // Vestn. VOGiS. 2016. Т. 20. № 2. С. 255–261.

114. Lanshakov D. A., Drozd U. S., Dygalo N. N. Optogenetic stimulation increases level of antiapoptotic protein Bcl-xL in Neurons // Biochemistry Moscow. 2017. Т. 82. № 3. С. 340–344.

115. Lebedeva J. и др. Excitatory neurons in stratum radiatum provide an alternative pathway for excitation flow that escapes perisomatic inhibition // eLife. 2023. Т. 13 С. RP94385.

116. Lee J. и др. Anatomical topology of extrahippocampal projections from dorsoventral CA pyramidal neurons in mice // Front. Neuroanat. 2024. Т. 18. С. 1421034.

117. Leiser S. C. и др. Serotonergic Regulation of Prefrontal Cortical Circuitries Involved in Cognitive Processing: A Review of Individual 5-HT Receptor Mechanisms and Concerted Effects of 5-HT Receptors Exemplified by the Multimodal Antidepressant Vortioxetine // ACS Chemical Neuroscience. 2015. Т. 6. № 7. С. 970–986.

118. Li C. и др. Glucocorticoids Selectively Inhibit Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons Activity Through HCN Channels // IJMS. 2024a. Т. 25. № 22. С. 11971.

119. Li N. и др. mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists // Science. 2010. Т. 329. № 5994. С. 959–964.

120. Li Y. и др. Mechanisms of memory-supporting neuronal dynamics in hippocampal area CA3 // Cell. 2024b. Т. 187. № 24. С. 6804- 6819.e21.

121. Li Y. F. A hypothesis of monoamine (5-HT) – Glutamate/GABA long neural circuit: Aiming for fast-onset antidepressant discovery // Pharmacology & Therapeutics. 2020. Т. 208. С. 107494.

122. Lin S. и др. Advances in optogenetic studies of depressive-like behaviors and underlying neural circuit mechanisms // Frontiers in Psychiatry. 2022. Т. 13. С. 950910

123. Lisman J. и др. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition // Nat Neurosci. 2017. Т. 20. № 11. С. 1434–1447.

124. López-Gil X. и др. Role of Serotonin and Noradrenaline in the Rapid Antidepressant Action of Ketamine // ACS Chemical Neuroscience. 2019a. Т. 10. № 7. С. 3318–3326.

125. Lopez-Rojas J. и др. A direct lateral entorhinal cortex to hippocampal CA2 circuit conveys social information required for social memory // Neuron. 2022. Т. 110. № 9. С. 1559-1572.e4.

126. Lowry C. A. Functional Subsets of Serotonergic Neurones: Implications for Control of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis // J Neuroendocrinology. 2002. Т. 14. № 11. С. 911–923.

127. Luchetti A. и др. Two Functionally Distinct Serotonergic Projections into Hippocampus // Journal of Neuroscience. 2020. Т. 40. № 25. С. 4936–4944.

128. Luo X. и др. Transcriptomic profile of the subiculum-projecting VIP GABAergic neurons in the mouse CA1 hippocampus // Brain Struct Funct. 2019. Т. 224. № 6. С. 2269–2280.

129. Luo X. и др. Dynamic brain network reconfiguration under stress: A multiphase fMRI study // NeuroImage. 2026. Т. 332. С. 121903.

130. Maati H. M. ou и др. The peptidic antidepressant spadin interacts with prefrontal 5-HT4 and mGluR2 receptors in the control of serotonergic function // Brain Structure and Function. 2016. Т. 221. № 1. С. 21–37.

131. Maeng S. и др. Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors // Biological Psychiatry. 2008. Т. 63. № 4. С. 349–352.

132. Maggio N., Segal M. Differential Modulation of Long-Term Depression by Acute Stress in the Rat Dorsal and Ventral Hippocampus // Journal of Neuroscience. 2009. Т. 29. № 27. С. 8633–8638.

133. Martinez M., Calvo-Torrent A., Herbert J. Mapping Brain Response to Social Stress in Rodents With c-fos Expression: A Review // Stress. 2002. Т. 5. № 1. С. 3–13.

134. McClure C. и др. Production and Titering of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors // Journal of Visualized Experiments : JoVE. 2011. № 57. С. 3348.

135. McEwen B. S. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain // Physiological Reviews. 2007. Т. 87. № 3. С. 873–904.

136. Mercier M. S. и др. Long-term potentiation in neurogliaform interneurons modulates excitation–inhibition balance in the temporoammonic pathway // The Journal of Physiology. 2022. Т. 600. № 17. С. 4001–4017.

