

КЕТАМИН СНИЖАЕТ ПРОЯВЛЕНИЕ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО ПОВЕДЕНИЯ, ВЫЗВАННОЕ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА

© 2025 г. У. С. Дрозд¹, *, Е. В. Сухарева¹, В. В. Булыгина¹, Т. С. Калинина^{1, 2},
Н. Н. Дыгало^{1, 2}, Д. А. Ланшаков^{1, 2, **}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: drozd@bionet.nsc.ru

**E-mail: lanshakov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.11.2024 г.

После доработки 23.01.2025 г.

Принята к публикации 07.03.2024 г.

Гиппокамп – одна из структур головного мозга, функции и морфология которого нарушены при депрессии. Быстро действующий антидепрессант кетамин восстанавливает эти нарушения, однако механизмы его действия до сих пор не полностью изучены. Оптогенетическая стимуляция глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа крыс с предварительным введением векторов, экспрессирующих светочувствительный каналородопсин, привела к проявлению признака депрессивно-подобного поведения – увеличению времени неподвижности в тесте “подвешивание за хвост”, по сравнению с контрольными животными. Иммуногистохимический анализ экспрессии белка раннего ответа c-Fos в области CA1 гиппокампа подтвердил активацию пирамидных нейронов под действием света, выявляя их участие в проявлении депрессивно-подобного поведения. Введение субанастетической дозы кетамина предотвратило проявление признака депрессивно-подобного поведения, вызванного оптогенетической активацией глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа и отменило индуцированное оптостимуляцией увеличение уровня мРНК c-fos. Таким образом, мы впервые продемонстрировали способность кетамина снижать проявление признака депрессивно-подобного поведения, вызванное оптогенетической стимуляцией активности глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа. В целом, результаты свидетельствуют о важной роли глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа в регуляции психоэмоциональных поведенческих реакций и их чувствительность к введению кетамина.

Ключевые слова: дорсальный гиппокамп, глутаматергические нейроны, область CA1, оптогенетика, каналородопсин, кетамин, депрессивно-подобное поведение, тест подвешивание за хвост, белок c-Fos

DOI: 10.31857/S1027813325010065, **EDN:** DJLMKZ

ВВЕДЕНИЕ

Большое депрессивное расстройство (БДР) – это серьезное психическое заболевание, характеризующееся стойким снижением настроения, утратой интереса к жизни и чувством безысходности. БДР может приводить к нарушению социальной адаптации и в тяжелых случаях становится причиной суицидальных мыслей и действий [1]. Депрессия является ведущей причиной инвалидности и смертности во всем мире. В 2019 г. БДР было диагностировано у 280 млн человек [2]. Несмотря на то, что последние десятилетия множество ученых по всему миру изучают депрессию,

ее клеточные и молекулярные основы до сих пор остаются не до конца ясными [3]. Симптомы БДР, такие как склонность к негативному мышлению, обусловлены изменениями в объеме, активности и связях областей и сетей мозга, отвечающих за эмоциональную значимость, обработку вознаграждений, мотивацию и исполнительные функции [1].

Гиппокамп – одна из основных структур головного мозга, которые могут участвовать в развитии депрессии. У людей с БДР [4] и у грызунов в моделях хронического стресса наблюдается уменьшение объема гиппокампа [5], который восстанавливается после лечения антидепрессантами [6–7].

В частности, антагонист NMDA-рецепторов кетамин, антидепрессантные свойства которого были открыты не так давно, восстанавливает объем и функциональную коннективность гиппокампа у людей, больных депрессией [8–9]. На животных моделях было показано, что кетамин усиливает синаптическую потенциацию в гиппокампе через увеличение уровня белка нейротрофического фактора мозга (BDNF) [10–13]. Однако до сих пор ведутся дискуссии о том, как именно кетамин осуществляет этот эффект. Некоторые результаты свидетельствуют о том, что кетамин увеличивает высвобождение глутамата, блокируя NMDA-рецепторы на тормозных нейронах. Усиление активности нейронов приводит к высвобождению BDNF, что, в свою очередь, активирует опосредованный mTOR процесс синаптогенеза [14]. Другие данные свидетельствуют в пользу того, что кетамин ингибитирует активность киназы эукариотического фактора элонгации 2K (eEF2K), блокируя поступление Ca^{2+} через NMDA-рецепторы, которые активируются спонтанной глутаматергической синаптической передачей. Это способствует быстрой трансляции определенных белков, включая BDNF [11–12]. В целом можно предположить, что кетамин оказывает воздействие на молекулярном и синаптическом уровнях в гиппокампе, что позволяет компенсировать изменения в нейронах, которые происходят при депрессии.

Для того чтобы определить, как именно происходит нарушение функций нейронных сетей гиппокампа, которое наблюдается при депрессии и восстанавливается после лечения кетамином, необходимо учитывать его структурно-функциональные особенности. В структуре гиппокампа можно выделить несколько областей: аммонов рог (CA1–4), субикулюм и зубчатую извилину (DG). Каждая из этих областей выполняет свою функцию, имеет свои особенности в образовании связей с другими областями мозга, а также свой уникальный профиль экспрессии генов. Ввиду этого каждая из областей гиппокампа может выполнять разные роли в патогенезе депрессии. Область CA1 является одной из тех, что образует обширные связи с другими структурами головного мозга и в тоже время получает входящие сигналы из области CA3 по коллатералям Шаффера и по темпороаммоническому пути из энторинальной коры [15]. Таким образом, нарушения баланса возбуждения и торможения в гиппокампе может приводить к изменению исходящих сигналов из области CA1. В модели депрессии, которая была вызвана хроническим непредсказуемым стрессом, наблюдалось нарушение нейропластичности как в синапсах коллатералей Шаффера, так и темпороаммонического пути [16–17]. В то же время остается неясным, как активность глутаматергических нейронов области CA1 гиппокампа влияет на проявление депрессивно-подобного

