

На правах рукописи

Родный Александр Ярославович

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

1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Томск – 2023

Работа выполнена в лаборатории нейрогеномики поведения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Науменко Владимир Сергеевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Трифонов Владимир Александрович
РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук»

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией НИИ молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Гуляева Людмила Федоровна

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита состоится _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан _____ 2023 года

Учёный секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

Серотонин (5-НТ, 5-гидрокситриптами́н) мозга, как известно, задействован в регуляции большого разнообразия физиологических процессов и форм поведения. Полифункциональность 5-НТ системы связана с существованием большого многообразия серотониновых рецепторов – на сегодняшний день у млекопитающих выделяют 14 подтипов (Pytliak et al., 2011). Показаны достоверные различия в физиологических эффектах серотониновых рецепторов. Особое внимание нейробиологов привлекает рецептор 5-НТ_{1A}, поскольку он играет решающую роль в регуляции функционирования 5-НТ системы мозга. Рецепторы 5-НТ_{1A} подтипа модулируют эффекты 5-НТ на настроение и поведение. Более того, было показано, что этот рецептор участвует в механизмах, лежащих в основе депрессии и действия антидепрессантов (Donaldson et al., 2014; Popova et al., 2020).

С другой стороны, рецепторы 5-НТ₇ типа могут существенно влиять на функциональное состояние 5-НТ_{1A} рецепторов. Недавно была обнаружена их способность формировать гетеродимерные комплексы с 5-НТ_{1A} рецепторами, влияя на ауторегуляцию функциональной активности серотониновой системы мозга. В недавнем обзоре (Naumenko et al., 2014) предположено участие гетеродимеризации рецепторов 5-НТ₇ и 5-НТ_{1A} в развитии депрессии и действии антидепрессантов. Основное скопление 5-НТ_{1A} рецепторов сконцентрировано в ядрах шва среднего мозга, где они угнетают спайковую активность нейронов, уменьшая выделение серотонина в синаптическую щель. В физиологических условиях количество гетеродимеров в пресинаптических 5-НТ нейронах выше, чем в постсинаптических, что представляет собой механизм, ответственный за интернализацию 5-НТ_{1A} ауторецепторов. Была выдвинута гипотеза, утверждающая, что при депрессии соотношение между гомодимерами и гетеродимерами в пресинаптических 5-НТ нейронах сдвигается в сторону гомодимеров. Это ведет к снижению интернализации ауторецепторов 5-НТ_{1A}, что, в свою очередь, приводит к опосредованному этим рецептором ингибированию высвобождения 5-НТ (Kondaurova, Vazovkina, Naumenko, 2017; Naumenko et al., 2014). Было предположено, что искусственное увеличение количества пресинаптических 5-НТ₇ рецепторов, должно сместить соотношение между гомодимерами и гетеродимерами в сторону гетеродимеров 5-НТ₇/5-НТ_{1A}, тем самым снизив ингибирующую активность 5-НТ_{1A} рецептора.

Важно также, что 5-НТ_{1A} рецепторы широко распространены и в терминальных областях мозга, где они экспрессируются как постсинаптические гетерорецепторы и оказывают обширное влияние на различные системы мозга. Так, например, активация постсинаптических кортикальных 5-НТ_{1A} рецепторов, находящихся на телах глутаматергических пирамидальных нейронов и/или ГАМК-

ергических интернейронов вызывает различные нейрохимические реакции, включая стимуляцию высвобождения дофамина во фронтальной коре (Barnes et al., 2021; Bortolozzi et al., 2010), а также оказывает антидепрессивноподобный эффект (Vry De et al., 2004). Гетеродимеризация между 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ рецепторами в терминальных областях мозга также представляет интерес в связи с описанными выше фактами.

Изучение эффекта гетеродимеризации между 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ рецепторами в норме и при патологии является актуальным для понимания нейробиологических механизмов депрессии и разработки новых, более эффективных методов терапевтического воздействия.

Степень разработанности проблемы. К настоящему времени накоплены убедительные доказательства значительного вклада 5-НТ₇ рецепторов в контроль депрессивноподобного поведения. Установлено, что как генетический нокаут 5-НТ₇ рецепторов (Guscott et al., 2005; Hedlund et al., 2005), так и фармакологическая блокада 5-НТ₇ рецепторов оказывают антидепрессивное действие. Важно, что ослабление депрессивноподобного поведения вызывают антагонисты 5-НТ₇ рецепторов химически разных групп, такие как луразидон (Thomas, Hagan, 2004; Cates et al., 2013), вортиоксетин (Long, 2019), SB-258719 (Guscott et al., 2005), амисульпирид (Abbas et al., 2009) и JNJ-18038683 (Bonaventure et al., 2012).

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

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

Целью настоящей работы является изучение влияния экспериментально повышенной экспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга и фронтальной коре на регуляцию нормального и депрессивно-подобного поведения, а также на функциональное состояние 5-НТ системы мозга. В рамках цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проверка работоспособности аденоассоциированных вирусных частиц, несущих уже созданную ранее в Лаборатории нейрогеномики поведения

плазмиду AAV_Syn_HTR7-EGFP, обеспечивающую сверхэкспрессию 5-HT₇ рецепторов в нейронах мыши.

2. Изучение влияния сверхэкспрессии гена 5-HT₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга у мышей линии C57Bl/6 на поведение, экспрессию ключевых элементов 5-HT системы и метаболизм 5-HT в структурах мозга.

3. Исследование влияния сверхэкспрессии гена 5-HT₇ рецепторов в ядрах шва среднего мозга у мышей линии ASC/Icg (генетической модели депрессии) на поведение, экспрессию ключевых элементов 5-HT системы и метаболизм 5-HT в структурах мозга.

4. Изучение влияния сверхэкспрессии гена 5-HT₇ рецепторов во фронтальной коре у мышей линии C57Bl/6 на поведение и экспрессию ключевых элементов 5-HT системы и метаболизм 5-HT в структурах мозга.

Научная новизна. В работе впервые было показано, что основанная на AAV сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в ядрах шва среднего мозга вызывает значительный антидепрессивный эффект у мышей линии ASC/Icg с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению и значительно снижает уровень поведенческого отчаяния у мышей линии C57Bl/6J, а также влияет на функционирование 5-HT системы мозга у мышей этих линий. Кроме того, впервые показано, что сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре вызывает депрессивно-подобное поведение у мышей линии C57Bl/6J, дополнительно поддерживая гипотезу о роли гетеродимеризации 5-HT_{1A}/5-HT₇ рецепторов в подавлении активности 5-HT_{1A} рецептора. Кроме того, это доказывает структуроспецифичное участие 5-HT₇ рецептора в регуляции функционального состояния 5-HT системы мозга и механизмах нормального и депрессивно-подобного поведения.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты данной работы вносят вклад в понимание роли взаимодействия 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторов в механизмах регуляции 5-HT системы мозга и депрессивно-подобного поведения. В работе исследован новый механизм, гипотетически, обеспечивающий повышение уровня обмена серотонина посредством ингибирования пресинаптических 5-HT_{1A} рецепторов в ответ на значительно повышенный уровень 5-HT₇ рецепторов в области ядер шва среднего мозга. С другой стороны, сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре, вероятно, ингибируя постсинаптические 5-HT_{1A} рецепторы, может объяснить формирование депрессивно-подобного фенотипа у животных. Полученные результаты могут в дальнейшем послужить основой для разработки новых препаратов, мишенью для которых станут взаимодействия между рецепторами. Кроме того, полученные данные дополняют программы обучения для студентов биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений.