137. Michelsen K. A., Schmitz C., Steinbusch H. W. M. The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression // Brain Research Reviews. 2007. Т. 55. № 2. С. 329–342.

138. Mikkelsen J. D., Hay-Schmidt A., Kiss A. Serotonergic Stimulation of the Rat Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis: Interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors // Annals of the New York Academy of Sciences. 2004. Т. 1018. № 1. С. 65–70.

139. Miller O. H., Moran J. T., Hall B. J. Two cellular hypotheses explaining the initiation of ketamine's antidepressant actions: Direct inhibition and disinhibition // Neuropharmacology. 2016. Т. 100. С. 17–26.

140. Molendijk M. L., De Kloet E. R. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression // Psychoneuroendocrinology. 2015. Т. 62. С. 389–391.

141. Molyneaux B. J. и др. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex // Nature Reviews Neuroscience. 2007. Т. 8. № 6. С. 427–437.

142. Monteggia L. M., Zarate C. Antidepressant actions of ketamine: from molecular mechanisms to clinical practice // Current Opinion in Neurobiology. 2015. Т. 30. С. 139–143.

143. Muzerelle A. и др. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem // Brain Struct Funct. 2016. Т. 221. № 1. С. 535–561.

144. Nishitani N. и др. Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex // The International Journal of Neuropsychopharmacology. 2014. Т. 17. № 08. С. 1321–1326.

145. Nishitani N. и др. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats // Neuropsychopharmacol. 2019a. Т. 44. № 4. С. 721–732.

146. Nosyreva E. и др. Acute Suppression of Spontaneous Neurotransmission Drives Synaptic Potentiation // J. Neurosci. 2013. Т. 33. № 16. С. 6990–7002.

147. Nowak K. и др. Local blockade of NMDA receptors in the rat prefrontal cortex increases c-Fos expression in multiple subcortical regions // Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2012. Т. 72. № 3. С. 207–218.

148. Oliva A., Fernandez-Ruiz A., Karaba L. A. CA2 orchestrates hippocampal network dynamics // Hippocampus. 2023. Т. 33. № 3. С. 241–251.

149. Papp M. и др. Insufficiency of ventral hippocampus to medial prefrontal cortex transmission explains antidepressant non-response // J Psychopharmacol. 2021. Т. 35. № 10. С. 1253–1264.

150. Peltoniemi M. A. и др. Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy // Clinical Pharmacokinetics. 2016. Т. 55. № 9. С. 1059–1077.

151. Penington N. J., Kelly J. S., Fox A. P. Whole-cell recordings of inwardly rectifying K+ currents activated by 5-HT1A receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. // The Journal of Physiology. 1993. Т. 469. № 1. С. 387–405.

152. Pennington Z. T. и др. Dissociable contributions of the amygdala and ventral hippocampus to stress-induced changes in defensive behavior // Cell Reports. 2024. Т. 43. № 11. С. 114871.

153. Pham T. H. и др. Ketamine treatment involves medial prefrontal cortex serotonin to induce a rapid antidepressant-like activity in BALB/cJ mice // Neuropharmacology. 2017. Т. 112. С. 198–209.

154. Popoli M. и др. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. // Nature reviews. Neuroscience. 2012. Т. 13. № 1. С. 22–37.

155. Porsolt R. D., Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments // Nature. 1977. Т. 266. № 5604. С. 730–732.

156. Prakash N. и др. Serotonergic Plasticity in the Dorsal Raphe Nucleus Characterizes Susceptibility and Resilience to Anhedonia // J. Neurosci. 2020. Т. 40. № 3. С. 569–584.

157. Puglisi-Allegra S., Andolina D. Serotonin and stress coping // Behavioural Brain Research. 2015. Т. 277. С. 58–67.

158. Puig M. V., Gulledge A. T. Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits // Molecular Neurobiology. 2011. Т. 44. № 3. С. 449–464.

159. Qiu S. и др. Whole-brain spatial organization of hippocampal single-neuron projectomes // Science. 2024. Т. 383. № 6682. С. eadj9198.

160. Ren J. и др. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems // Cell. 2018. Т. 175. № 2. С. 472- 487.e20.

161. Robert V. и др. Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function // Cell Tissue Res. 2018. Т. 373. № 3. С. 525–540.

162. Roddy D. W. и др. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression // Biological Psychiatry. 2019. Т. 85. № 6. С. 487–497.

163. Sakai K., Crochet S. Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake–sleep states // Neuroscience. 2001. Т. 104. № 4. С. 1141–1155.

164. Sammons R. P. и др. Structure and function of the hippocampal CA3 module // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2024. Т. 121. № 6. С. e2312281120.