состояния. Ответ на этот вопрос усложняется наличием функциональных различий между дорсальным и вентральным гиппокампом. Так, преобладает мнение, что дорсальный гиппокамп участвует в пространственной навигации и памяти, а вентральный гиппокамп модулирует поведение, связанное с настроением, в особенности с тревожностью [18–20]. Тем не менее, как показано в клинических исследованиях, когнитивный дефицит является одним из центральных симптомов БДР [21], что указывает на потенциально важную роль и дорсального гиппокампа в развитии депрессии. Несколько исследований на грызунах продемонстрировали вовлеченность дорсального гиппокампа в регуляцию тревожного и депрессивно-подобного поведения [22–24], однако понимание происходящих при этом процессов далеко от завершения. В нашей работе мы использовали прямую оптогенетическую стимуляцию активности глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа для оценки их роли в проявлении признака депрессивно-подобного поведения в тесте “подвешивание за хвост”. Предварительное введение кетамина за 1 ч до оптостимуляции позволило продемонстрировать способность этого быстродействующего антидепрессанта отменять вызванные оптогенетическим воздействием поведенческие эффекты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В экспериментах использовали взрослых, 2,5–3-месячных самцов крыс линии Wistar, весом 220–250 г. Животные содержались в конвенциональном виварии ИЦиГ СО РАН по 4 особи в клетках (40 × 25 × 15 см) в условиях свободного доступа к воде и корму, при 12-часовом цикле свет/темнота и температуре 20–22°C. Все процедуры проводились в соответствии с Международными Европейскими биоэтическими стандартами (86/609-EEC), Российскими правилами работы над лабораторными животными (№ 267 от 19.06.2003) и были разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (Протокол 151 от 28.04.2023). Все манипуляции с животными проводились между 9 и 13 ч.

Наработка вирусных векторов. Для оптогенетической активации глутаматергических нейронов были наработаны вирусные векторы на основе плазмид, созданных группой К. Дейсерот, полученных из репозитария Addgen (США). Культивирование клеток HEK293 проводили в соответствии с общепринятыми протоколами [25]. Для получения AAV частиц смешанного 1–2-го серотипа клетки трансфицировали эквимолярной смесью плазмид для сборки вируса (pDP1 и pDP2) и плазмидой pAAV-CAMKIIα-ChR2(H134R)-EYFP (#26969-, Addgen, США), содержащей пос-

ледовательность светочувствительного каналородопсина ChR2(H134R), сшитого с флуоресцентным белком EYFP, под контролем промотора CAMKII α , специфичного для глутаматергических нейронов. В качестве контрольного вектора использовали pAAV-CAMKII α -EGFP (#50469-, Addgen, США), содержащий зеленый флуоресцентный белок EGFP, под контролем того же промотора. Затем полученные вирусные частицы очищали на гепарин-сепарозных колонках и концентрировали при помощи центрифужных концентраторов Millipore до титра 10¹¹ частиц/мл [26–28].

Введение вирусных частиц в гиппокамп. Животных наркотизировали авертином в дозе 0,2 г/кг, фиксировали в стереотаксической раме и через проделанное бором отверстие в черепе вводили 1 мкл вирусных частиц при помощи микрошприца Hamilton neuros (США) в течение 7 мин. Координаты введения вирусных векторов: AP = -3,3 мм, ML = 2 мм, DV = 2,9 мм [29]. Разрез на скальпе зашивали и обрабатывали стрептоцидом, внутрибрюшинно вводили 100 мкл комбинированного антибиотика фирмы ПанЭко, содержащего 500 Ед пенициллина и 500 мкг стрептомицина.

Вживление оптоволоконной канюли. Через неделю после введения вирусных частиц в область дорсального гиппокампа стереотаксически вживляли оптоволоконные канюли (Торлабс, США) в расширенное до диаметра канюли отверстие в черепе. Далее проводили постоперационную обработку, как и после введения вирусов.

Оптоактивация в тесте “подвешивание за хвост”. Через неделю после вживления оптоволоконных канюль проводили 2 эксперимента. В первом эксперименте исследовали влияние оптоактивации глутаматергических нейронов на проявление признака депрессивно-подобного поведения — время неподвижности в тесте “подвешивание за хвост” (рис. 1а). Для проведения теста оптоволоконный кабель (Торлабс, США) подсоединяли к канюлю, после чего животных подвешивали за основание хвоста на высоте 60 см от пола на металлический стержень при помощи клейкой ленты на 6 мин. Использованная система оптоактивации 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 оптоактивация гиппокампа синим светом (480 нм, 1,2 мВ/мм², 20 Гц), а на 1-й, 3-й и 5-й минуте теста оптоактивация не производилась. Оценку поведения по видеозаписи проводили независимые исследователи, незнакомые с протоколом воздействий и групповой принадлежностью оцениваемых животных.

Во втором эксперименте исследовали влияние кетамина на эффекты оптоактивации стимуляции гиппокампа (рис. 1б). Для этого за 1 ч до

оптоактивации и теста половине животных из каждой группы (с оптоактивационным вектором или с контрольным) внутрибрюшинно был введен кетамин (НовосибоБлфарм, Россия) в субанастетической дозе (15 мг/кг), а другой половине — физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,5 мл/100 г). Далее оптоактивация и тест проводились как в первом эксперименте.