Методология и методы диссертационного исследования. Для реализации задач исследования выбраны высокоинформативные современные методы, поставленные в лаборатории нейрогеномики поведения Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики СО РАН. Объектом исследования являлись мыши линий C57Bl/6J и ASC/Icg для тестирования поведенческих эффектов, изучаемых в результате сверхэкспрессии 5-HT₇ рецепторов в области среднего мозга или фронтальной коры, а также их образцы мозга для молекулярно-генетических исследований. Основные методы исследования:

1. Культуральные методы исследования для наработки и сборки аденоассоциированных вирусных частиц, несущих плазмиды pAAV_Syn_HTR7-EGFP или pAAV_Syn_EGFP.
2. Стереотаксический метод для доставки AAV частиц в целевые структуры мозга мышей.
3. Флуоресцентная микроскопия для подтверждения локализации сверхэкспрессии 5-HT₇ рецепторов (Zeiss Axio Imager, Германия).
4. Поведенческие тесты «открытое поле» и «принудительное плавание».
5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени для оценки уровня экспрессии генов (Roche, Швейцария).
6. Хроматографический анализ для оценки уровня 5-HT и его метаболита 5-ГИУК (Shimadzu Corporation, США).
7. Вестерн-блот анализ для оценки уровня белков (LI-COR, США).
8. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аденоассоциированный генетический конструкт успешно доставляет в клетки и обеспечивает экспрессию плазмиды pAAV_Syn_HTR7-EGFP, кодирующей 5-HT₇ рецептор, меченный флуоресцентным белком EGFP, как в первичной культуре гиппокампальных нейронов *in vitro*, так и в целевых структурах мозга мыши (средний мозг и фронтальная кора) *in vivo* и приводит к сверхэкспрессии белка 5-HT₇-EGFP.
2. Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в области ядер шва среднего мозга снижает уровень поведенческого отчаяния у мышей линии C57Bl/6J и вызывает значительный антидепрессивный эффект у мышей линии ASC/Icg с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, а также влияет на функциональное состояние 5-HT системы мозга.
3. Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора во фронтальной коре вызывает депрессивно-подобное поведение и понижение катаболизма серотонина у мышей линии C57Bl/6J без существенных изменений экспрессии ключевых генов серотониновой системы мозга.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов обосновывается достаточным объемом экспериментального материала с большим объемом исследованных выборок, применением современных высокотехнологичных молекулярно-генетических методов исследования и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки результатов.

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

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

Работа осуществлена при финансовой поддержке Российского научного фонда (19-15-00025).

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Экспериментальные животные

Исследования проводили в виварии конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Опыты проводились на взрослых самцах мышей линии C57Bl/6J и инбредной линии ASC/1cg. Условия содержания животных и проведенные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Экспериментальные серии

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

Второй этап работы проводился аналогично первому, только для мышей линии ASC с генетически детерминированным депрессивно-подобным поведением.

Третья серия экспериментов включала в себя введение опытной группе мышей линии C57Bl/6J в область фронтальной коры конструктора, кодирующего 5-HT₇ с EGFP, в качестве контроля отдельной группе мышей аналогичным образом вводился аденоассоциированный вирус, несущий плазмиду, кодирующую EGFP. Дальнейшие поведенческие тесты и молекулярно-генетические работы проводились аналогично первым двум экспериментальным сериям.

Получение AAV векторов

Плазмиды AAV_Syn_HTR7-EGFP и AAV_Syn_EGFP были сконструированы д.б.н. В. С. Науменко с помощью генно-инженерных методов. Плазида AAV_Syn_HTR7-EGFP кодирует 5-HT₇ рецептор (на основе кДНК канонического транскрипта *Htr7-202*) под синапсиновым промотором и обеспечивает экспрессию гена этого рецептора, а также зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Плазида AAV_Syn_EGFP кодирует ген EGFP под промотором синапсина и в данной работе выступает в качестве контрольной плазмиды.

Оба AAV вектора, использованные в этом исследовании, имели одинаковые геномные титры (10^9 вирусных частиц на 1 мкл) и вводились в средний мозг/фронтальную кору мозга мышей стереотаксически согласно следующим координатам: для среднего мозга AP: -3 мм, L: -2.0 мм, DV: +4 мм, угол введения 38 градусов, поворот 40 градусов, ось Y (135); для фронтальной коры AP+1.5; L+/-1; DV +1.

Флуоресцентная микроскопия

Для срезов мозга: через 5 недель после инъекции AAV в средний мозг или фронтальную кору мышей головной мозг удаляли, фиксировали 4% параформальдегидом и затем погружали в 30% сахарозу. Последовательные срезы размером 20 мкм затем использовались для иммуногистохимического исследования присутствия ТПГ-2 и EGFP в области инъекции плазмид.

Для первичной нейрональной культуры: культуры нейронов гиппокампа получали из мышей C57Bl/6J на 18 эмбриональный день в соответствии протоколом (Kobe, 2012). Культуры поддерживали при 37°C в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂. Трансдукцию клеток проводили на 9-й день *in vitro* с AAV векторами. Снимки делались через 3 дня после трансдукции.

Определение уровня экспрессии генов, кодирующих белки 5-HT_{1A} рецептора, 5-HT₇ рецептора, ТПГ-2, 5-НТТ проводили при помощи количественного метода ОТ-ПЦР (Науменко, В., 2006), а уровни самих белков были определены при помощи Вестерн-блот анализа (Pchibaeva et al., 2018; Rodnyu et al., 2022).

Количественный анализ уровня серотонина и его основного метаболита 5-ГИУК (5-гидроксииндолуксусная кислота) проводилось с помощью ВЭЖХ (Rodnyu et al., 2022).

Статистический анализ и представление данных выполнены с использованием программного обеспечения *GraphPad Prism* версии 9.1.0. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0.05$. Результаты представлены в виде скрипичных диаграмм с медианой (сплошная линия), межквартильным размахом (пунктирные линии) и максимальным и минимальным значением выборки. Двусторонний t-критерий Стьюдента применялся для определения статистического различия между двумя группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

5-НТ₇ рецептор ранее считался положительно связанным с депрессивным поведением: мыши с нокаутом гена 5-НТ₇ рецептора демонстрируют антидепрессивно-подобное поведение (Hedlund, 2005), а антагонист 5-НТ₇ рецептора вызывает антидепрессивный эффект (Bonaventure, 2012). Важно уточнить, что, как и нокаут гена 5-НТ₇ рецептора, так и воздействие антагониста 5-НТ₇ рецептора затрагивают все возможные 5-НТ₇ рецепторы организма и их эффект нельзя определить реакцией каких-либо локальных 5-НТ₇ рецепторов. В данной работе упор делается именно на эффекте конкретных 5-НТ₇ рецепторов определенных структур мозга из-за локального повышения уровня экспрессии гена 5-НТ₇ рецепторов, как в среднем мозге, так и во фронтальной коре.

Необходимо отметить, что на основе гипотезы об участии гетеродимеров 5-НТ_{1A} / 5-НТ₇ в механизмах, лежащих в основе депрессии (Naumenko, 2014), мы предполагаем, что изменение соотношения 5-НТ_{1A} / 5-НТ_{1A} гомо- и 5-НТ_{1A} / 5-НТ₇ гетеродимеров в сторону 5-НТ_{1A} / 5-НТ₇ гетеродимеров в пресинаптических окончаниях 5-НТ нейронов посредством сверхэкспрессии рецептора 5-НТ₇ рецепторов в области среднего мозга может приводить к антидепрессивному эффекту. С другой стороны, непосредственное повышение доли 5-НТ_{1A} / 5-НТ₇ гетеродимеров на постсинаптических окончаниях должно оказывать обратный эффект и приводить к продепрессивному эффекту. Однако в данной работе гетеродимеризация непосредственно не изучалась.

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

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

Место введения вирусного конструкта *in vivo* было подтверждено при помощи флуоресцентной микроскопии. В первую очередь была показана экспрессия плазмиды AAV_Syn_5-HTR7-EGFP, которая вводилась мышам опытной группы. На микрофотографиях срезов головного мозга мышей линии C57Bl/6J можно наблюдать флуоресценцию EGFP-метки на химерном белке 5-НТ₇ рецептора, в области среднего мозга (Рис. 1B). Для подтверждения экспрессии плазмиды в серотониновых нейронах дорсального ядра шва вместе со всеми нейронами в месте инъекции было проведено иммуногистохимическое исследование, включающее окрашивание серотониновых нейронов антителами против ТПГ-2 (Рис. 1A). Затем была показана экспрессия плазмиды AAV_Syn_EGFP, которая вводилась мышам контрольной группы. На микрофотографиях можно наблюдать свечение зеленого флуоресцентного белка EGFP. (Рис. 1B).