165. Saxena P. R. Serotonin receptors: Subtypes, functional responses and therapeutic relevance // Pharmacology & Therapeutics. 1995. Т. 66. № 2. С. 339–368.

166. Schweimer J. V., Ungless M. A. Phasic responses in dorsal raphe serotonin neurons to noxious stimuli // Neuroscience. 2010. Т. 171. № 4. С. 1209–1215.

167. Scopinho A. A. и др. Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats // PLoS ONE. 2013. Т. 8. № 10. С. e77750.

168. Segal M., Richter-Levin G., Maggio N. Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: A hypothesis // Hippocampus. 2010. Т. 20. № 12. С. 1332–1338.

169. Seligman M. E., Maier S. F. Failure to escape traumatic shock. // Journal of Experimental Psychology. 1967. Т. 74. № 1. С. 1–9.

170. Shaburova E. V., Lanshakov D. A. Effective Transduction of Brain Neurons with Lentiviral Vectors Purified by Ion-Exchange Chromatography // Biotekhnologiya. 2020. Т. 36. № 5. С. 89–97.

171. Shaburova E. V., Lanshakov D. A. Effective Transduction of Brain Neurons with Lentiviral Vectors Purified via Ion-Exchange Chromatography // Appl Biochem Microbiol. 2021. Т. 57. № 8. С. 890–898.

172. Shi H. J. и др. Hippocampus: Molecular, Cellular, and Circuit Features in Anxiety // Neuroscience Bulletin 2023 39:6. 2023. Т. 39. № 6. С. 1009–1026.

173. Shinohara Y., Kohara K. Projections of hippocampal CA2 pyramidal neurons: Distinct innervation patterns of CA2 compared to CA3 in rodents // Hippocampus. 2023. Т. 33. № 6. С. 691–699.

174. Soiza-Reilly M. и др. Presynaptic gating of excitation in the dorsal raphe nucleus by GABA. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013. Т. 110. № 39. С. 15800–5.

175. Steru L. и др. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice // Psychopharmacology. 1985. Т. 85. № 3. С. 367–370.

176. Su J. и др. Entorhinohippocampal cholecystokinin modulates spatial learning by facilitating neuroplasticity of hippocampal CA3-CA1 synapses // Cell Reports. 2023. Т. 42. № 12. С. 113467.

177. Surget A., Belzung C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective // Mol Psychiatry. 2022. Т. 27. № 1. С. 403–421.

178. Takata N. и др. Optogenetic Activation of CA1 Pyramidal Neurons at the Dorsal and Ventral Hippocampus Evokes Distinct Brain-Wide Responses Revealed by Mouse fMRI // PLOS ONE. 2015. Т. 10. № 3. С. e0121417.

179. Tao S. и др. Whole-Brain Mapping the Direct Inputs of Dorsal and Ventral CA1 Projection Neurons // Frontiers in Neural Circuits. 2021. Т. 15. С. 20.

180. Teissier A. и др. Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors // Cell Reports. 2015. Т. 13. № 9. С. 1965–1976.

181. Torrisi S. A. и др. Memantine prevents acute stress-induced memory deficits by reversing sex-dependent pathophysiological glutamatergic alterations in the dorsal hippocampus // British J Pharmacology. 2026. Т. 183. № 16. С. 4939–4952.

182. Trompoukis G., Miliou A., Papatheodoropoulos C. β-adrenergic receptor-induced E-S potentiation in the dorsal and ventral hippocampus // Front. Synaptic Neurosci. 2024. Т. 16. С. 1511485.

183. Trompoukis G., Papatheodoropoulos C. Dorsal-Ventral Differences in Modulation of Synaptic Transmission in the Hippocampus // Front. Synaptic Neurosci. 2020. Т. 12. С. 24.

184. Väisänen J. и др. Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia // Cellular and Molecular Neurobiology. 2004. Т. 24. № 6. С. 769–780.

185. Valentino R. J., Lucki I., Van Bockstaele E. Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe nucleus: Linking stress coping and addiction // Brain Research. 2010. Т. 1314. С. 29–37.

186. Van Der Veldt S. и др. Anxiety and Beyond: Diversity in Ventral Hippocampus Circuits and Function // J. Neurosci. 2025. Т. 45. № 46. С. e1304252025.

187. Vandael D. и др. Corticotropin-releasing factor induces functional and structural synaptic remodelling in acute stress // Transl Psychiatry. 2021. Т. 11. № 1. С. 378.

188. Varga V. и др. Evidence for a role of GABA interneurones in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones // Neuroscience. 2001. Т. 106. № 4. С. 783–792.