Определение уровня мРНК c-fos. Через час после оптоактивации и теста у животных после быстрой декапитации собирали образцы гиппокампа для анализа уровня мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Суммарную РНК выделяли с помощью одностадийной кислой фенольной экстракции [28]. Для обратной транскрипции отбирали только образцы РНК с отношением OD 260/280, близким к 2,0. Для получения кДНК 3 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 (рН 8,3), 3 мМ MgCl₂, 75 мМ KCl, 10 мМ DTT). Перед началом реакции смесь РНК, Oligo(dT)₁₅ праймера и воды прогревали при 70°C в течение 10 мин. 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 (Thermo Fisher Sci, США). 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 (Thermo Fisher Sci, США). ПЦР в реальном времени состояла из 1 цикла при 50°C в течение 2 мин и 95°C в течение 10 мин, за которыми следовали 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. Расчет уровня мРНК *c-fos* относительно бета-актина в качестве эндогенного контроля проводили по методу ddCT в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fisher Sci, США).

Иммуногистохимическое определение белка c-Fos. Через час после оптоактивации и теста животных наркотизировали авертином и транскардиально последовательно перфузировали 1x PBS и 4% параформальдегидом (PFA). Извлеченный мозг постфиксировали 12 ч в 4% PFA, затем сутки в 30% сахарозе, после чего замораживали в геле Richard-Allan Scientific Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при температуре -70°C.

Срезы толщиной 20 мкм были изготовлены на криотоме Microm HM 550 (Carl Zeiss,

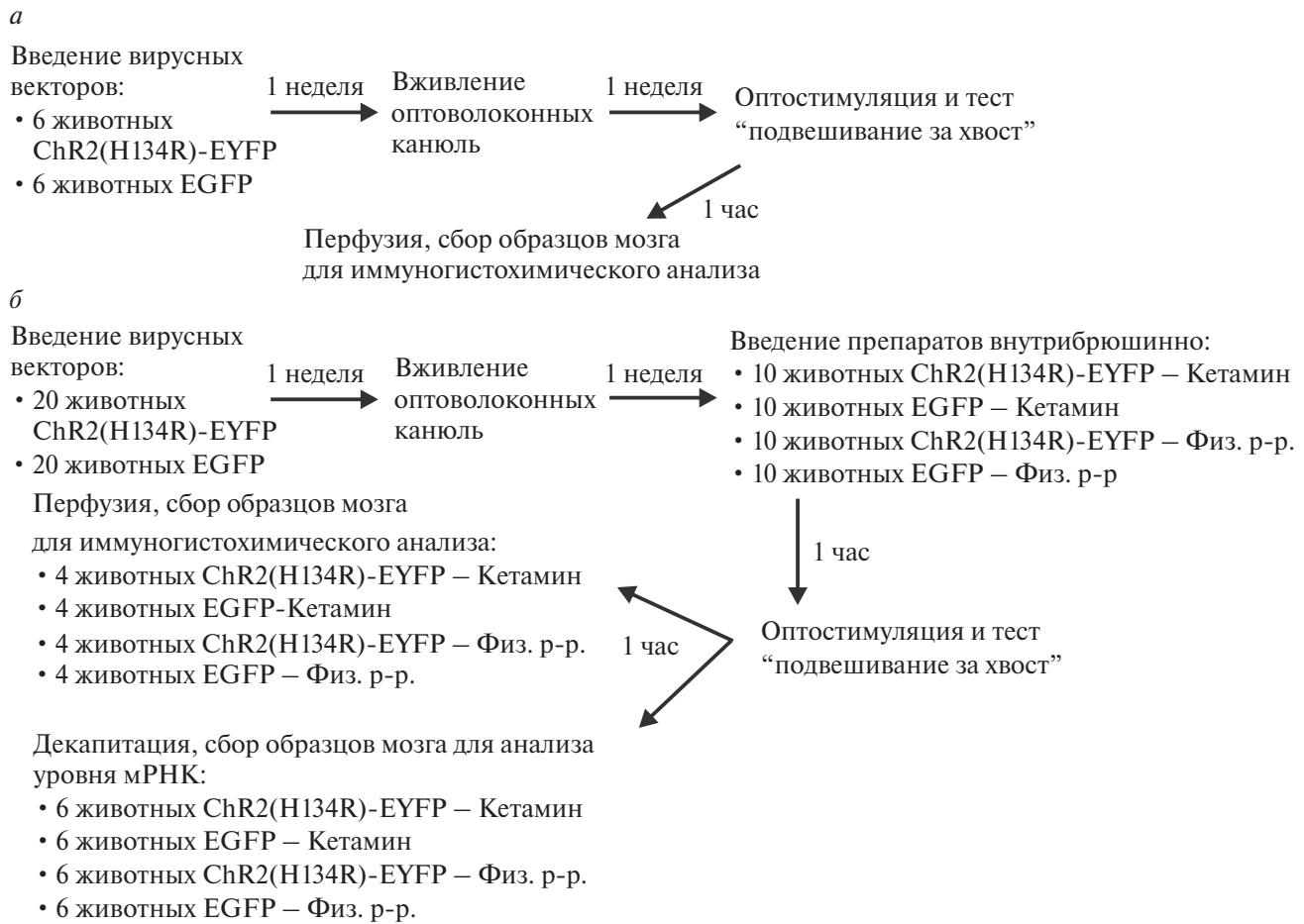


Рис. 1. Схемы экспериментов: *а* – исследование влияния оптогенетической активации глутаматергических нейронов на проявление депрессивно-подобного поведения; *б* – исследование влияния кетамина на эффекты оптогенетической стимуляции гиппокампа.

Германия), каждый 10-й срез монтировали на стекла Superfrost plus (Термо, США) по 6 штук на каждое животное. Препараты промывали 10 мин в PBS с 0.2% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в течение часа в 1.5% BSA, разведенного в 0.2% PBST. С первичными антителами (9F6, Rabbit, Cell Signaling) 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 мин в PBS с 0.2% тритоном и инкубировали с вторичными антителами (711-166-152, Cy3 AffiniPure F(ab') Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:500 в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем дважды промывали в PBST и заключали в среду с мовиолом и ядерным красителем DAPI.