Для третьей экспериментальной серии на микрофотографиях срезов головного мозга мышей линии C57Bl/6J можно наблюдать свечение зеленого флуоресцентного белка EGFP (плазида AAV_Syn_EGFP) (Рис. 2A) и

флуоресценцию EGFP-метки на химерном белке 5-HT₇ рецептора (плазмида AAV_Syn_5-HTR7-EGFP), в области фронтальной коры после инъекции генетического конструкта в данную структуру мозга (Рис. 2Б).

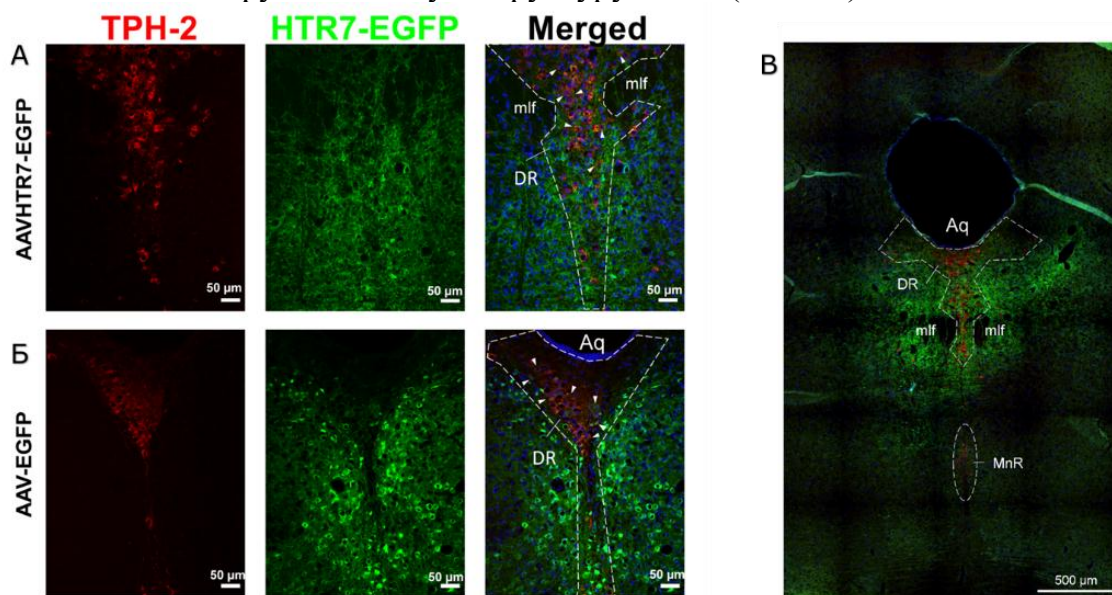


Рисунок 1. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области среднего мозга (А) после инъекции AAV_Syn_HTR7-EGFP, (Б) после инъекции AAV_Syn_EGFP, (В) совмещенное крупное изображение. Представлены серотониновые нейроны, окрашенные антителами против ТПГ-2 (красный), зеленый флуоресцентный белок EGFP, ядерный краситель Hoechst 33258 (синий). Размер шкалы А, Б = 50 мкм, В = 500 мкм.

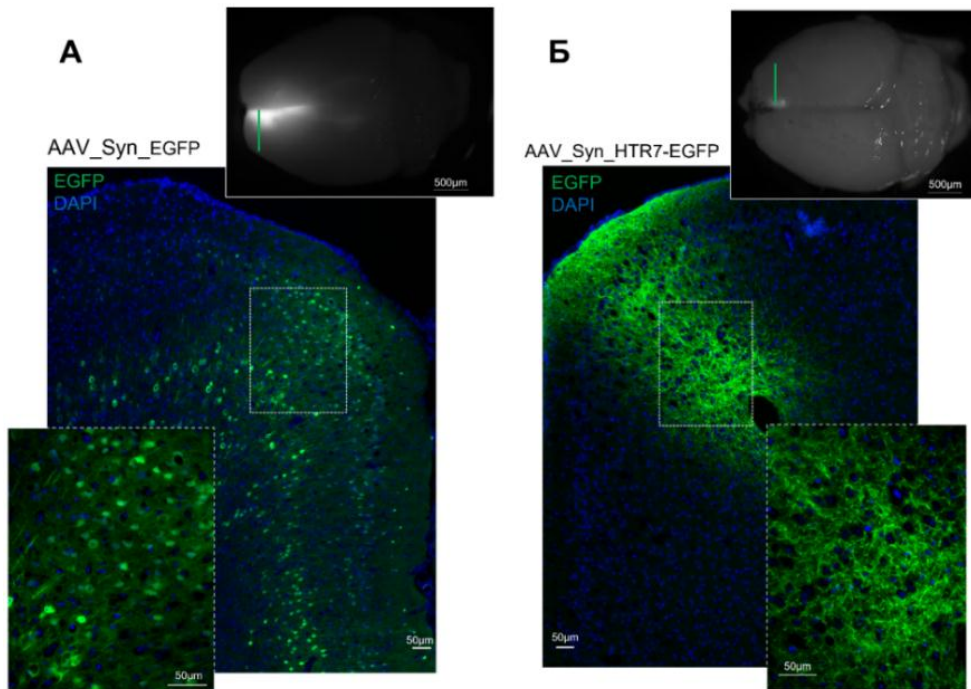


Рисунок 2. Иммуногистохимическое исследование срезов мозга мышей линии C57Bl/6J в области фронтальной коры после инъекции А) AAV_Syn_EGFP и Б) AAV_Syn_HTR7-EGFP. Окраска ядер красителем Hoechst 33258 и зеленый флуоресцентный белок EGFP.

В нашей работе было впервые показано, что введение в средний мозг AAV, вызывающих сверхэкспрессию 5-HT₇ рецептора, мышам линии C57Bl/6J, привело к

снижению уровня поведенческого отчаяния – реакции, подобной вызываемой введением антидепрессантов. Подвижность мышей в тесте «принудительное плавание» по сравнению с контрольными животными в опытной группе (5-НТ7-EGFP) повысилась ($t_{11}=3.037$, $p < 0.05$), а неподвижность понизилась ($t_{11}=2.526$, $p < 0.05$) (Рис. 3А, Б). При этом различий в пройденном пути ($t_{12}=1.648$, $p > 0.05$) и доле времени, проведенного в центре арены ($t_{12}=1.469$, $p > 0.05$), в тесте «открытое поле» не обнаружено (Рис. 3В, Г). У генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей ASC сверхэкспрессия рецептора 5-НТ7 в области ядер шва среднего мозга вызвала повышение уровня подвижности ($t_{16}=2.317$, $p < 0.05$) и снижение времени неподвижности ($t_{17}=3.709$, $p < 0.01$) в тесте принудительного плавания (Рис. 3А, Б). Пройденный путь, отражающий локомоторную активность, в тесте «открытое поле» также значительно увеличился у опытной группы по сравнению с контрольными животными ($t_{16}=2.464$, $p < 0.05$), а доля времени, проведенного в центре, не изменилась (Рис. 3В, Г). Ранее было показано, что мыши ASC/Icsg демонстрируют сниженную двигательную активность по сравнению с родительскими линиями, что считается одним из признаков депрессивно-подобного поведения (Bazovkina, 2005). Чтобы проверить, влияет ли увеличение локомоторной активности на подвижность, был проведен ковариационный анализ, подтвердивший ($F_{1,14}=5.678$, $p < 0.05$), что вызываемый и у мышей ASC/Icsg сверхэкспрессией 5-НТ7 рецепторов в среднем мозге, антидепрессивный эффект не связан с изменениями двигательной активности. Поведенческие эффекты подтверждают высказанную ранее гипотезу о роли гетеродимеризации 5-НТ_{1A} / 5-НТ₇ в регуляции депрессивного поведения.

Сверхэкспрессия 5-НТ7 рецептора во фронтальной коре мышей C57Bl/6J вызывает усиление депрессивно-подобного поведения, отражаемом в понижении подвижности в тесте принудительного плавания по сравнению с контрольной группой ($t_{17}=3.957$, $p < 0.01$) (Рис. 4А). Стоит отметить, что в данном эксперименте были получены достоверные различия лишь по параметру подвижности животного (скорость изменения силуэта), который рассчитывается автоматически самой программой, в то время как параметр времени неподвижности, регистрируемый вручную, не изменился (Рис. 4Б). При этом, как было отмечено выше, в эксперименте с сверхэкспрессией 5-НТ7 рецептора в среднем мозге нам удалось получить достоверные различия, как по времени неподвижности, так и по параметру подвижности животных. Можно предположить, что это связано с тем фактом, что сверхэкспрессия 5-НТ7 рецептора во фронтальной коре оказывает влияние на 5-НТ_{1A} постсинаптические гетерорецепторы, тогда как в области ядер шва задействованы пресинаптические 5-НТ_{1A} ауторецепторы.