189. Wang M. и др. Synaptic Modifications in the Medial Prefrontal Cortex in Susceptibility and Resilience to Stress // J. Neurosci. 2014. Т. 34. № 22. С. 7485–7492.

190. Warden M. R. и др. A Prefrontal Cortex–Brainstem Neuronal Projection That Controls Response to Behavioural Challenge // Nature. 2012. Т. 492. № 7429. С. 428–432.

191. White P. F. и др. Pharmacology of Ketamine Isomers in Surgical Patients // Anesthesiology. 1980. Т. 52. № 3. С. 231–239.

192. Whitehead G. и др. Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca2+-permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus // Brain. 2013. Т. 136. № 12. С. 3753–3765.

193. Xu C. и др. Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval // Cell. 2016. Т. 167. № 4. С. 961- 972.e16.

194. Yang C. и др. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test // Upsala Journal of Medical Sciences. 2013. Т. 118. № 1. С. 3–8.

195. Yang Y. и др. Opposite monosynaptic scaling of BLP–vCA1 inputs governs hopefulness- and helplessness-modulated spatial learning and memory // Nat Commun. 2016. Т. 7. № 1. С. 11935.

196. Yizhar O. и др. Optogenetics in Neural Systems // Neuron. 2011. Т. 71. № 1. С. 9–34.

197. Yonezawa Y. и др. Involvement of γ-aminobutyric acid neurotransmission in phencyclidine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex // European Journal of Pharmacology. 1998. Т. 341. № 1. С. 45–56.

198. Yoon S. H. и др. Altered GABAergic inhibition in CA1 pyramidal neurons modifies despair-like behavior in mice // BioRxiv. 2020. С. 1-59.

199. Yoon S. H. и др. Activity in the dorsal hippocampus-mPFC circuit modulates stress-coping strategies during inescapable stress // Exp Mol Med. 2024a. Т. 56. № 9. С. 1921–1935.

200. Yoshida K. и др. Chronic social defeat stress impairs goal-directed behavior through dysregulation of ventral hippocampal activity in male mice // Neuropsychopharmacol. 2021. Т. 46. № 9. С. 1606–1616.

201. Zanos P. и др. Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action // CNS Drugs 2018 32:3. 2018. Т. 32. № 3. С. 197–227.

202. Zanos P., Gould T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant // Mol Psychiatry. 2018. Т. 23. № 4. С. 801–811.

203. Zhang F. и др. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry // Nature. 2007. Т. 446. № 7136. С. 633–639.

204. Zhang F. и др. Ketamine-induced hippocampal functional connectivity alterations associated with clinical remission in major depression // Journal of Affective Disorders. 2023. Т. 325. С. 534–541.

205. Zhang M. и др. Effects of subanesthetic intravenous ketamine infusion on neuroplasticity-related proteins in the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus of Sprague-Dawley rats // IBRO Reports. 2019. Т. 6. С. 87–94.

206. Zhang M. и др. Effects of subanesthetic intravenous ketamine infusion on neuroplasticity-related proteins in male and female Sprague-Dawley rats // IBRO Neuroscience Reports. 2021a. Т. 11. С. 42–51.

207. Zhang T. R. и др. Negative Memory Engrams in the Hippocampus Enhance the Susceptibility to Chronic Social Defeat Stress // Journal of Neuroscience. 2019c. Т. 39. № 38. С. 7576–7590.

208. Zhang W. H. и др. Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity // Biological Psychiatry. 2021b. Т. 89. № 9. С. 847–856.

209. Zhao X. и др. Membrane potential dynamics underlying context-dependent sensory responses in the hippocampus // Nat Neurosci. 2020. Т. 23. № 7. С. 881–891.

210. Zhou L. и др. Organization of Functional Long-Range Circuits Controlling the Activity of Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus // Cell Reports. 2017. Т. 18. № 12. С. 3018–3032.

211. Zhou L. и др. Electrophysiological Characteristics of Dorsal Raphe Nucleus in Tail Suspension Test // Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2022. Т. 16. С. 200.

212. Zhou W. и др. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex // European Psychiatry. 2014. Т. 29. № 7. С. 419–423.

213. Zorumski C. F. и др. The Role of GluN2C-Containing NMDA Receptors in Ketamine’s Psychotogenic Action and in Schizophrenia Models // Journal of Neuroscience. 2016. Т. 36. № 44. С. 11151–11157.

214. Zuo D. и др. Effects of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) peptidase inhibition on release of glutamate and dopamine in prefrontal cortex and nucleus accumbens in phencyclidine model of schizophrenia // Journal of Biological Chemistry. 2012. Т. 287. № 26. С. 21773–21782.