Окрашенные антителами препараты фотографировали с помощью конфокального микроскопа LSM780NLO (Carl Zeiss, Германия) при 20x

увеличении, далее производили анализ фотографий с помощью программы ZEN (Carl Zeiss, Германия). При этом подсчитывалась средняя интенсивность флуоресценции красного сигнала, отражающая уровень белка c-Fos, или нормированное на 1 mm² количество клеток, экспрессирующих белок раннего ответа c-Fos.

Статистический анализ. По количественным данным рассчитывалось среднее значение со стандартным отклонением от среднего. Для проверки нормальности распределения был использован тест Колмогорова–Смирнова. Показатели поведенческого теста обрабатывали двухфакторным дисперсионным анализом для повторных измерений (факторы: вектор, оптоактивация, кетамин), а результаты анализа экспрессии мРНК и иммуногистохимического анализа экспрессии белков – однофакторным или двухфакторным дисперсионным анализом (факторы: вектор, кетамин) с последующим апостериорным сравнением по Фишеру. Статистически значимым результат считали при $p < 0,05$. Статистические расчеты проводили

в пакете программ STATISTICA 10.0. На графиках данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптоактивация глютаматергических нейронов гиппокампа индуцировала проявление признака депрессивно-подобного поведения. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил статистически значимые влияния факторов Вектор ($F_{1,18} = 8,30$; $p < 0,01$), Оптоактивация ($F_{1,18} = 5,75$; $p < 0,05$) и Минута теста (повторяющееся измерение, $F_{2,36} = 11,71$; $p < 0,001$). В периоды без оптоактивации неподвижность в тесте “подвешивание за хвост” 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 teste ($p = 0,35$). Однако у животных с экспрессией ChR2(H134R)-EYFP при стимуляции светом наблюдалось значительное увеличение времени неподвижности ($p < 0,05$) (рис. 2a). Таким образом, можно заключить, что оптоактивация глютаматергических нейронов дорсального гиппокампа провоцировала проявление признака депрессивно-подобного поведения.

Для подтверждения активации нейронов при оптоактивации белок раннего ответа c-Fos был выявлен иммуногистохимически в CA1 области дорсального гиппокампа. Оптоактивация приводила к увеличению средней интенсивности красного флуоресцентного сигнала, соответствующего иммуногистохимической окраске c-Fos, у животных, нейроны которых были чувствительны к свету, по сравнению с группой, экспрессирующей EGFP ($F_{1,9} = 7,26$; $p < 0,05$, рис. 2б–г). Увеличение экспрессии c-Fos после