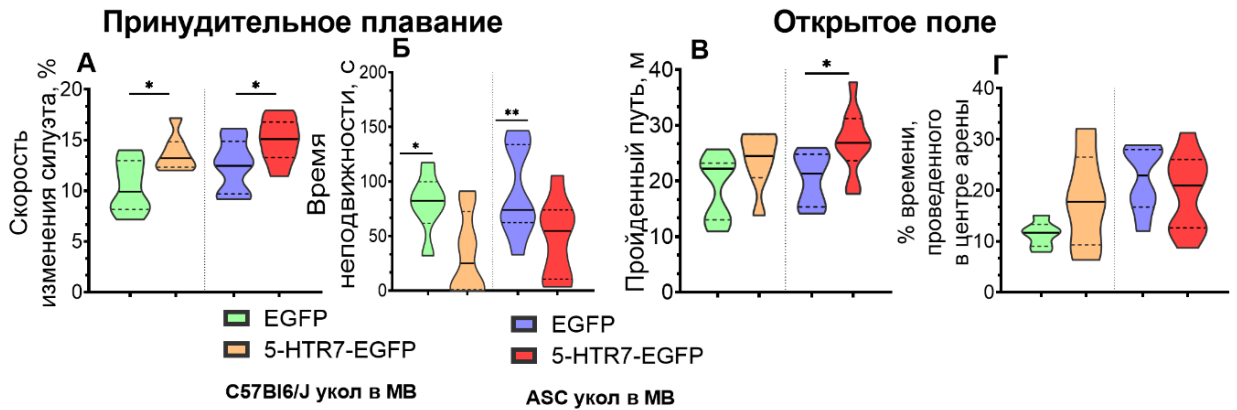


Рисунок 3. Подвижность (А) и время неподвижности (Б) животных в тесте «принудительное плавание»; локомоторная (В) и исследовательская (Г) активность животных в тесте «открытое поле» * $p < 0.05$.

Однако нельзя исключать, что регистрируемый автоматически параметр, возможно, более надежен, чем параметр, субъективно зависимый от оператора.

В тесте «открытое поле» не было найдено различий в пройденном пути и доле времени, проведенного в центре арены, отражающих двигательную и исследовательскую активность, соответственно (Рис. 4В, Г).

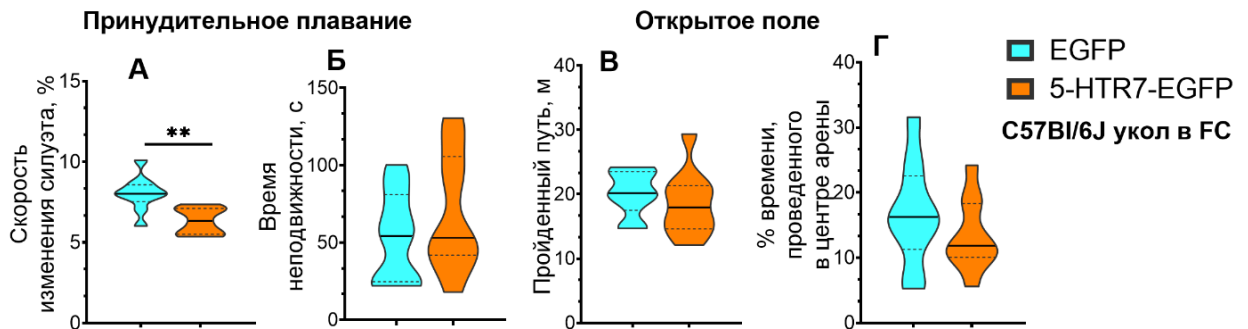


Рисунок 4. Подвижность (А) и время неподвижности (Б) животных в тесте «принудительное плавание»; локомоторная (В) и исследовательская (Г) активность животных в тесте «открытое поле». ** $p < 0.01$.

Введение rAAV_HTR7_EGFP привело к ожидаемой сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге в первой и второй экспериментальной сериях и во фронтальной коре в третьей серии. Однако на фоне повышенной экспрессии гена 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге ($t_{10}=3.602$, $p < 0.01$ для C57Bl/6J и $t_{10}=3.601$, $p < 0.01$ для ASC/Icg), его экспрессия в других структурах также изменилась – повысилась во фронтальной коре ($t_{11}=2.663$, $p < 0.05$) мышей C57Bl/6J и снизилась в гиппокампе ($t_{15}=2.461$, $p < 0.05$) мышей ASC/Icg (Рис. 5А, Б). Эффекты сверхэкспрессии на другие структуры мозга, в которых плазмида rAAV_HTR7_EGFP не экспрессировалась, могут быть связаны с нейрональными проекциями и/или взаимодействием различных нейротрансмиттерных систем, но из-за различий в генетическом фоне исследуемых линий мышей эти эффекты не идентичны. В то же время, конвергенция поведенческих реакций позволяет предположить сходство механизмов, лежащих в основе антидепрессивного эффекта, вызванного сверхэкспрессией 5-НТ₇ рецептора как у «недепрессивных», так и у «депрессивных» мышей. Введение AAV_Syn_HTR7-EGFP во фронтальную кору

мышей C57Bl6/J уровень мРНК 5-HT₇ рецептора значительно повысило экспрессию гена рецептора во фронтальной коре ($t_{16}=3.398$, $p < 0.01$), в то время как никаких изменений в среднем мозге и гиппокампе обнаружено не было (Рис. 6А).

Искусственный белок 5-HT₇ рецептора был обнаружен в среднем мозге в первой и второй экспериментальных сериях и во фронтальной коре третьей экспериментальной серии благодаря антителам против EGFP, которые детектируют EGFP метку на химерном белке 5-HT₇-EGFP с массой 79 кДа. Обнаружить рецептор на этом молекулярном весе с помощью широкого диапазона антител против 5-HT₇ рецептора не удалось ($p > 0.05$ для среднего мозга, фронтальной коры, гиппокампа) (Рис. 5В-Г, 6Б). Нами были протестированы антитела четырех разных производителей, а Демирева Е. Ю. с коллегами (Demireva et al., 2019) протестировали десять коммерчески доступных антител к 5-HT₇ рецептору, чтобы подтвердить отсутствие этого рецептора у созданных ими крыс с нокаутом 5-HT₇^(-/-) и ни одно из антител не выявило потерю сигнала в тканях по 5-HT₇ рецептору. Таким образом, детекция химерного белка 5-HT₇-EGFP с помощью антител против белка EGFP стала единственным технически возможным подтверждением сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора в мозге мышей экспериментальной группы.

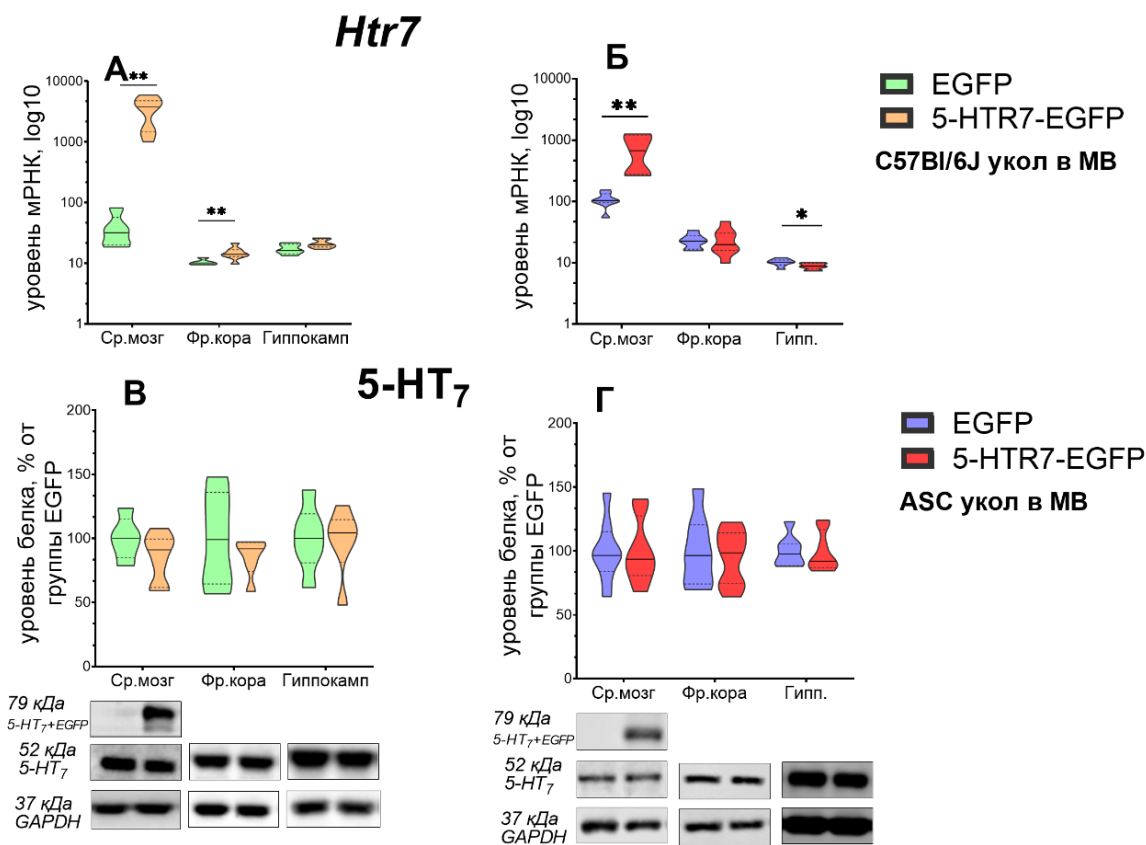


Рисунок 5. Уровень мРНК гена 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе у (А) мышей линии C57Bl6/J и (Б) мышей ASC/Icg, логарифмическая шкала; Уровень белка 5-HT₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе (В) мышей линии C57Bl6/J и (Г) мышей ASC/Icg. ** $p < 0.01$.

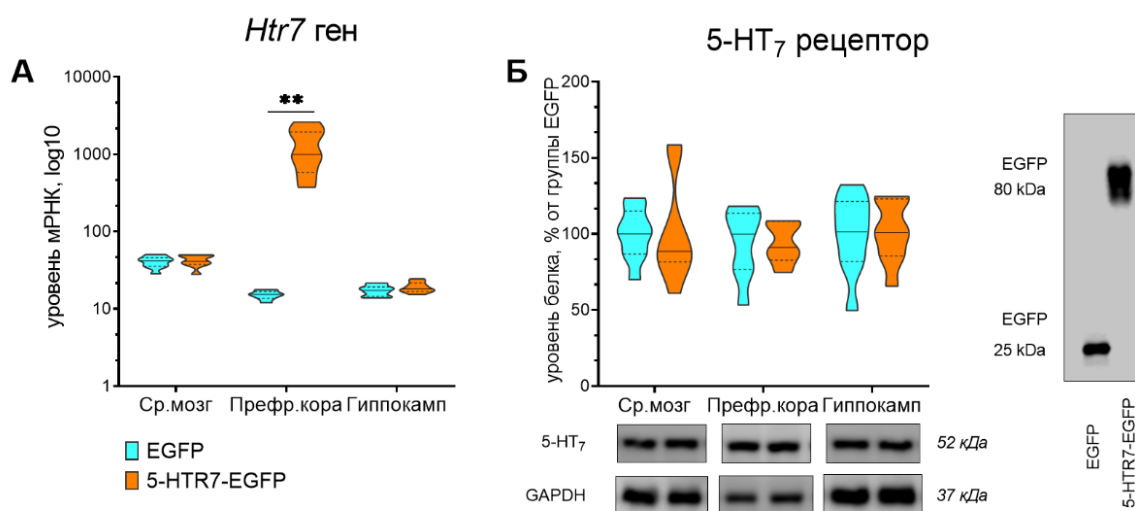


Рисунок 6. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе, логарифмическая шкала; (Б) Уровень белка 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе и хемилюминесцентный сигнал EGFP во фронтальной коре. ** $p < 0.01$.

Имеются данные о локализации 5-НТ₇ рецепторов на ГАМК интернейронах, которые при активации снижают высвобождение ГАМК и, следовательно, уменьшают тормозящее действие 5-НТ нейронов, увеличивая выброс 5-НТ в дорсальные ядра шва (Kusek et al., 2015). Это замечание особенно важно в контексте данной работы, поскольку при инъекции AAV_Syn_5-НТ₇-EGFP в область среднего мозга, сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецепторов может оказывать антидепрессивное действие через ГАМК-опосредованное усиление активности 5-НТ-нейронов, так как нельзя исключить другие возможные механизмы реализации эффектов сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов на поведение (Rodnyu et al., 2022), поскольку в данной работе не проводился PLA (Proximity Ligation Assay) анализ и уровень гетеродимеризации рецепторов на клеточной мембране *in vivo* не измерялся.

Наблюдаемые поведенческие эффекты при сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов в среднем мозге также можно объяснить изменением глутаматергической нейротрансмиссии, которая, как было показано, снижается 5-НТ₇ рецепторами в ядрах шва среднего мозга (Duncan, Congleton, 2010). Действительно, рецептор 5-НТ₇ ингибирует высвобождение глутамата, что, соответственно, приводит к снижению активности серотонинергических нейронов. В области ядер шва среднего мозга это ведет к ослаблению ингибирующего действия ауторецепторов 5-НТ_{1A} на выделение 5-НТ.

Традиционные экспериментальные методы, электрофизиология и микродиализ показали, что эффекты 5-НТ_{1A} и 5-НТ₇ рецепторов на нейротрансмиссию противоположны (5-НТ_{1A} рецепторы являются ингибирующими, а 5-НТ₇ рецепторы активирующими, что обусловлено различиями в G-белках этих рецепторов), однако эффект 5-НТ_{1A} преобладает над эффектом 5-НТ₇ (Okubo et al., 2021), что приводит к недостаточному пониманию функции 5-НТ₇ в области психонейрофармакологии. Накопление знаний о фармакодинамических профилях 5-НТ₇ рецепторов позволяет предположить, что они могут непосредственно являться одним из ключевых игроков на разных

стадиях развития мозга, а дисфункция или модуляция активности 5-HT₇ рецепторов связана с патогенезом и патофизиологией психических расстройств.

Не было обнаружено различий по уровням экспрессии 5-HT_{1A} рецепторов во всех исследованных областях мозга в третьей серии экспериментов с введением во фронтальную кору ($p > 0.05$) (Рис. 8А), в то время как в первой и второй серии экспериментов сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в среднем мозге привела к изменениям в экспрессии 5-HT_{1A} рецептора. Так, при введении AAV_Syn_5-HTR7-EGFP в средний мозг у мышей C57Bl/6J было зафиксировано снижение уровня мРНК 5-HT_{1A} рецептора во фронтальной коре ($t_{11}=3.355$, $p < 0.01$) (Рис. 7А), тогда как у мышей линии ASC экспрессия гена 5-HT_{1A} рецептора оказалась сниженной в гиппокампе ($t_{15}=2.189$, $p < 0.05$) (Рис. 7Г). Такие расхождения можно связать с различающимся генетическим фоном линий мышей C57Bl/6J и ASC. Ранее было показано, что гиппокамп мышей ASC более чувствителен к различным воздействиям, в том числе к хроническому воздействию тироксином (Zubkov et al., 2009), хроническому лечению флуоксетином (Tikhonova et al., 2010), а также интрацеребровентрикулярному введению нейротрофического фактора мозга BDNF (Naumenko et al., 2012). Более того, отсутствие изменений в уровне мРНК 5-HT_{1A} рецептора во фронтальной коре вероятнее всего объясняется более низким базальным уровнем экспрессии рецептора в данной области мозга, а наблюдаемые изменения экспрессии 5-HT_{1A} рецептора в зависимости от региона мозга и линии мышей могут быть опосредованы ГАМК-регуляцией действия серотониновых нейронов в физиологических условиях и при депрессии (Albert, Vahid-Ansari, Luckhart, 2014).