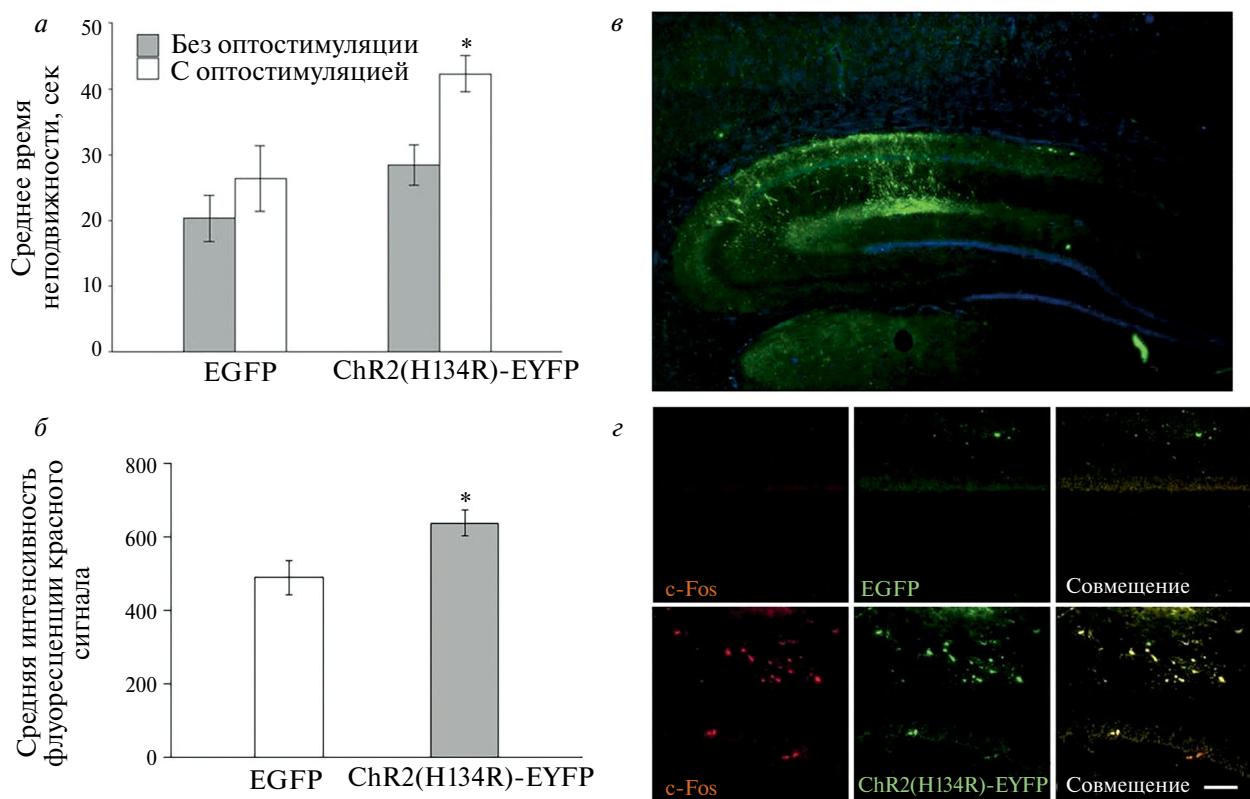


Рис. 2. *a* – Среднее время неподвижности за 3 минуты оптоактивации и без таковой в teste “подвешивание за хвост”; * – $p < 0,05$ по сравнению группами ChR2(H134R)-EYFP – без оптоактивации и EGFP – с оптоактивацией; *б* – средняя интенсивность красного флуоресцентного сигнала, соответствующего иммуногистохимической окраске c-Fos, в области CA1 дорсального гиппокампа после оптоактивации глютаматергических нейронов дорсального гиппокампа; * – $p < 0,05$ 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 оптоактивации глютаматергических нейронов дорсального гиппокампа в teste “подвешивание за хвост”; шкала – 100 мкм.

оптостимуляции свидетельствует об активации экспрессирующих ChR2(H134R)-EYFP нейронов.

Быстрый антидепрессант кетамин снижал проявление признака депрессивно-подобного поведения, вызванное оптостимуляцией дорсального гиппокампа. Введение субанастетической дозы кетамина за 1 ч до оптостимуляции нивелировало проявление признака депрессивно-подобного поведения в teste “подвешивание за хвост”. В периоды теста, когда оптостимуляция не проводилась, поведение животных с фоточувствительными нейронами не отличалось от поведения животных с экспрессией EGFP ($F_{1,22} = 0,55$; $p = 0,47$). 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 усиление депрессивных проявлений ($F_{1,22} = 7,04$; $p < 0,05$). Однако введение кетамина полностью устранило этот эффект ($F_{1,22} = 7,92$; $p < 0,01$) (рис. 3 a). Таким образом, проявление признака депрессивно-подобного поведения, вызванное

оптостимуляцией глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа, отменялось субанастетической дозой кетамина.

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 ($F_{1,16} = 12,62$; $p < 0,01$). Оптоактивная стимуляция 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. 3 б). Определение количества экспрессирующих белок *c-Fos* нейронов в CA1 гиппокампа методом иммуногистохимии показало 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. 3 в, г).

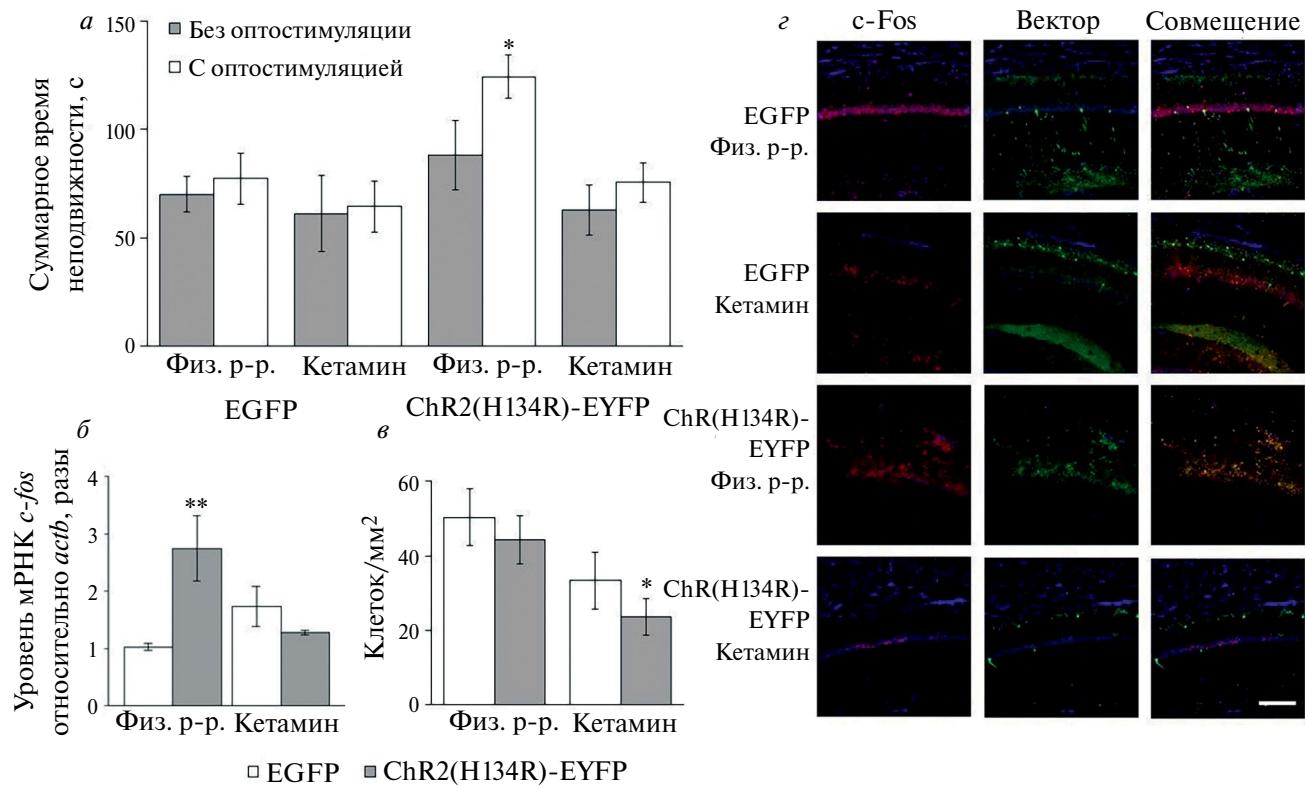


Рис. 3. а – Суммарное время неподвижности за 3 мин оптостимуляции и без таковой в teste “подвешивание за хвост” через 1 ч после введения кетамина; * – $p < 0,05$ по сравнению со всеми группами с оптостимуляцией; EGFP – Физ. р-р., EGFP – Кетамин, ChR2(H134R)-EYFP – Кетамин; б – уровень мРНК *c-fos* в 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 флуоресцентного вектора EGFP или ChR2(H134R)-EYFP в области CA1 дорсального гиппокампа после введения кетамина и оптостимуляции; шкала – 200 мкм.