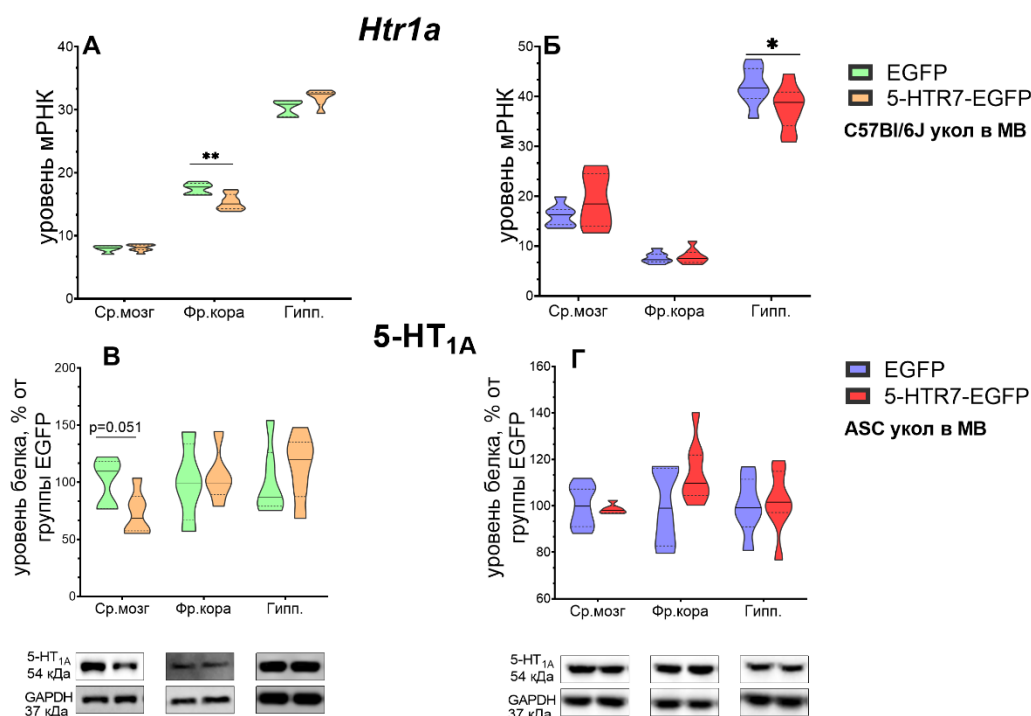


Рисунок 7. Уровень мРНК гена 5-HT_{1A} рецептора у (А) мышей линии C57Bl/6J и (Б) мышей линии ASC/Icg, уровень белка 5-HT_{1A} рецептора у (В) мышей линии C57Bl/6J и (Г) мышей линии ASC/Icg в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. ** $p < 0.01$.

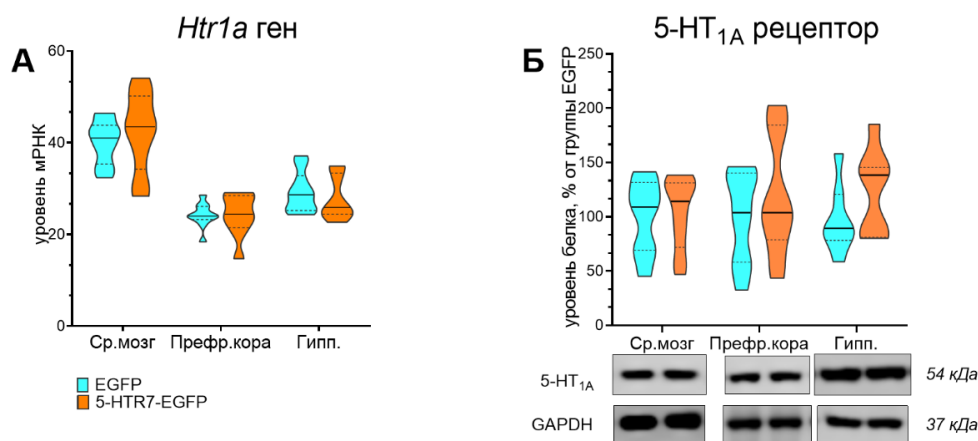


Рисунок 8. (А) Уровень мРНК гена 5-НТ_{1А} рецептора и (Б) уровень белка 5-НТ_{1А} рецептора в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе мышей линии C57Bl/6J после инъекции во фронтальную кору.

Важно отметить, что у мышей C57Bl/6J, при инъекции AAV_Syn_5-HTR7-EGFP в средний мозг также произошло снижение уровня белка 5-НТ_{1А} рецептора именно в мембранной фракции из образцов среднего мозга ($t_9=2.242$, $p=0.051$) (Рис. 7В). Эти данные могут подтверждать идею о том, что изменение соотношения гомодимеров 5-НТ_{1А} рецептора и гетеродимеров 5-НТ_{1А}/5-НТ₇ в сторону увеличения 5-НТ_{1А}/5-НТ₇ комплексов в пресинаптических терминалях повышает интернализацию 5-НТ_{1А} рецептора (Kobe et al., 2012; Naumenko et al., 2014; Renner et al., 2012). Однако сверхэкспрессия 5-НТ₇ в среднем мозге не повлияла на уровень 5-НТ_{1А} рецептора в мембранной фракции из образцов среднего мозга мышей ASC/Icg (Рис. 7Г). Это несоответствие может указывать на независимую роль 5-НТ₇ рецепторов в регуляции депрессивно-подобного поведения у мышей ASC/Icg, хотя это не до конца согласуется с имеющимися данными о положительной ассоциации 5-НТ₇ рецептора с депрессивным поведением (Bonaventure et al., 2012).

В качестве возможного объяснения можно вспомнить о роли других механизмов десенситизации 5-НТ_{1А} рецепторов, но подробно не рассматривались в данной работе. В частности тут могут иметь значение такие механизмы, как разобщение с Gi-белком или генетическая регуляция, поскольку линия мышей ASC/Icg была получена в результате длительного отбора гибридов между предрасположенной к каталепсии линией CBA/Lac и устойчивой к каталепсии линии AKR/J на высокую предрасположенность к каталепсии и значительно отличается от стандартной линии C57Bl/6J. Наличие резко возросшего количества 5-НТ₇ рецепторов, вероятно, могло оказать эффект на те или иные сигнальные каскады, связанные с 5-НТ_{1А} рецептором. Ранее работами лаборатории (Кондаурова, Базовкина, Наumenko, 2017) было показано (и это соотносится с теорией об эффектах гетеродимеризации 5-НТ_{1А} и 5-НТ₇ рецепторов), что хроническое введение LP44, являющегося химическим агонистом 5-НТ₇ рецепторов приводит к выраженной десенситизации также и рецепторов 5-НТ_{1А}. Однако такое воздействие не приводит к существенным изменениям в уровнях экспрессии генов *Htr1a* и *Htr7* в среднем мозге, фронтальной коре и гиппокампе. Кроме того, не было найдено различий в уровне белка 5-НТ_{1А} рецептора во всех исследованных структурах в третьей экспериментальной серии (Рис. 8Б).

Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора как в среднем мозге обоих исследованных линий, так и во фронтальной коре мышей линии C57Bl/6J не повлияла на экспрессию двух ключевых элементов серотониновой системы в среднем мозге – ТПГ-2 и 5-НТТ ($p > 0.05$) (Рис. 9). Это в целом согласуется с ранее полученными результатами, показавшими, что хроническая активация 5-НТ₇ рецепторов его селективным агонистом LP44 не оказала воздействия на экспрессию генов *Tph2* и *Slc6a4* (Kondaurova, Vazovkina, Naumenko, 2017). С другой стороны, необходимо подчеркнуть тот факт, что ТПГ-2 и 5-НТТ оказались в данной работе единственными элементами 5-НТ системы мозга, которые не подверглись изменениям на фоне описанных выше воздействий. Данный факт может говорить о высокой устойчивости этих элементов 5-НТ системы мозга против внешних воздействий не фармакологического профиля. Например, в статье (Pорова et al., 2015), описывающей влияние 1 месяца космического полета на российском биоспутнике БИОН-М1 на экспрессию ключевых генов дофаминовой и 5-НТ систем мозга у мышей, также не было найдено различий по уровням экспрессии ТПГ-2 и 5-НТТ.

Сверхэкспрессия 5-НТ₇ в среднем мозге вызвала значительные изменения метаболизма 5-НТ как у мышей C57Bl/6J, так и у мышей ASC/Icg. Полученные данные также указывают на повышенную чувствительность 5-НТ системы мозга у генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей. Сверхэкспрессия 5-НТ₇ рецептора в среднем мозге привела к увеличению соотношения 5-Н1АА/5-НТ в среднем мозге ($t_{16}=2.508$, $p < 0.05$) и во фронтальной коре ($t_{16}=2.89$, $p < 0.01$) у «недепрессивных» C57Bl/6J (Рис. 10А,В) и в среднем мозге ($t_{13}=4.317$, $p < 0.001$), во фронтальной коре ($t_{15}=2.105$, $p = 0.052$) и гиппокампе ($t_{15}=3.758$, $p < 0.01$) «депрессивных» мышей ASC/Icg (Рис. 10Г,Д,Е). Это, вероятно, указывает на усиление метаболизма 5-НТ и согласуется с идеей о зависимом от 5-НТ₇/5-НТ_{1А} гетеродимеров снижении ингибирующего действия ауторецепторов 5-НТ_{1А} на метаболизм 5-НТ. В то же время уровень 5-Н1АА был выше во фронтальной коре ($t_{15}=2.594$, $p < 0.05$) и гиппокампе ($t_{15}=4.273$, $p < 0.001$) мышей ASC из опытной группы (Рис. 10Д,Е), тогда как у мышей C57Bl/6J сверхэкспрессия рецептора 5-НТ₇ вызвала снижение уровня 5-НТ во фронтальной коре ($t_{16}=2.480$, $p < 0.05$) (Рис. 10Б). В совокупности эти результаты указывают на усиление метаболизма 5-НТ в ответ на сверхэкспрессию рецептора 5-НТ₇ в области ядер шва.

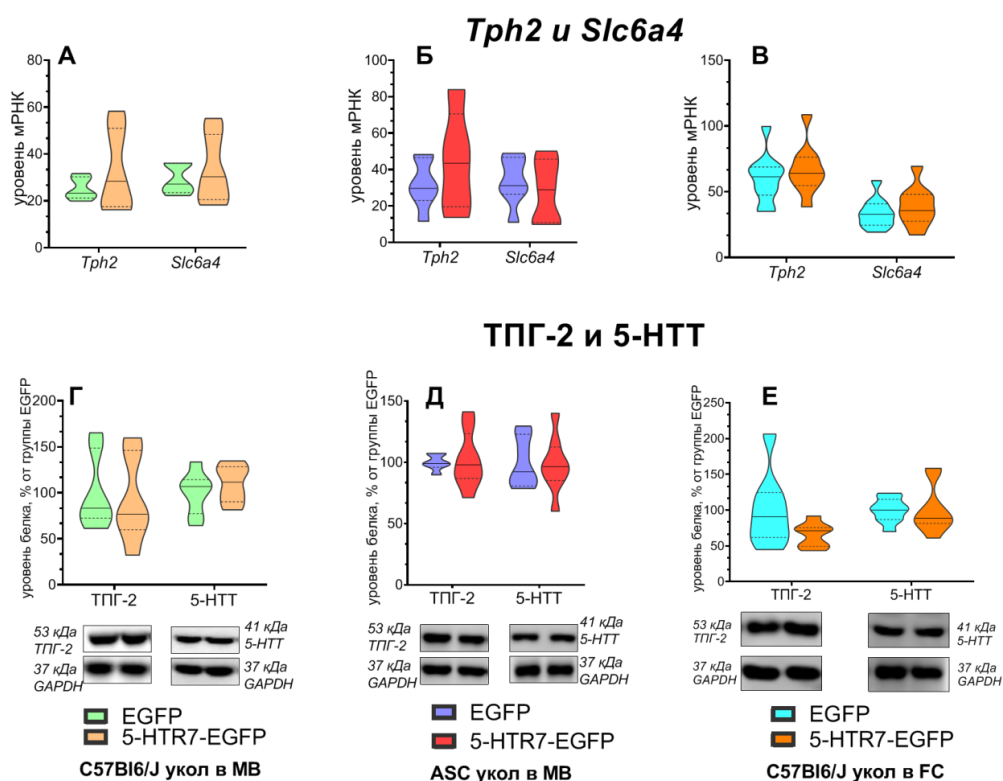


Рисунок 9. Уровень мРНК генов *Trh2* и *SLC6a4* и белков ТПГ-2 и 5-НТТ у (А, Г) мышей линии C57Bl/6J и (Б, Д) мышей линии ASC/Icg после инъекции в средний мозг, (В, Е) мышей линии C57Bl/6J после инъекции во фронтальную кору, соответственно.

Противоположные эффекты были получены при сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре. В этой структуре уровень 5-НТ оказался повышен ($t_{14}=2.216$, $p<0.05$), наряду со сниженным коэффициентом метаболизма серотонина ($t_{14}=3.421$, $p<0.01$). Полученные данные говорят о снижении катаболизма серотонина во фронтальной коре, которое можно объяснить возможным снижением уровня или функциональной активности 5-НТ_{1A} рецепторов из-за их интернализации вследствие димеризации с повышенным количеством 5-НТ₇ рецепторов. В то же время в среднем мозге уровень 5-НТ снизился ($t_{14}=2.171$, $p<0.05$), что вероятно связано с механизмом не прямой отрицательной обратной связи. Этот механизм вовлекает как 5-НТ_{1A} гетерорецепторы, так и 5-НТ₇ рецепторы (в том числе сверхэкспрессированные) глутаматергических нейронов фронтальной коры, дающих нисходящие проекции в средний мозг (Altieri et al., 2013). С другой стороны проекции от глутаматергических нейронов фронтальной коры снижают активность 5-НТ нейронов через ГАМК-интернейроны среднего мозга. Этот механизм гипотетически может понижать активность нейронов среднего мозга при повышении плотности 5-НТ₇ рецепторов во фронтальной коре, оказывающего стимулирующее действие на глутаматергические нейроны фронтальной коры. Гиппокамп оказался единственной структурой, где метаболизм 5-НТ не изменился, что можно объяснить с двух позиций. Во-первых, не известно прямых проекций из фронтальной коры в гиппокамп, а во-вторых, при сверхэкспрессии 5-НТ₇ рецепторов в среднем мозге наблюдались изменения обмена 5-НТ в гиппокампе только у мышей ASC/Icg, но не у C57Bl/6J, что, поддерживает идею о низкой чувствительности гиппокампа этой линии мышей к подобного рода воздействиям.