Следовательно, кетамин отменял вызванное опто-стимуляцией глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа увеличение экспрессии *c-fos* в этих нейронах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дорсальный гиппокамп рассматривается исследователями прежде всего как ключевая структура мозга, обеспечивающая пространственную навигацию и процессы запоминания [30]. Например, хемогенетическое подавление активности глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа значительно нарушало восстановление объектной памяти в задаче спонтанного распознавания объектов и пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, но в тоже время не влияло на двигательную активность в тесте “открытое поле” [31]. Полученные в нашей работе результаты убедительно свидетельствуют о важной регуляторной роли дорсального гиппокампа также в проявлении психоэмоциональных поведенческих реакций. Оптоизогенетическая стимуляция глутаматергических нейронов дорсального гиппокампа вызывала проявление признака депрессивно-подобного поведения, выраженное в увеличении времени неподвижности в тесте “подвешивание за хвост”. Выявленное иммуногистохимически увеличение экспрессии белка *c-Fos*, которое отражает модификацию активности нейронов, в области CA1 дорсального гиппокампа после стимуляции светом подтвердило эффективность оптоизогенетического воздействия. Вовлеченность дорсального гиппокампа в регуляцию тревожного и депрессивно-подобного поведения косвенно предполагалась в ряде работ [22–24]. В частности, интересны результаты исследований влияния нокдауна генов каналов HCN в дорсальном гиппокампе на тревожное и депрессивно-подобное поведение. Каналы HCN1–4 активируются гиперполяризацией мембранны и обуславливают ионный ток, который необходим для управления ритмической активностью в нейронных цепях, а также влияет на несколько основных компонентов нейронной обработки, таких как мембранные потенциалы покоя, дендритная интеграция и синаптическая передача [32]. Нокдаун *Hcn1* в пирамидных нейронах области CA1 дорсального гиппокампа снижал тревожное и депрессивно-подобное поведение в тестах открытого поля, крестообразного лабиринта и вынужденного плавания соответственно [33]. Следовательно, повышенная активность пирамидных нейронов области CA1 скорее всего должна приводить к обратному эффекту. Эти исследования демонстрируют участие дорсального гиппокампа в регуляции психоэмоциональных состояний, но не дают окончательного ответа о роли активности глутаматергических нейронов области CA1 в проявлении

данных форм поведения. В свою очередь, в нашей работе впервые продемонстрировано, что оптоизогенетическая активация этих нейронов вызывает проявление признака депрессивно-подобного поведения.

Важность этого результата обусловлена тем, что экспериментальные и клинические исследования последних лет и, прежде всего, удивительно быстрые антидепрессантные эффекты глутаматергических препаратов, например кетамина, выдвинули глутаматергическую нейротрансмиссию на ведущую роль в обеспечении нормальных и патологических психоэмоциональных проявлений [34]. Для анализа возможного механизма обнаруженного в работе поведенческого эффекта оптоизогенетической стимуляции пирамидных нейронов области CA1 дорсального гиппокампа было предпринято исследование поведенческих и нейрохимических эффектов оптоизогенетической стимуляции этих нейронов на фоне блокады NMDA рецепторов кетамином.

Полученные нами данные свидетельствуют, что субанестетическая доза кетамина предотвращает проявление признака депрессивно-подобного поведения в тесте “подвешивание за хвост”, которое вызывается оптоизогенетической стимуляцией. Оптоизогенетическое воздействие в этом эксперименте повышало экспрессию 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 отменяет вызванное оптоизогенетической стимуляцией увеличение уровня мРНК *c-fos* и снижает экспрессию этого белка в нейронах в CA1 области дорсального гиппокампа у животных с введением каналородопсина. Эти данные могут указывать на то, что в основе механизма действия кетамина и механизма развития депрессивно-подобного состояния, вызванного оптоизогенетической стимуляцией, лежит активация перекрывающихся групп нейронов.

Другие исследования показывают, что кетамин усиливает синаптическую пластичность в гиппокампе уже через 30 мин после введения и для этого требуется синтез белков, экспрессия *Bdnf*, функционирование киназы eEF2 и увеличение экспрессии рецепторов AMPA в синапсах [35–36]. 1-часовое воздействие 1 мкМ кетамина на срезы гиппокампа увеличивало популяционные спайки тел пирамидных нейронов области CA1, но не влияло на разрядную активность в синапсах между коллатеральами Шаффера и нейронами области CA1, что свидетельствует об усилении возбудимости пирамидных клеток без воздействия AMPA рецепторов [37]. Хотя эти исследования указывают на то, что кетамин усиливает активность пирамидных нейронов гиппокампа, в них не уточняется, на какой части гиппокампа были получены результаты. Вместе с тем активность нейронов *in vitro* и *in vivo* может различаться. Более того, чувствительность

NMDA-рецепторов к кетамину зависит от уровня активности нейронов. Так, при депрессии, вызванной стрессом ограничения подвижности, кетамин блокировал NMDA-рецепторы в латеральной хабенуле, где активность нейронов была высокой, но не на пирамидных нейронах гиппокампа, поскольку их активность была снижена. В то же время усиление активности пирамидных нейронов в области CA1 гиппокампа как хемогенетически, так и путем обучения условно-рефлекторному замиранию приводило NMDA-рецепторы в состояние, свободное от ионов Mg^{2+} и чувствительное к блокаде кетамином [38]. Полученные нами результаты демонстрируют схожий эффект: кетамин оказывает влияние на продолжительность замирания в тесте “подвешивание за хвост” у животных, активность глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа которых была оптогенетически усиlena. Таким образом, снижение экспрессии *c-fos* в этих нейронах можно объяснить увеличившейся чувствительностью NMDA-рецепторов к кетамину после оптостимуляции.

В то же время очевидно, что влияние активации пирамидных нейронов дорсального гиппокампа на психоэмоциональное состояние организма опосредовано через проекционные области этой структуры. Дорсальный гиппокамп имеет эfferенты в латеральных областях миндалины, важной для регуляции психоэмоциональных реакций структуры [30]. Изменение экспрессии регуляторных белков апоптоза, а также нейротрофических факторов в этой структуре связано с изменением данного типа поведения [39–40]. Оптогенетическая активация пирамидных нейронов области CA1 дорсального гиппокампа усиливала оксигенацию крови центрального гиппокампа, зарегистрированную с помощью фМРТ на мышах [20]. Так, как центральный гиппокамп чаще всего модулирует поведение, связанное с настроением, такое как стресс и тревожность [18], по-видимому, совместная активация и работа этих двух частей гиппокампа также может оказывать влияние на это поведение. Поскольку кетамин отменял вызванное оптостимуляцией дорсального гиппокампа проявление признака депрессивно-подобного поведения, вероятно, что в механизме развития этого состояния и в механизме антидепрессантного действия кетамина задействованы либо те же нейроны, на которые оказывалось оптогенетическое воздействие, либо проекционные области этих нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые продемонстрирована значимость глутаматергических нейронов области CA1 дорсального гиппокампа в патогенезе депрессивных расстройств. Оптогенетическая стимуляция этих нейронов привела к проявлению признаков

депрессивно-подобного поведения, что сопровождалось увеличением экспрессии *c-fos*, свидетельствующей о активации нейронов. Предварительное введение кетамина отменяло эти изменения, что указывает на потенциальную вовлеченность нейронных сетей CA1 области дорсального гиппокампа не только в развитие депрессивно-подобного состояния, но также в антидепрессантный эффект кетамина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЦКП микроскопического анализа ИЦиГ СО РАН, где были получены конфокальные изображения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0023.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены и разрешены биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН (протокол № 19 от 26.11.2013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hasin D.S., Sarvet A.L., Meyers J.L., Saha T.D., Ruan W.J., Stohl M., Grant B.F.* // *JAMA Psychiatry*. 2018. V. 75. P. 336.
2. *Vos T., Lim S.S., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi M., Murray C.J.L.* // *The Lancet*. 2020. V. 396. P. 1204–1222.
3. *Page C.E., Epperson C.N., Novick A.M., Duffy K.A., Thompson S.M.* // *Mol. Psychiatry*. 2024. P. 1–12.
4. *Belleau E.L., Treadway M.T., and Pizzagalli D.A.* // *Biol. Psychiatry*. 2019. V. 85. P. 443–453.
5. *Thompson S.M.* // *Neuropsychopharmacology*. 2023. V. 48. P. 90–103.
6. *Planchez B., Surget A., Belzung C.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. V. 50. P. 88–95.
7. *Deyama S. and Kaneda K.* // *Neuropharmacology*. 2023. V. 224. P. 109335.
8. *Zhang F., Wang C., Lan X., Li W., Ye Y., Liu H., Hu Z., You Z., Zhou Y., Ning Y.* // *J. Affect. Disord.* 2023. V. 325. P. 534–541.
9. *Evans J.W., Graves M.C., Nugent A.C., Zarate C.A.* // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. P. 4538.
10. *Garcia L.S.B., Comim C.M., Valvassori S.S., Réus G.Z., Barbosa L.M., Andreazza A.C., Stertz L.*,

- Fries G.R., Gavioli E.C., Kapczinski F., Quevedo J. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008. V. 32. P. 140–144.*
11. *Kavalali E.T. Monteggia L.M. // Neuron. 2020. V. 106. P. 715–726.*
 12. *Kim J.-W., Suzuki K., Kavalali E. T., Monteggia L.M. // Annu. Rev. Med. 2024. V. 75. P. 129–143.*
 13. *Shaburova E.V. Lanshakov D.A. // Integr. Physiol. 2020. V. 1. P. 75–77.*
 14. *Li N., Lee B., Liu R.-J., Banasr M., Dwyer J.M., Iwata M., Li X.-Y., Aghajanian G., and Duman R. S. // Science. 2010. V. 329. P. 959–964.*
 15. *Bienkowski M.S., Bowman I., Song M.Y., Gou L., Ard T., Cotter K., Zhu M., Benavidez N.L., Yamashita S., Abu-Jaber J., Azam S., Lo D., Foster N.N., Hintiryan H., and Dong H.-W. // Nat. Neurosci. 2018. V. 21. P. 1628–1643.*
 16. *Kvarta M.D., Bradbrook K.E., Dantrassy H.M., Bailey A.M., Thompson S.M. // J. Neurophysiol. 2015. V. 114. P. 1713–1724.*
 17. *Qiao H., An S.-C., Ren W., Ma X.-M. // Behav. Brain Res. 2014. V. 275. P. 191–200.*
 18. *Hong I., Kaang B.-K. // Genes Brain Behav. 2022. V. 21. № 7. P. e12826.*
 19. *Levone B.R., Moloney G.M., Cryan J.F., O'Leary O.F. // Neurobiol. Stress. 2021. V. 14. P. 100331.*
 20. *Takata N., Yoshida K., Komaki Y., Xu M., Sakai Y., Hikishima K., Mimura M., Okano H., and Tanaka K.F. // PLOS ONE. 2015. V. 10. P. e0121417.*
 21. *Meinert S., Nowack N., Grotegerd D., Repple J., Winter N.R., Abheiden I., Enneking V., Lemke H., Waltemate L., Stein F., Brosch K., Schmitt S., Meller T., Pfarr J.-K., Ringwald K., Steinsträter O., Gruber M., Nenadić I., Krug A., Leehr E. J., Hahn T., Thiel K., Dohm K., Winter A., Opel N., Schubotz R.I., Kircher T., and Dannlowski U. // Mol. Psychiatry. 2022. V. 27. P. 1103–1110.*
 22. *McLaughlin R.J., Hill M.N., Morrish A.C., Gorzalka B.B. // Behav. Pharmacol. 2007. V. 18. P. 431.*
 23. *Günther A., Luczak V., Gruteser N., Abel T., Bumann A. // Genes Brain Behav. 2019. V. 18. P. e12550.*
 24. *Sun D., Milibari L., Pan J.-X., Ren X., Yao L.-L., Zhao Y., Shen C., Chen W.-B., Tang F.-L., Lee D., Zhang J.-S., Mei L., and Xiong W.-C. // Biol. Psychiatry. 2021. V. 89. P. 600–614.*
 25. *Shaburova E.V. Lanshakov D.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. P. 890–898.*
 26. *Lanshakov D.A., Drozd U.S., Zapara T.A., Dygalo N.N. // Russ. J. Genet. Appl. Res. 2017. V. 7. P. 266–272.*
 27. *McClure C., Cole K.L.H., Wulff P., Klugmann M., Murray A.J. // J. Vis. Exp. JoVE. 2011. P. 3348.*
 28. *Lanshakov D., Shaburova E., Bulygina V., Drozd U., Larionova I., Gerashchenko T., Shnaider T., Denisov E.V., and Kalinina T. // PeerJ. V. 12. P. 1–29.*
 29. *Paxinos G., Watson C. // The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / Elsevier, 1982.*
 30. *Grigoryan G., Segal M. // Neural Plast. 2016. V. 2016. P. 1–10.*
 31. *Cinalli Jr. D.A., Cohen S.J., Calubag M., Oz G., Zhou L., Stackman Jr. R.W. // Hippocampus. 2023. V. 33. P. 6–17.*
 32. *He C., Chen F., Li B., Hu Z. // Prog. Neurobiol. 2014. V. 112. P. 1–23.*
 33. *Kim C.S., Chang P.Y., Johnston D. // Neuron. 2012. V. 75. P. 503–516.*
 34. *Kim J., Kim T.-E., Lee S.-H., Koo J.W. // Clin. Psychopharmacol. Neurosci. 2023. V. 21. P. 429–446.*
 35. *Autry A.E., Adachi M., Nosyreva E., Na E.S., Los M.F., Cheng P., Kavalali E. T., Monteggia L.M. // Nature. 2011. V. 475. P. 91–95.*
 36. *Nosyreva E., Szabla K., Autry A.E., Ryazanov A.G., Monteggia L.M., Kavalali E.T. // J. Neurosci. 2013. V. 33. P. 6990–7002.*
 37. *Izumi Y., Zorumski C.F. // Neuropharmacology. 2014. V. 86. P. 273–281.*
 38. *Chen M., Ma S., Liu H., Dong Y., Tang J., Ni Z., Tan Y., Duan C., Li H., Huang H., Li Y., Cao X., Lingle C.J., Yang Y., and Hu H. // Science. 2024. V. 385. P. eado7010.*
 39. *Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., Kalinina T.S., Agarina N.P., Dygalo N.N. // Cell. Mol. Neurobiol. 2018. V. 38. P. 281–288.*
 40. *Lanshakov D.A., Sukhareva E.V., Bulygina V.V., Bannova A.V., Shaburova E.V., Kalinina T.S. // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 8092.*

Ketamine Reverses Depressive-Like Behavior Induced by Optogenetic Stimulation of Glutamatergic Neurons in the Dorsal Hippocampus

U. S. Drozd¹, E. V. Sukhareva¹, V. V. Bulygina¹, T. S. Kalinina^{1, 2},
N. N. Dygalo^{1, 2} and D. A. Lanshakov^{1, 2}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

The hippocampus is one of the brain structures whose functions and morphology are impaired in depression. The fast-acting antidepressant ketamine reverses these impairments, but the mechanisms of its action are still not fully understood. Optogenetic stimulation of glutamatergic neurons in the CA1 region of the dorsal hippocampus of rats with the preliminary introduction of vectors expressing photosensitive channelrhodopsin led to the manifestation of a sign of depressive-like behavior – an increase in the time of immobility in the tail suspension test, compared to control animals. Immunohistochemical analysis of the expression of the early response protein c-Fos in the CA1 region of the hippocampus confirmed the activation of pyramidal neurons under the influence of light, revealing their involvement in the development of depressive-like behavior. Administration of a subanesthetic dose of ketamine prevented the manifestation of depressive-like behavior trait induced by optogenetic activation of glutamatergic neurons in the CA1 region of the dorsal hippocampus and abolished the increase in *c-fos* mRNA levels induced by optical stimulation. Thus, we demonstrated for the first time the ability of ketamine to reverse depressive-like behavior trait induced by optogenetic stimulation of the activity of dorsal hippocampal glutamatergic neurons. Overall, the results indicate the important role of dorsal hippocampal glutamatergic neurons in the regulation of psychoemotional behavioral responses and their sensitivity to ketamine administration.

Keywords: *dorsal hippocampus, glutamatergic neurons, CA1 region, optogenetics, channelrhodopsin, ketamine, depressive-like behavior, tail suspension test, c-Fos protein*