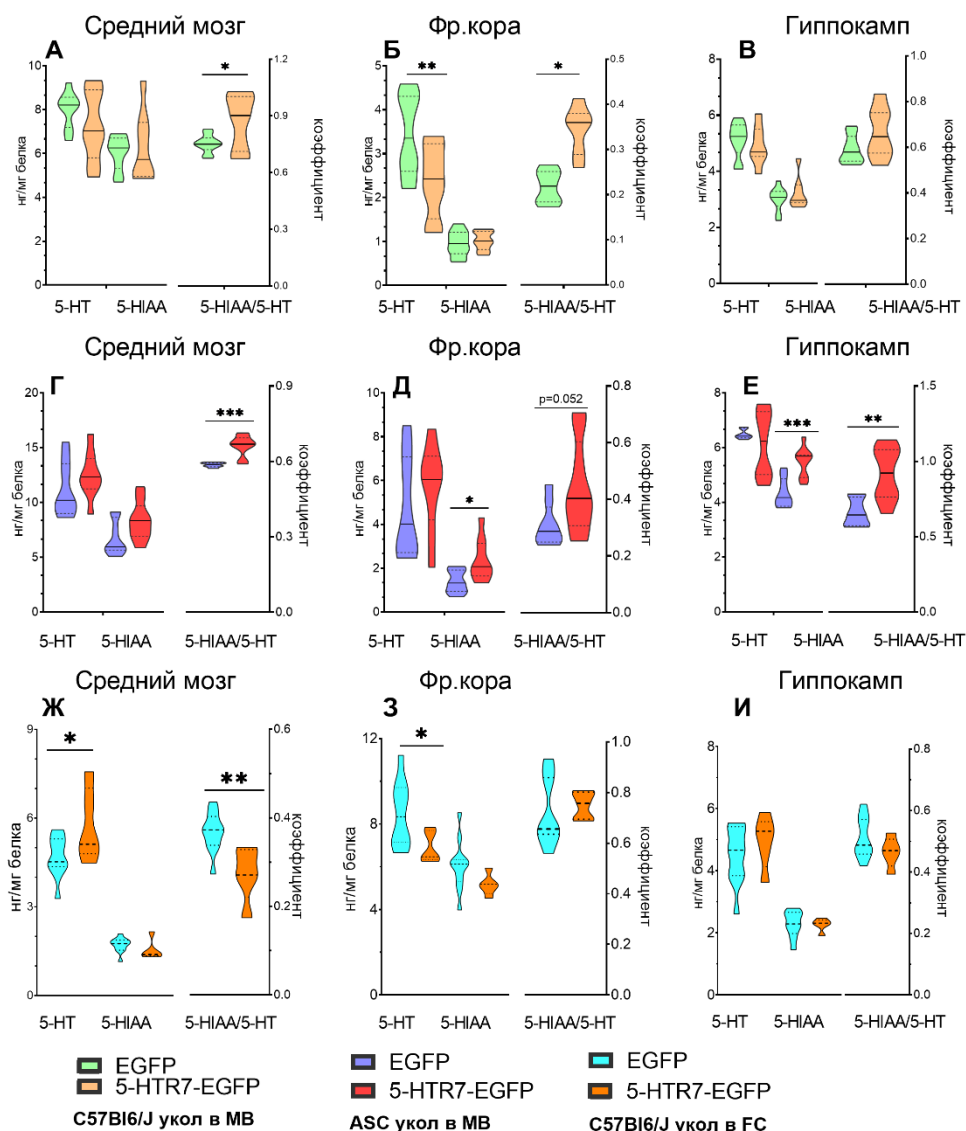


Рисунок 10. Уровень 5-НТ, 5-ГИУК и коэффициента метаболизма серотонина 5-ГИУК/5-НТ в среднем мозге, во фронтальной коре и гиппокампе при сверхэкспрессии 5-НТ7 рецепторов в среднем мозге мышей линии C57Bl/6J (А, Б, В), ASC (Г, Д, Е) и во фронтальной коре мышей линии C57Bl/6J (Ж, З, И). * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

В целом результаты настоящего исследования хорошо согласуются с нашими общими представлениями о 5-НТ7/5-НТ1А гетеродимер-зависимом снижении ингибирующего влияния 5-НТ1А ауторецепторов на метаболизм 5-НТ, а также с предположением о роли 5-НТ1А/5-НТ7 гетеродимеризации в регуляции депрессивного поведения (Naumenko et al., 2014; Popova et al., 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Rodnyy, Alexander Ya.**; Kondaurova, Elena; Bazovkina, Daria; Kulikova, Elisabeth A.; Ilchibaeva, Tatiana; Kovetskaya, Alexandra I.; Baraboshkina, Irina A.; Bazhenova, Ekaterina; Popova, Nina; Naumenko, Vladimir. // Serotonin 5-HT₇ receptor overexpression in raphe nuclei area produces antidepressive effect and affects brain serotonin system in male mice. // J Neurosci Res. 2022 Jul; 100(7):1506-1523.
2. Elena M. Kondaurova, **Alexander Ya. Rodnyy**, Tatiana V. Ilchibaeva, Anton S. Tsybko, Dmitry V. Eremin, Yegor V. Antonov, Nina K. Popova and Vladimir S. Naumenko. // Genetic Background Underlying 5-HT_{1A} Receptor Functioning Affects the Response to Fluoxetine // International Journal of Molecular Sciences — 2020. — 21(22), 8784
3. Elena M. Kondaurova, Alexandra V. Plyusnina, Tatiana V. Ilchibaeva, Dmitry V. Eremin, **Alexander Ya. Rodnyy**, Yulia D. Grygoreva and Vladimir S. Naumenko. // Effects of a CC2D1A/Freud-1 Knockdown in the Hippocampus on Behavior, the Serotonin System, and BDNF // INT J MOL SCI 2021
4. **А.Я. Родный**, Е. А. Куликова, Е. М. Кондаурова, В. С. Наumenko. // Серотониновые 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT₇ рецепторы в мозге мышей линии BTBR – модели аутизма // Нейрохимия — 2021. — Том 38, № 1, с. 1–9.
5. **А.Я. Родный**, И. И. Белокопытова, Е. В. Антонов, В. С. Наumenko, Е. М. Кондаурова. // Исследование пластичности серотониновой системы мозга с помощью рекомбинантных линий мышей, несущих 1473G-аллель гена триптофангидроксилазы-2 и различающихся дистальным фрагментом хромосомы 13, содержащим ген, кодирующий 5-HT_{1A} рецептор. Нейрохимия. — 2020. — том 37, № 4, с. 338–349
6. **A.Rodnyy**, N. Khotskin, Y. Antonov, E. Kondaurova, E. Kulikova, V. Naumenko. // Effect of 5-HT_{1A} receptor gene overexpression in hippocampus on behavior and neuroplasticity in BTBR mice – animal model of autism // European Neuropsychopharmacology — 2020. — Vol. 40, Suppl. 1, November 2020, Pages S75-S76
7. Vladimir Naumenko, **Alexander Rodnyy**, Nikita Khotskin, Yegor Antonov, Elena Kondaurova, Elisabeth Kulikova. On the behavior and 5-HT_{1A} receptor functioning in the brain of BTBR mice – The animal model of autism // IBRO Reports. — 2019. — Volume 6, Supplement, September 2019, Page S225
8. Влияние сверхэкспрессии 5-HT₇ рецептора в среднем мозге на депрессивноподобное поведение и серотониновую систему мозга у мышей / **Родный А.Я.**, Ильчибаева Т.В., Базовкина Д.В., Куликова Е.А., Наumenko В.С. // 25-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века»
9. Effects of *Htr7* Gene Overexpression in Midbrain Followed Prolonged Ethanol Exposure on Behavior and Brain 5-Ht System of C57bl/6j Mice / **A.Ya. Rodnyy**, A.S. Oreshko, T.V Ilchibaeva, D.V. Bazovkina, V.S. Naumenko / III международная конференция «Volga Neuroscience Meeting 2021»
10. Сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора в области ядер шва оказывает антидепрессивный эффект и влияет на серотониновую систему мозга у мышей / **А.Я. Родный**, Т.В. Ильчибаева, Е.А. Куликова, Д.В. Базовкина, В.С. Наumenko / VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых:

биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2021 OpenBio

11. Эффект сверхэкспрессии гена *Htr7* в среднем мозге на пластичность серотониновой системы мозга у мышей линии ASC - генетической модели депрессии / **Родный АЯ**, Барабошкина ИА, Ильчибаева ТВ, Антонов ЕВ, Куликова ЕА, Базовкина ДВ, Науменко ВС. / VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020 OpenBio
12. Влияние сверхэкспрессии гена 5-HT7 рецепторов в мозге мышей, содержащихся в условиях сокращенной длины светового дня на пластичность серотониновой системы мозга / **А.Я. Родный**, Е.М. Кондаурова, Т.В. Ильчибаева, Е.В. Антонов, В.С. Науменко / VI Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2019 OpenBio

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

5-НТ	Серотонин
5-НТР	5-Гидрокситриптофан
5-НТТ	Мембранный транспортер серотонина
<i>Slc6a4</i>	Ген, кодирующий 5-НТТ
ТПГ-2	Триптофангидроксилаза-2
<i>Tph2</i>	Ген, кодирующий ТПГ-2
5-НТ1А	Рецептор серотонина 1А подтипа
<i>Htr1a</i>	Ген, кодирующий 5-НТ1А рецептор
5-НТ7	Рецептор серотонина 7 типа
<i>Htr7</i>	Ген, кодирующий 5-НТ7 рецептор
ГАМК	Гамма-аминомасляная кислота
AAV	Аденоассоциированный вирус
EGFP	Зеленый флуоресцентный белок
ЦНС	Центральная нервная система
GPCR	Рецептор, связанный с G-белком
BDNF	Нейротрофический фактор мозга
СИОЗС	Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина