

**Ewa Bączyńska**

**Rola szlaku sygnałowego zależnego od receptora 5-HT<sub>7</sub>  
w rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Biofizyki Komórki  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**  
**Prof. dr hab. Jakub Włodarczyk**

**PROMOTOR POMOCNICZY:**  
**Dr Monika Bijata**

Warszawa, rok 2022

---

Na powstanie niniejszej rozprawy doktorskiej miało wpływ wiele osób,  
którym w tym miejscu chciałabym podziękować.

Przede wszystkim Promotorowi **Prof. dr hab. Jakubowi Włodarczykowi**  
dziękuję za opiekę merytoryczną podczas realizacji rozprawy doktorskiej,  
za wszystkie cenne uwagi, za przekazaną mi wiedzę, pomoc oraz wsparcie.  
Dziękuję także za ciągłą motywację do rozwoju naukowego.

Chciałabym również podziękować **dr Monice Bijacie**  
za cenne wskazówki podczas wykonywania pracy naukowej,  
jak również za okazaną mi życzliwość, wsparcie i nieustanną inspirację do rozwoju naukowego.

**Koleżankom i Kolegom z Pracowni Biofizyki Komórki**  
za wspaniałą atmosferę pracy a w szczególności  
**dr Marcie Magnowskiej i dr. Adamowi Krzystyniakowi**  
a także **Krystianowi Bijacie** za inspiracje i cenne uwagi.

Dziękuję także **Narodowemu Centrum Nauki** za możliwość realizacji własnego projektu  
Grant Preludium UMO-2017/27/N/NZ3/02417,  
dzięki któremu mogłam doskonalić się naukowo.

Podziękowania składam również **Mojej Rodzinie - Mamie, Robertowi, Lidce i Basi**,  
którzy zawsze przy mnie byli, zarówno w tych dobrych, jak i trudnych chwilach pracy naukowej.

**Pracę doktorską pragnę zadedykować mojej najukochańszej Mamie**,  
która zawsze ze zrozumieniem, cierpliwością i niezłomną wiarą we mnie  
dawała mi siłę i inspirację do samorealizacji i rozwoju naukowego.

---

<b>WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	5
<b>STRESZCZENIE</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. WSTĘP</b> .....	10
1.1. Plastyczność synaptyczna .....	10
1.1.1. Plastyczność strukturalna kolców dendrytycznych .....	12
1.1.2. Metody badania struktury kolców dendrytycznych .....	14
1.2. Receptory serotoniny .....	17
1.2.1. Receptor 5-HT <sub>7</sub> .....	19
1.3. Depresja .....	22
1.3.1. Zaburzona plastyczność synaptyczna w depresji .....	23
1.3.2. Szlak sygnałowy zależny od receptora 5-HT <sub>7</sub> .....	25
1.4. Rezyliencja na rozwój zachowań depresyjnych .....	27
1.5. Zwierzęce modele zachowań typu depresyjnego .....	28
<b>2. HIPOTEZA I CEL PRACY</b> .....	31
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b> .....	32
3.1. Stosowane odczynniki chemiczne .....	32
3.2. Wektory wirusowe .....	33
3.3. Tkanka ludzka <i>post mortem</i> .....	34
3.4. Zwierzęta .....	34
3.4.1. Dootrzewnowe zastrzyki u myszy .....	35
3.4.2. Mysi model chronicznego nieprzewidywalnego stresu .....	36
3.4.2.1. Podanie leku antydepresyjnego w modelu chronicznego nieprzewidywalnego stresu .....	39
3.4.3. Operacje stereotaktyczne .....	39
3.5. Testy behawioralne .....	40
3.5.1. Test podwieszania za ogon (TST) .....	40
3.5.2. Test preferencji sacharozy (SPT) .....	41
3.5.3. Test wymuszonego pływania (FST) .....	42
3.5.4. Test otwartego pola (OF) .....	42
3.6. Techniki biochemiczne .....	42
3.6.1. Elektroforeza białek w żelu denaturującym .....	42
3.6.2. Technika western blot .....	43
3.6.3. Zymografia żelowa .....	44

---

3.6.4. Test aktywności CDC42.....	45
3.7. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym .....	46
3.8. Badanie struktury kolców dendrytycznych.....	46
3.8.1. Znakowanie neuronów metodą biolistyczną .....	46
3.8.2. Obrazowanie kolców dendrytycznych.....	47
3.8.3. Analiza struktury kolców dendrytycznych .....	48
3.9. Analiza statystyczna .....	49
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>51</b>
4.1. Stymulacja 5-HT <sub>7</sub> R indukuje zależne od MMP-9 zachowania typu depresyjnego u myszy ...	51
4.2. Chroniczny stres prowadzi do rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy.....	52
4.3. Szlak sygnałowy zależny od 5-HT <sub>7</sub> R aktywowany jest w hipokampie myszy poddanych ekspozycji na chroniczny stres.....	55
4.4. Podwyższona aktywność MMP-9 w hipokampie osób cierpiących na depresję.....	56
4.5. Aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT <sub>7</sub> R w wyniku ekspozycji na chroniczny stres prowadzi do zburzonej plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa.....	57
4.6. Chroniczny stres prowadzi do zróżnicowanych zmian strukturalnych w drzewku apikalnym i bazalnym komórek piramidowych w hipokampie myszy .....	59
4.7. Obniżenie ekspresji genu <i>htr7</i> w hipokampie przed ekspozycją na chroniczny stres zapobiega rozwojowi anhedonii u myszy.....	63
4.8. Obniżenie ekspresji genu <i>htr7</i> w hipokampie myszy przed ekspozycją na chroniczny stres prowadzi do zmian strukturalnych kolców dendrytycznych .....	64
<b>5. DYSKUSJA .....</b>	<b>66</b>
<b>6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....</b>	<b>79</b>
<b>7. OPUBLIKOWANE PRACE NAUKOWE.....</b>	<b>80</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>82</b>
<b>9. PROGRAMY DO ANALIZY STRUKTURY KOLCÓW DENDRYTYCZNYCH.....</b>	<b>117</b>

---

---

## WYKAZ SKRÓTÓW

**5-HT** – serotonina

**5-HT<sub>7</sub>R** – receptor serotoninowy 5-HT<sub>7</sub>

**5-HT<sub>7</sub>R KO** – zwierzęta pozbawione ekspresji receptora 5-HT<sub>7</sub>

**5-HT<sub>7</sub>R shRNA** – krótkie RNA tworzące strukturę typu spinki o sekwencji wyciszającej i komplementarnej do receptora 5-HT<sub>7</sub>R

**AAV** – wektor wirusowy AAV (ang. *adeno-associated virus*)

**AMPA** – kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy

**APS** – nadsiarczan amonu

**ANH** – myszy anhedoniczne (ang. *anhedonic*)

**BDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*)

**BSA** – albumina surowicy bydłowej (ang. *bovine serum albumin*)

**CA1** – pole 1 rogu Amona hipokampa (łac. *cornu ammonis 1*)

**CA3** – pole 3 rogu Amona hipokampa (łac. *cornu ammonis 3*)

**cAMP** – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan

**CDC42** – białko kontrolujące podział komórek 42 (ang. *cell division cycle 42*)

**CDC42-GTP** – białko CDC42 związane z GTP

**CRS** – chroniczny stres unieruchomienia (ang. *chronic restraint stress*)

**CSDS** – chroniczny stres socjalny (ang. *chronic social defeat stress*)

**CUS** – chroniczny nieprzewidywalny stres (ang. *chronic unpredictable stress*)

**DiI** – nadchloran 1,10-dioktadecylo-3,3,3,30-tetrametyloindokarbocyaniny

**DG** – zakręt zębaty (łac. *gyrus dentatus*)

**ERK** – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinase*)

**EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

**FST** – test wymuszonego pływania (ang. *forced swimming test*)

---

**GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

**GFP** – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)

**GPCR** – receptory sprzężone z białkami G (ang. *G protein-coupled receptors*)

**GTPaza** – guanozyno-5'-trifosfataza, enzym pośredniczący w hydrolizie GTP do GDP

**HEPES** – kwas N-2-hydroksyetylo-piperazyno-N'-2-etanosulfonowy

**HRP** – peroksydaza chrzanowa

**MMP-9 KO** – zwierzęta pozbawione ekspresji MMP-9

**KTR** – grupa kontrolna

**LTP** – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long term potentiation*)

**LP** – roztwór specyficznego agonisty 5-HT<sub>7</sub>

**MMP-2** – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2

**MMP-9** – metaloproteaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9

**NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy

**DMSO** – dimetylosulfotlenek

**OF** – test otwartego pola (ang. *open field test*)

**SSRIs** – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

**PFA** – paraformaldehyd

**PBS** – buforowana sól fizjologiczna (ang. *phosphate buffered saline*)

**PVDF** – membrana z polifluorku winylidenu

**S100β** – białko astrocytarne (ang. *S100 calcium binding protein β subunit*)

**SB** – bufor obciążający do SDS-PAGE (ang. *sample buffer*)

**scr shRNA** – krótkie RNA tworzące strukturę typu spinki o sekwencji niekomplementarnej do kwasów nukleinowych w obrębie komórki (ang. *scramble RNA*)

**SDS** – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

**SDS-PAGE** – elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

---

**SEM** – błąd standardowy średniej (ang. *standard error of the mean*)

**shRNA** – krótkie RNA tworzące strukturę typu spinki (ang. *short hairpin RNA*)

**SPT** – test preferencji sacharozy (ang. *sucrose preference test*)

**SPT0** – test preferencji sacharozy przed CUS (ang. *sucrose preference test*)

**SPT1** – test preferencji sacharozy po CUS (ang. *sucrose preference test*)

**SPT2** – test preferencji sacharozy po leczeniu antydepresyjnym ketaminą (ang. *sucrose preference test*)

**RT-qPCR** – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*)

**RES** – myszy odporne, rezylienne (ang. *resilient*)

**Rac1** – substrat 1 toksyny botulinowej C3 spokrewniony z białkami Ras (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

**RhoA** – białko A z rodziny białek homologicznych do Ras (ang. *Ras homolog gene family, member A*)

**TBS** – sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris (ang. *Tris-buffered saline*)

**TIMP-1** – tkankowy inhibitor metaloproteaz 1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*)

**TEMED** – N’N’N’N’-tetrametylenodiamina

**tPA** – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *tissue plasminogen activator*)

**Tris** – 2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol

**TST** – test podwieszania za ogon (ang. *tail suspension test*)

---

## STRESZCZENIE

Depresja jest globalnym problemem medycznym często prowadzącym do samobójstw. Przyjmuje się, że objawy depresyjne pojawiają się w wyniku nieprawidłowej pobudzającej plastyczności synaptycznej powstałej po przewlekłym stresie. Plastyczność synaptyczna to zdolność neuronów do modulowania siły połączeń synaptycznych charakteryzująca się zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych, na których zlokalizowane są synapsy pobudzające. Niedawno odkryto, że aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od receptora serotoninowego (5-HT<sub>7</sub>R) prowadzi do nieprawidłowej strukturalnej i funkcjonalnej plastyczności synaptycznej w neuronach hipokampa *in vitro*. Jednakże nie zbadano jeszcze, czy szlak ten istnieje *in vivo* i jaka jest jego rola.

Stosując kombinację metod behawioralnych, biochemicznych i obrazowania, wykazano, że szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R jest aktywowany w hipokampie myszy i leży u podstaw fenotypu depresyjnego. Ponadto, otrzymane wyniki potwierdziły, że aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R jest także powiązana ze zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych zwierząt anhedonicznych. Zwierzęta rezylienne nie wykazywały wspomnianych zmian biochemicznych i strukturalnych w hipokampie podkreślając specyficzność obserwacji. Co więcej, wdrożenie procedury przewlekłego nieprzewidywalnego stresu z lokalnym wyciszeniem ekspresji genu *htr7* w regionie CA1 hipokampa pozwoliło odkryć, że wyciszenie 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie jest wystarczające, aby zapobiec rozwojowi anhedonii.

Uzyskane wyniki opisują kluczową rolę 5-HT<sub>7</sub>R w powstawaniu zachowań typu depresyjnego oraz zmian w strukturze kolców dendrytycznych. Przeprowadzone badania ukazują 5-HT<sub>7</sub>R jako potencjalny molekularny punkt uchwytu przyszłych farmakoterapii promujących mechanizmy rezyliencji związanej ze stresem.



---

## ABSTRACT

Depression is a global medical problem frequently leading to suicides. It is assumed that depressive symptoms occur as a result of aberrant excitatory synaptic plasticity developed after chronic stress. Synaptic plasticity is an ability of neurons to modulate the strength of synaptic connections manifested by structural alterations of dendritic spines on which excitatory synapses are located. Recently discovered activation of the serotonin type 7 receptor (5-HT<sub>7</sub>R)-dependent signaling pathway leads to aberrant structural and functional synaptic plasticity in the hippocampal neurons *in vitro*. However, whether this signaling pathway exists *in vivo* or not and what its role is, it has not yet been investigated.

Using a combination of behavioral, biochemical, and imaging methods, it has been demonstrated that the 5-HT<sub>7</sub>R-dependent signaling pathway is activated in the murine hippocampus and underlies the depressive-like phenotype. Additionally, the results confirmed that the activation of the 5-HT<sub>7</sub>R-dependent signaling pathway is associated with the structural remodeling of dendritic spines of anhedonic animals. The stress-resilient animals did not display the aforementioned biochemical and structural alterations indicating the specificity of the obtained results. Moreover, the implementation of the chronic unpredictable stress procedure with specific silencing of *htr7* gene expression in the CA1 hippocampal subregion enabled to discover that silencing of 5-HT<sub>7</sub>R in the hippocampus is sufficient to prevent the development of anhedonia.

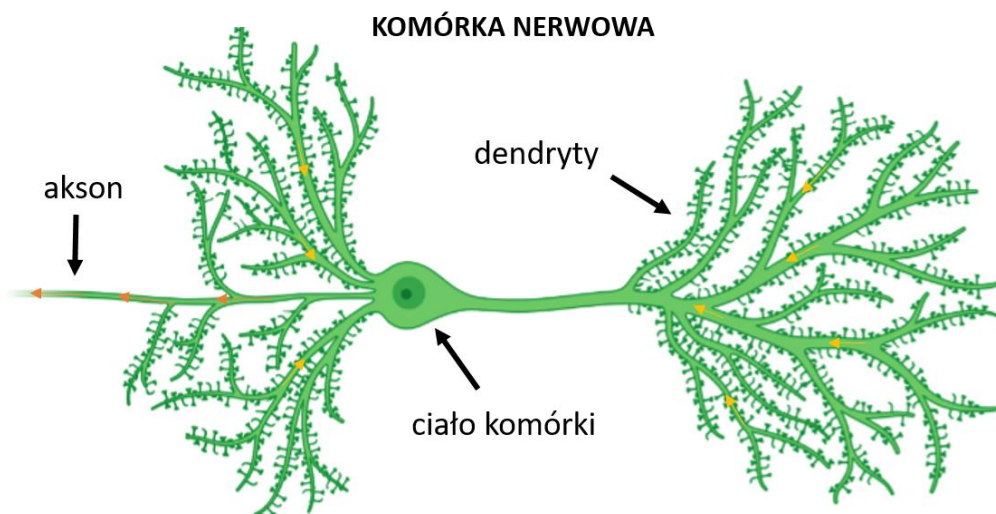
The obtained results point out a crucial role of 5-HT<sub>7</sub>R in the pathogenesis of depressive-like behavior and the dendritic spine structure as a possible decisive molecular target for promoting stress resilience in future pharmacotherapies.

---

## 1. WSTĘP

### 1.1. Plastyczność synaptyczna

Podstawową jednostką funkcjonalną układu nerwowego jest komórka nerwowa (neuron), która zbudowana jest z ciała komórki i dwóch rodzajów wypustek: pojedynczego aksonu oraz licznych dendrytów /Rycina 1/. Akson służy do przekazywania informacji do innych komórek nerwowych, podczas gdy dendryty odpowiedzialne są za przyjmowanie informacji. Informacja (impuls nerwowy) przesyłana między komórkami nerwowymi odbywa się za pośrednictwem struktur zwanych synapsami [Harris i Weinberg, 2012].

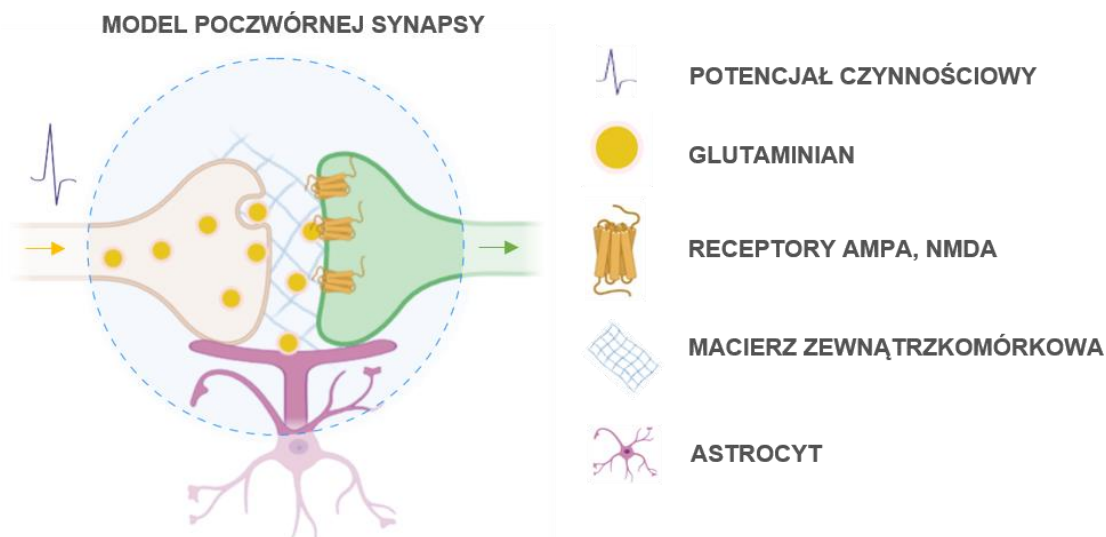


**Rycina 1. Schemat komórki nerwowej** zbudowanej z ciała komórki, pojedynczego aksonu oraz licznych dendrytów, na których zlokalizowane są błonowe wypustki. Pomarańczowe i żółte strzałki wskazują kierunek przekazywania informacji. Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com.

Plastyczność synaptyczna jest jedną z głównych cech ośrodkowego układu nerwowego. Jest to zdolność komórek nerwowych do reorganizacji sieci połączeń synaptycznych na skutek działania bodźców środowiskowych. Definicja ta została wprowadzona przez polskiego naukowca – Jerzego Konorskiego [Konorski, 1948]. Proces ten zachodzi w ciągu całego życia organizmu i może przejawiać się na wielu poziomach organizacji biologicznej: od zmian w pojedynczych komórkach nerwowych, do wielkoskalowych rearanżacji sieci połączeń komórkowych. Podstawą neuroplastyczności jest zmiana siły połączeń synaptycznych między komórkami nerwowymi [Pascual-Leone i wsp., 2005; Rakic, 2002].

Ze względu na mechanizm przekazywania impulsu nerwowego synapsy dzieli się na dwa podstawowe rodzaje: synapsy elektryczne oraz synapsy chemiczne. W synapsach elektrycznych impuls jest przekazywany bezpośrednio między komórkami, natomiast w synapsach chemicznych

za pośrednictwem neuroprzebiekaźników, które wiążą się z receptorami zlokalizowanymi w błonie, w tym na błonowych wypustkach tzw. kolcach dendrytycznych. Synapsa zbudowana jest z błony presynaptycznej (część presynaptyczna), składającej się z zakończenia aksonalnego neuronu, szczeliny synaptycznej oraz błony postsynaptycznej (część postsynaptyczna) należącej do komórki, do której impuls nerwowy jest przekazywany. Aktualnie przyjmuje się koncepcję tzw. poczwórnej synapsy, w skład której poza częścią presynaptyczną i postsynaptyczną – wchodzi wypustki astrocytów oraz macierz zewnątrzkomórkowa [Dityatev i wsp., 2011] /Rycina 2/.



**Rycina 2. Schemat przedstawiający koncepcję modelu poczwórnej synapsy.** Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com wzorując się na Rycinie 1 z Dityatev i wsp. (2011).

Mechanizm plastyczności synaptycznej opiera się na powstaniu zmian funkcjonalnych związanych z elektrofizjologicznymi właściwościami synaps oraz zmian strukturalnych związanych z przebudową struktury kolców dendrytycznych. Po wystąpieniu bodźca środowiskowego powstaje potencjał czynnościowy prowadzący do napływu jonów w części presynaptycznej powodując uwolnienie cząsteczek neuroprzebiekaźnika do szczeliny synaptycznej, które następnie wiążą się ze swoistymi receptorami w części postsynaptycznej. Wiązanie to prowadzi do otwarcia kanałów jonowych znajdujących się w gęstości postsynaptycznej kolca dendrytycznego. W przypadku receptorów jonotropowych, które są równocześnie kanałami jonowymi, dzieje się to bezpośrednio po związaniu neuroprzebiekaźnika. Natomiast w przypadku receptorów metabotropowych np. 5-hydroksytryptaminowy receptor 7 (5-HT<sub>7</sub>R), w otwarciu kanału jonowego pośredniczą wtórne przebiekaźniki wewnątrzkomórkowe aktywowane przez białka G (z ang. *G protein-coupled receptor*, GPCR). Następnie w wyniku napływu jonów błona komórkowa ulega depolaryzacji, co prowadzi do zniesienia blokady magnezowej i do otwarcia receptorów jonowych dla kwasu glutaminowego (receptor N-metylo-D-asparaginowy, NMDA), a następnie napływu jonów wapnia.

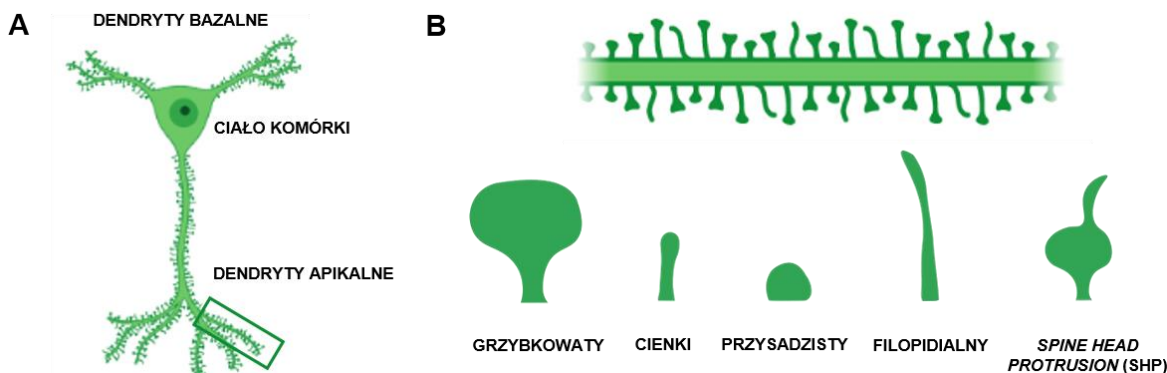
---

Zjawisko to leży u podstaw długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *long term potentiation*, LTP) [Bliss i Lomo, 1973], prowadzącego do wzrostu siły połączeń synaptycznych i wzmocnienia przekazywania sygnału pomiędzy neuronami. Badania wykazały, że LTP wywołuje trwałe zmiany strukturalne i funkcjonalne w komórkach nerwowych, zarówno w części presynaptycznej (wzrost uwalniania neuroprzebieżników), jak i postsynaptycznej (zmiana liczby oraz podjednostek receptorów). Występujące zmiany strukturalne przejawiają się w reorganizacji drzewek aksonalnych, dendrytycznych, jak również w zmianach kształtu i gęstości kolców dendrytycznych [Holtmaat i Svoboda, 2009]. Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne uznawane jest za komórkowy model uczenia i pamięci. Do tej pory LTP zostało najlepiej scharakteryzowane w hipokampie, jednakże występuje również we wszystkich strukturach mózgu [Lynch, 2004; Malenka, 2003].

### **1.1.1. Plastywność strukturalna kolców dendrytycznych**

Większość synaps pobudzających znajduje się na kolcach dendrytycznych będących małymi, ruchliwymi wypustkami błonowymi komórek nerwowych [Bourne i Harris, 2008]. W przeciwieństwie do synaps pobudzających, synapsy hamujące występują głównie na ciałach komórek, trzonach dendrytów oraz początkowych segmentach wypustek aksonalnych. Ze względu na charakterystyczną budowę kolców dendrytycznych znacznie więcej wiadomo o synapsach pobudzających niż hamujących [Harris i Weinberg, 2012; Sheng i Kim, 2011].

Kolce dendrytyczne są strukturami dynamicznymi i mogą zmieniać się samoistnie lub w odpowiedzi na stymulację, zarówno w warunkach fizjologicznych (procesy uczenia i pamięci), jak i patologicznych (choroby neuropsychiatryczne i neurodegeneracyjne) [Bączyńska i wsp., 2021; Chidambaram i wsp., 2019; Fiala i wsp., 2002; Yang i wsp., 2009]. Zmiany te zachodzą w sposób ciągły i utrzymują się nawet w dorosłości [Holtmaat i wsp., 2005; Trachtenberg i wsp., 2002]. Przyjmuje się, że kształt kolca dendrytycznego koreluje z siłą i funkcją synaps, zatem różne typy kształtów kolców dendrytycznych odzwierciedlają różną siłę danego połączenia synaptycznego. W budowie kolca dendrytycznego wyróżnia się szyjkę oraz główkę, na podstawie kształtu których klasyfikuje się kolce do różnych typów, w tym do kolców grzybkowatych, cienkich, przysadzistych, filopodialnych, czy tak zwanych kolców SHP (z ang. *spine head protrusion*), czyli kolców grzybkowatych zawierających dodatkową, cieniłą wypustkę na główce. Różne typy kształtu kolców zostały przedstawione na Rycinie 3.



**Rycina 3. Klasyfikacja kształtu kolców dendrytycznych.** (A) Komórka piramidowa hipokampa zbudowana z ciała komórki i dwóch drzewek dendrytycznych: bazalnego i apikalnego, pokrytych kolcami dendrytycznymi. (B) Fragment dendrytu przedstawiający różne typy kształtu kolców dendrytycznych. Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com wzorując się na Rycinie 2 z Bączyńska i wsp. (2021).

W dojrzałym mózgu około 65% kolców ma kształt grzybkowaty, 20% cienki, a pozostałe typy kształtu kolców stanowią 15% [Roo i wsp., 2008; Zuo i wsp., 2005]. Nowo powstałe kolce są zwykle cienkie z małą główką, często nazywane kolcami niedojrzałymi lub uczącymi się. Kolce te są niestabilne, ale w konsekwencji mają także większy potencjał do zmian plastycznych. Przyjmuje się, że cienkie i filopodialne kolce są prekursorami dojrzałych kolców grzybkowatych, określanymi kolcami pamięciowymi [Bourne i Harris, 2007]. Kolce grzybkowate zbudowane są z cienkiej szyjki i dużej główki, która tworzy gęstość postsynaptyczną (ang. *postsynaptic density*, PSD) zawierającą kanały jonowe, receptory, cząsteczki adhezji komórek, białka cytoszkieletu i inne wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe [Harris i Weinberg, 2012; Sheng i Kim, 2011]. Wielkość główki kolca koreluje z liczbą postsynaptycznych receptorów glutaminianergicznym AMPA (kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy) [Matsuzaki i wsp., 2001; Zito i wsp., 2009]. Dowodów na stabilność tej grupy kolców dostarczyły badania plastyczności strukturalnej *in vivo* wykazujące, że grzybkowate kolce dendrytyczne mogą być stabilne przez miesiące, a nawet lata [Grutzendler i wsp., 2002; Holtmaat i wsp., 2005; Trachtenberg i wsp., 2002].

Kolce filopodialne to grupa kolców, podobna do cienkich kolców stanowiąca niedojrzałe formy kolców dendrytycznych [Kayser i wsp., 2008; Ziv i Smith, 1996]. Należy podkreślić, że pomimo istnienia arbitralnie określonej klasyfikacji kształtów kolców dendrytycznych, a co za tym idzie ich funkcji, kolce tak naprawdę wykazują kontinuum kształtu [Pchitskaya i Bezprozvanny, 2020; Ruszczycki i wsp., 2012; Yuste i Bonhoeffer, 2004].

Podstawą zmian kształtu kolców dendrytycznych jest reorganizacja cytoszkieletu aktynowego, który odgrywa kluczową rolę w tworzeniu, eliminacji i stabilności kolców dendrytycznych, a także w regulacji ich kształtu. Modulacja dynamiki aktyny indukuje zmiany

---

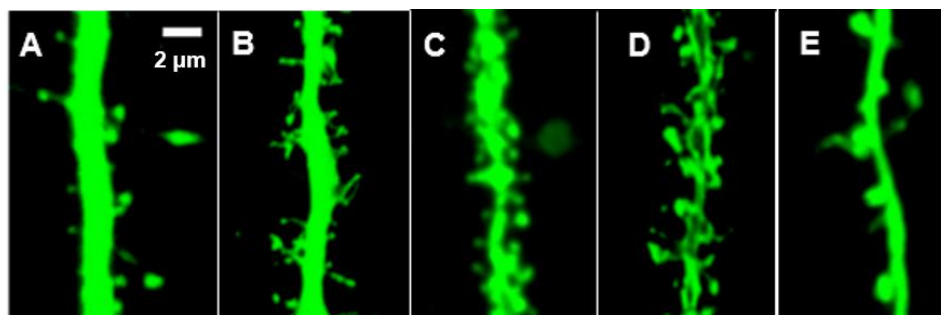
kształtu kolców dendrytycznych, które związane są ze zmianami siły synaptycznej [Hlushchenko i wsp., 2016]. Na poziomie molekularnym istnieje wiele cząsteczek, które regulują polimeryzację i stabilizację aktyny, w tym rodzina małych białek G (Rho GTPazy). Rho GTPazy (Rho, Rac i CDC42) modulują fosforylację między innymi kofiliny, która zarówno wiąże, jak i kontroluje dynamikę filamentów aktynowych, wpływając na strukturę kolców dendrytycznych [Ponimaskin i wsp., 2007; Woolfrey i Srivastava, 2016]. Co ważne, aktywność szlaków sygnałowych regulujących strukturę i funkcję kolców dendrytycznych jest przejściowa i często ograniczona do pojedynczych kolców [Nakahata i Yasuda, 2018]. Dlatego aby scharakteryzować zmiany przestrzenno-czasowe w obrębie szlaków sygnałowych regulujących strukturę kolców dendrytycznych niezbędnym jest zastosowanie podejścia interdyscyplinarnego, uwzględniającego poza obrazowaniem w wysokiej rozdzielczości, analizy biochemiczne i funkcjonalne.

### **1.1.2. Metody badania struktury kolców dendrytycznych**

Struktura kolców dendrytycznych ze względu na swoją dynamikę i bardzo małe rozmiary (rzędu kilku mikrometrów) stanowi duże wyzwanie, zarówno w kontekście obrazowania, jak i ilościowej analizy strukturalnej. Najpopularniejszą techniką stosowaną do wizualizacji kolców dendrytycznych jest fluorescencyjne znakowanie komórek nerwowych, a następnie obrazowanie ich za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej lub mikroskopii wysokorozdzielczej [Bączyńska i wsp., 2021]. Rozdzielczość standardowej mikroskopii świetlnej to około 250 nm w płaszczyźnie bocznej, co pozwala precyzyjnie określić szerokość główki i długość kolca dendrytycznego [Tønnesen i wsp., 2014]. Precyzyjne obrazowanie drobnych szczegółów, takie jak szerokość i długość szyjki kolca dendrytycznego stało się możliwe dopiero dzięki rozwojowi technik mikroskopii wysokorozdzielczej, której rozdzielczość poprzeczna wynosi 20-40 nm [Betzig i Trautman, 1992; Huang i wsp., 2010; Simpson, 2006].

Postęp w obrazowaniu wysokorozdzielczym rozpoczął się wraz z opracowaniem technologii mikroskopii stymulowanej redukcji emisji (ang. *stimulated emission depletion*) [Hell i Wichmann, 1994; Klar i Hell, 1999], a następnie nowych technik, takich jak mikroskopia fotoaktywowanej lokalizacji (ang. *photoactivated localization microscopy*) [Betzig i wsp., 2006], mikroskopia stochastycznej optycznej rekonstrukcji (ang. *stochastic optical reconstruction microscopy*), które umożliwiły detekcje obiektów w nanoskali [Rust i wsp., 2006; Xu i wsp., 2017]. Detekcja wyżej wymienionych parametrów kształtu kolca jest również możliwa przy zastosowaniu sekcyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning electron microscopy*) [Arellano i wsp., 2007; Frotscher i wsp., 2014; Ovtscharoff i wsp., 2008].

Manualna analiza struktury kolców dendrytycznych jest czasochłonna i subiektywna, dlatego mikroskopowe obrazy podlegają analizie z użyciem wyspecjalizowanych bioinformatycznych algorytmów do automatycznej lub półautomatycznej segmentacji kolców dendrytycznych pokrywających dendryty [Mancuso i wsp., 2014; Okabe, 2020; Ruszczycki i wsp., 2012]. Algorytmy te opierają się na binaryzacji obrazu, identyfikacji szkieletu oraz detekcji konturów. Niektóre z tych metod wykorzystują dwuwymiarową (2D) projekcję maksymalnego natężenia obrazu otrzymanego z wykorzystaniem tradycyjnej fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej [Ruszczycki i wsp., 2014]. Jednakże zważywszy na fakt, że kolce dendrytyczne to struktury dynamiczne i trójwymiarowe (3D) niezbędnym jest rozpatrywanie ich kształtu w trzech wymiarach, co wciąż stanowi duże wyzwanie, zarówno z perspektywy obrazowania, jak i analizy obrazu. Narzędzia informatyczne dedykowane do segmentacji całego fragmentu dendrytu pokrytego kolcami dendrytycznymi zwykle nie są w stanie dokładnie modelować, w tym rekonstruować, struktury kolca dendrytycznego w 3D [Basu i wsp., 2018; Swanger i wsp., 2011]. Co więcej, warunki eksperymentalne takie jak chroniczny stres, mogą narażać na dodatkowe problemy techniczne, zarówno w trakcie obrazowania, jak i podczas rekonstrukcji 3D między innymi w związku z obecnością różnego typu artefaktów. Przykładem takich artefaktów może być występowanie nakładających się kolców, obecność cienkich i pofragmentowanych kolców, które były wizualizowane na granicy rozdzielczości mikroskopu, aureola wokół dendrytu, zbyt rozgałęziona struktura pojedynczych kolców dendrytycznych czy wysoka heterogeniczność obserwowanych obiektów wynikająca z zastosowanego modelu eksperymentalnego (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*). Różnorodność obrazów i obecność artefaktów są głównymi przeszkodami w stosowaniu w pełni automatycznych algorytmów segmentacji, dlatego wciąż wiele analiz opiera się na półautomatycznym przetwarzaniu obrazów [Bączyńska i wsp., 2021; Ruszczycki i wsp., 2012]. Przykłady różnych obrazów mikroskopowych kolców dendrytycznych przedstawiono na Rycinie 4.



**Rycina 4. Różnorodność obrazów mikroskopowych przedstawiających fragment dendrytu pokrytego kolcami dendrytycznymi w wykonaniu których zastosowane zostały różne techniki barwienia i wizualizacji.** Kolor zielony został nadany w obróbce obrazu w programie ImageJ. **(A-C)** Obraz konfokalny żywych komórek pierwotnej hodowli hipokampa transfekowanej wektorem plazmidowym niosącym sekwencje białka czerwonej fluorescencji. **(D)** Obraz konfokalny utrwalonych skrawków

---

hipokampa znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym DiI z wykorzystaniem techniki biolistycznej. **(E)** Obraz mikroskopowy z wykonany z wykorzystaniem przyżyciowego przezczaszkowego obrazowania dwufotonowego kory ruchowej oraz wektorów wirusowych AAV (ang. *adeno-associated virus*) zawierających sekwencje białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP) wprowadzonych za pomocą operacji stereotaktycznych. Skala: 2  $\mu\text{m}$ . Rycina utworzona na podstawie Ryciny 3 z Bączyńska i wsp. (2021).

Jednym z rozwiązań mających na celu szybką i obiektywną analizę zmian kształtu kolców dendrytycznych w 2D wydaje się być metoda 2dSpAn [Basu i wsp., 2016] oraz w 3D metoda 3dSpAn [Basu i wsp., 2018]. W zaproponowanych narzędziach bioinformatycznych zdefiniowano parametry opisujące kształt kolca (podstawę kolca, szyjkę i główkę kolca dendrytycznego) stosując do tego standardowe metody matematyczne. Na podstawie wartości tych parametrów kolce dendrytyczne klasyfikowane są do matematycznie zdefiniowanych grup kolców o danym kształcie [Basu i wsp., 2016, 2018; Bączyńska i wsp., 2021; Das i wsp., 2021]. Obecnie najpopularniejszymi narzędziami programowymi do segmentacji i analizy kolców są: SpineMagick (patent nr WO/2013/021001), 2dSpAn [Basu i wsp. 2016], 3dSpAn [Basu i wsp., 2018], Neurolucida [*Neurolucida®* - MBF Bioscience], SpineLab [Jungblut i wsp., 2012], Imaris [*Imaris Filament Tracer*], NeuronIQ [Cheng i wsp., 2007], MetaMorph [MetaMorph Software] oraz NeuronStudio [Wearne i wsp., 2005].

Ostatnio powstały również nowe metody oparte na maszynowym uczeniu do automatycznej segmentacji 3D i analizy kolców dendrytycznych [Smirnov i wsp., 2018; Xiao i wsp., 2018]. Niemniej jednak, głównym ograniczeniem tych metod jest brak odpowiedniej weryfikacji przeprowadzanych analiz wynikających z niewystarczającej ilości manualnie przeanalizowanych kolców dendrytycznych w 3D. Podejścia te wymagają również wieloetapowej nadzorowanej optymalizacji algorytmów, co skutkuje wydłużeniem czasu analizy dużych zestawów danych.

Aby ocenić zmiany kształtu kolców dendrytycznych zazwyczaj porównuje się skład procentowy umownie przyjętych typów kształtu kolców lub bezpośrednio porównuje się poszczególne parametry morfometryczne, takie jak: długość, powierzchnia, szerokość główki kolca. Ponadto aby odzwierciedlić zmiany w przebudowie strukturalnej koców dendrytycznych dość często stosuje się bezwymiarowe parametry takie jak np. stosunek długości kolca do szerokości jego główki. Zmiany w gęstości kolców dendrytycznych ocenia się przez porównanie gęstości liniowej kolców (liczba kolców na długość dendrytu) w różnych warunkach eksperymentalnych [Bączyńska i wsp., 2021]. Analiza gęstości kolców dendrytycznych przeprowadzana jest najczęściej z wykorzystaniem półautomatycznych narzędzi bioinformatycznych i wciąż stanowi wyzwanie ze względu na niejednorodność kształtu dendrytów oraz powstawanie wyżej wymienionych artefaktów wynikających ze specyfiki eksperymentu i technik obrazowania. Precyzyjna kontrola gęstości kolców dendrytycznych i tworzenie nowych synaps ma kluczowe znaczenie

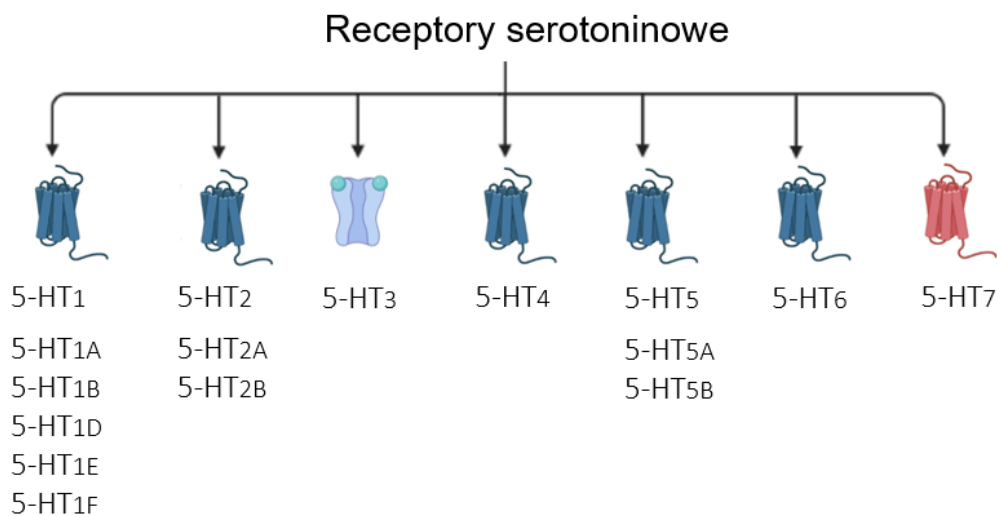


dla fizjologicznych i patologicznych funkcji mózgu. Dlatego też szlaki sygnałowe wpływające na wzrost i przebudowę tych wypustek pozostają przedmiotem szeroko zakrojonych badań.

## 1.2. Receptory serotoninowe

Serotonina (5-HT) jako jeden z najbardziej rozpowszechnionych neurotransmiterów w mózgu reguluje plastyczność synaptyczną przez wiązanie z receptorami serotoninowymi [Dahlström i Fuxe, 1964; Lesch i Waider, 2012; Steinbusch, 1981]. Receptory serotoninowe, nazywane również receptorami 5-HT, stanowią różnorodną grupę białek, w której wyróżnić można siedem klas. W obrębie niektórych klas występują także dodatkowe podtypy, które zostały przedstawione na Rycinie 5.

Aktualna klasyfikacja receptorów związana jest z ich budową, właściwościami farmakologicznymi oraz szlakami sygnałowymi, które są przez nie regulowane. Receptory różnią się między sobą lokalizacją i funkcją, a także powinowactwem do serotoniny [Hoyer i wsp., 2002]. W mózgu receptory 5-HT znajdują się między innymi w hipokampie, korze czołowej, ciele migdałowatym, prążkowie i podwzgórzu [McCorvy i Roth, 2015; Millan i wsp., 2008; Olivier, 2015]. Serotoninowe szlaki sygnałowe regulują procesy autonomiczne, reakcje motoryczne, przetwarzanie sensoryczne, zdolności poznawcze, czy emocje. Z kolei zaburzona plastyczność synaptyczna zależna od receptorów 5-HT związana jest z licznymi chorobami neurodegeneracyjnymi i neuropsychiatrycznymi, w tym schizofrenią, depresją, autyzmem czy zaburzeniami związanymi z nadpobudliwością (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) [McCorvy i Roth, 2015; Olivier, 2015].



**Rycina 5. Klasyfikacja receptorów serotoninowych.** Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com.

---

Receptory serotoniny należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, z wyjątkiem receptora 5-HT<sub>3</sub>, który jest kanałem jonowym bramkowanym ligandem [Berger i wsp., 2009]. Podjednostki białka G modulują aktywność wielu wewnątrzkomórkowych efektorów indukując wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe [Woehler i wsp., 2009]. Na przykład, receptor 5-HT<sub>1</sub> łączy się preferencyjnie z G $\alpha_i$  hamując cyklazę adenylylową, co skutkuje obniżeniem poziomu cyklicznego monofosforanu adenozyliny (cAMP). Z kolei receptory 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> i 5-HT<sub>7</sub> wiążą się z białkiem G $\alpha_s$  i w przeciwieństwie do receptora 5-HT<sub>1</sub> promują tworzenie cAMP poprzez aktywację cyklazy adenylowej [Hoyer i wsp., 2002]. Dodatkowo wykazano, że 5-HT<sub>7R</sub> może łączyć się z białkami G $\alpha_{12}$  oraz że receptor 5-HT<sub>4</sub> łączy się z G $\alpha_{13}$ , następnie aktywując małe Rho GTPazy [Kvachnina i wsp., 2005; Ponimaskin i wsp., 2002]. Co ciekawe, szacuje się, że około 50% wszystkich nowoczesnych leków reguluje aktywność GPCR [George i wsp., 2002].

Szlaki sygnałowe zależne od receptorów 5-HT mogą być także regulowane poprzez liczne modyfikacje potranslacyjne, w tym między innymi fosforylacje, glikozylacje, czy palmitoilacje [Millan i wsp., 2008]. Na przykład, długotrwała stymulacja receptorów 5-HT prowadzi do fosforylacji receptorów za pomocą kinazy białkowej A, kinazy białkowej C, czy kinaz GRK (ang. *G protein-coupled receptor kinases*) [Ferguson, 2001; Freedman i Lefkowitz, 1996; Gehret i Hinkle, 2010; Krupnick i Benovic, 1998]. Glikozylacja związana jest z transportem i internalizacją do błony między innymi receptora 5-HT<sub>5A</sub> [Dutton i wsp., 2008]. Z kolei palmitoilacja moduluje desensytyzację i endocytozę receptorów 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>7</sub> [Bouvier i wsp., 1995; Mumby, 1997; Ross, 1995]. Co ciekawe, palmitoilacja receptora 5-HT<sub>1A</sub> jest niezbędna do oddziaływania z białkiem G $\alpha_i$  [Kobe i wsp., 2008; Papoucheva i wsp., 2004; Woehler i wsp., 2009], podczas gdy brak palmitoilacji receptorów 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>7</sub> zmienia ich konformację prowadząc do konstytutywnej aktywacji białek G $\alpha_s$  [Kvachnina i wsp., 2009; Ponimaskin i wsp., 2005].

Powyższe przykłady ukazują niewielki fragment tego jak wysoce zorganizowany jest system molekularny sygnalizacji zależnej od receptorów 5-HT i jak subtelne zmiany mogą aktywować różne szlaki wewnątrzkomórkowe. Co więcej, w ostatnich latach szczególną uwagę naukowców skupiają szlaki sygnałowe zależne od receptorów 5-HT, regulujące kształt kolców dendrytycznych [Bijata i wsp., 2017; Schill i wsp., 2020]. Jak opisano wyżej zmiany w strukturze kolców dendrytycznych leżą u podstaw uczenia i licznych zaburzeń neurologicznych [Bączyńska i wsp., 2021]. Dokładne poznanie szlaków sygnałowych zależnych od receptorów 5-HT może przyczynić się do stworzenia nowych selektywnych ligandów, specyficznie ukierunkowanych na indukowanie zmian w strukturze kolców dendrytycznych. Niemniej jednak, badania te są na wczesnym etapie rozwoju.

---

### 1.2.1. Receptor 5-HT<sub>7</sub>

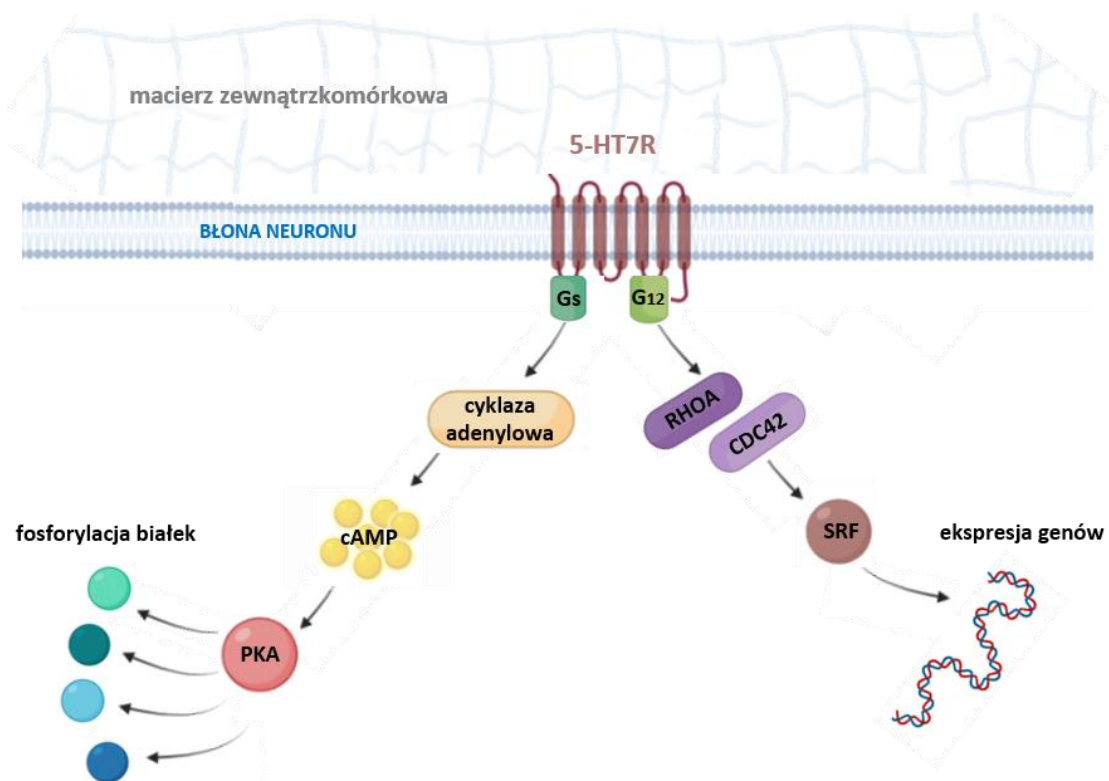
Wśród wielu receptorów serotoninowych w ostatnich latach spore zainteresowanie naukowców skupia się wokół 5-HT<sub>7</sub>R, który po raz pierwszy został opisany przez trzy niezależne grupy w 1993 roku [Bard i wsp., 1993; Lovenberg i wsp., 1993; Ruat i wsp., 1993]. Receptor ten występuje powszechnie w ośrodkowym układzie nerwowym, natomiast jego największą ekspresję zidentyfikowano w mózgu, w szczególności we wzgórzu, hipokampie, jądrach szwu i jądrze nadskrzyżowaniowym, a także w rdzeniu kręgowym [Dogrul i Seyrek, 2006; Leopoldo i wsp., 2011]. Wykazano, że 5-HT<sub>7</sub>R zlokalizowany jest również w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [Schoeffter i wsp., 1996] oraz w przewodzie pokarmowym, przez co związany jest z licznymi procesami autonomicznego układu nerwowego [Tuladhar i wsp., 2003]. Jednocześnie, przeprowadzone badania sugerują, że 5-HT<sub>7</sub>R jest zaangażowany także w regulację rytmu okołodobowego [Duncan i Congleton, 2010; Lovenberg i wsp., 1993], procesy uczenia i pamięci [Cifariello i wsp., 2008], regulację stanów emocjonalnych [Stiedl i wsp., 2015] czy kontrolowanie zachowania eksploracyjnego [Liu i Jordan, 2005; Takeda i wsp., 2005]. Ponadto istotną rolę 5-HT<sub>7</sub>R zaobserwowano też w chorobach neurologicznych między innymi epilepsji [Perić i Svob Strac, 2007; Yang i wsp., 2012], bólu neuropatycznym [Liu i wsp., 2021], chorobach neuropsychiatrycznych, takich jak: schizofrenia, zaburzenia lękowe czy depresja [Hedlund, 2009; Okubo i wsp., 2021]. Niemniej jednak, ze względu na szerokie spektrum procesów, w które 5-HT<sub>7</sub>R jest zaangażowany, poznanie zależności molekularnych i funkcjonalnych między szlakami komórkowymi, wydaje się kluczowe w celu stworzenia specyficznych leków dla danego zaburzenia neurologicznego. W związku z powyższym, 5-HT<sub>7</sub>R może stanowić potencjalny molekularny punkt uchwytu wielu farmakoterapii.

Analiza strukturalna 5-HT<sub>7</sub>R wykazała, że receptor ten zawiera heptahelikalną domenę transbłonową, w której helisy heptahelikalne są połączone trzema naprzemiennymi pętlami wewnątrzkomórkowymi i trzema zewnątrzkomórkowymi, przy czym koniec N znajduje się na zewnątrz komórki, a koniec C wewnątrzkomórkowo. Istnieje pięć izoform 5-HT<sub>7</sub>R (5-HT<sub>7A</sub>R, 5-HT<sub>7B</sub>R, 5-HT<sub>7C</sub>R, 5-HT<sub>7D</sub>R, 5-HT<sub>7E</sub>R), które powstają na drodze alternatywnego składania genu, różniąc się długością C-końca oraz ekspresją w różnych tkankach [Heidmann i wsp., 1998; Krobert i wsp., 2001; H. Liu i wsp., 2001]. Niemniej jednak, zarówno wiązanie ligandów, jak i przekazywanie sygnału nie różni się pomiędzy izoformami, z wyjątkiem ludzkiej izoformy 5-HT<sub>7D</sub>R [Guthrie i wsp., 2005; Krobert i wsp., 2001]. Strukturalnie receptor 5-HT<sub>7</sub> wykazuje mniej niż 50% homologii z innymi receptorami serotoninowymi, co stanowi najmniejszą homologie spośród wszystkich receptorów 5-HT [Blattner i wsp., 2019]. Liczne badania wykazały, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R zwiększa pobudliwość błony komórkowej neuronu zwiększając jednocześnie podstawową

---

transmisję synaptyczną, w konsekwencji regulując aktywność sieci neuronalnych [Ciranna i Catania, 2014; Gill i wsp., 2002; Siwiec i wsp., 2020; Tokarski i wsp., 2003]. Co ciekawe, aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie moduluje także pobudliwość neuronów GABA-ergicznych wrażliwych na kwas  $\gamma$ -aminomasłowy [Tokarski i wsp., 2011].

Na poziomie komórkowym 5-HT<sub>7</sub>R łączy się z białkami  $G\alpha$ , zarówno z białkami  $G\alpha_s$ , jak i  $G\alpha_{12}$  [Guseva i wsp., 2014]. Receptor poprzez aktywację białka  $G\alpha_s$  prowadzi do aktywacji cykazy adenylowej i wzrostu poziomu cAMP [Norum i wsp., 2003]. Z kolei cAMP zwiększa aktywację kinazy białkowej A, która fosforyluje kolejne białka między innymi kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) oraz kinazę białkową B [Errico i wsp., 2001; Guseva i wsp., 2014; Johnson-Farley i wsp., 2005; Volpicelli i wsp., 2014]. Aktywacja kinaz ERK w wyniku aktywacji receptora 5-HT<sub>7</sub> może zachodzić, zarówno wskutek aktywacji kinazy białkowej A [Norum i wsp., 2003], jak i w sposób niezależny od tej kinazy, z udziałem białek Epac (ang. *exchange proteins directly activated by cAMP*) [Bonsi i wsp., 2007; Chapin i Andrade, 2001; Lin i wsp., 2003]. Co więcej, badania El Khamlichi i wsp. (2022) wykazały, że aktywacja ERK zależy również od  $\beta$ -arestyny [El Khamlichi i wsp., 2022]. Ponadto 5-HT<sub>7</sub>R może również aktywować białko  $G\alpha_{12}$ , przyczyniając się do aktywacji małych GTPaz z rodziny Rho: CDC42 i RHOA [Kobe i wsp., 2012; Kvachnina i wsp., 2005]. Wykazano, że małe Rho GTPazy odgrywają kluczową rolę w synaptogenezie [Jontes i Smith, 2000] i plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych [Bijata i wsp., 2017; Murakoshi i wsp., 2011; Schill i wsp., 2020; Tashiro i wsp., 2000; Tashiro i Yuste, 2004]. Aktywacja GTPaz powoduje również aktywację czynnika transkrypcyjnego SRF (ang. *serum response factor*), który przyłącza się do elementu odpowiedzi surowiczej SRE (ang. *serum response element*). Schemat aktywowanych szlaków sygnałowych po stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R przedstawiono na Rycinie 6.



**Rycina 6. Szlaki sygnałowe zależne od aktywacji receptora 5-HT<sub>7</sub>.** 5-HT<sub>7</sub>R – 5-hydroksytryptaminowy receptor 7, cAMP – cykliczny monofosforan adenozyiny, PKA – kinaza białkowa A, RHOA i CDC42 – małe Rho GTPazy, SRF – czynnik transkrypcyjny. Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com.

Ponadto wykazano, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi również do zależnego od ERK i kinazy cyklozależnej 5 (ang. *cyclin-dependent kinase 5*) rozrostu neurytów w neuronach prążkowiec i kory [Speranza i wsp., 2013]. Aktywacja ERK jest kluczowa dla funkcji hipokampa w warunkach zaburzonej plastyczności synaptycznej [Ryu i wsp., 2019]. Co ciekawe, poziom ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R jest wyższy na początkowych etapach rozwoju, podobnie jak poziom ekspresji białka  $\alpha_{12}$ , natomiast poziom ekspresji  $\alpha_s$  nie zmienia się wraz z wiekiem [Kobe i wsp., 2012]. 5-HT<sub>7</sub>R poza aktywacją białek G aktywuje także alternatywne szlaki sygnałowe – między innymi szlak  $\beta$ -arestyny [El Khamlichi i wsp., 2022]. Dodatkowo wykazano, że konstytutywna aktywność 5-HT<sub>7</sub>R jest regulowana przez modyfikacje potranslacyjne. Palmitoilacja zachodzi w sposób zależny od agonisty w resztach cysteiny 404, 438 i 441, zlokalizowanych w C-końcowej domenie receptora, co również może modulować siłę aktywacji danego szlaku wewnątrzkomórkowego [Guseva i wsp., 2014; Kvachnina i wsp., 2009]. Warto zauważyć także, że stabilna ekspresja receptorów 5-HT<sub>7</sub> jest wystarczająca do osłabienia aktywacji cyklazy adenylylowej przez inne endogenne receptory sprzężone z  $\alpha_s$ . W dodatku traktowanie odwrotnym agonistą 5-HT<sub>7</sub>R może prowadzić do dalszej desensytyzacji receptorów sprzężonych z białkiem  $\alpha_s$  należących do innych rodzin [Krobert i wsp., 2006], wskazując na wysoki poziom skomplikowania układu.

---

### 1.3. Depresja

Organizm jest nieustannie wystawiony na czynniki stresowe. Często jest to stres mobilizujący, ale kiedy występuje chronicznie może stanowić poważne zagrożenie dla życia i zdrowia. Długotrwałe doświadczanie stresu wpływa na funkcjonowanie wielu układów w organizmie, w tym układu nerwowego. Zdrowy organizm człowieka adaptuje się do warunków stresowych po ustąpieniu stresora. Jednakże kiedy stres jest zbyt intensywny może doprowadzić do przeciążenia psychicznego i w konsekwencji rozwoju zaburzeń neuropsychiatrycznych, takich jak depresja [Duman i wsp., 2016; Richter-Levin i Sandi, 2021].

Depresja jest chorobą złożoną i wieloczynnikową, której etiologia wciąż nie została poznana. Na jej rozwój wpływają zarówno uwarunkowania oraz predyspozycje genetyczne, jak również czynniki środowiskowe [Belmaker i Agam, 2008; Shadrina i wsp., 2018; Tafet i Nemeroff, 2016]. Niemniej jednak, przyjmuje się, że to ekspozycja na chroniczny stres stanowi główny czynnik w patogenezie depresji [Schmitt i wsp., 2014]. Najczęściej występujące objawy depresji to anhedonia, czyli utrata odczuwania przyjemności z czynności, które kiedyś cieszyły, obniżony nastrój, uczucie przygnębienia, poczucie winy, niska samoocena, zmiany apetytu, problemy ze snem i koncentracją. Depresja różni się od wahań nastroju, gdyż często nawraca bez uzasadnionego wyzwalacza. Stan taki może być poważnym zagrożeniem dla zdrowia i życia, gdyż każdy epizod depresyjny wiąże się z ryzykiem podjęcia próby samobójczej, przez co depresja uważana jest za chorobę śmiertelną. Powszechność występowania powyższych objawów sprawia, że w praktyce medycznej depresja jest jedną z najczęściej diagnozowanych chorób psychicznych na świecie [Malhi i Mann, 2018]. Co równie istotne, depresja jest także chorobą towarzyszącą wielu innym zaburzeniom neurodegeneracyjnym, takim jak: choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, czy demencja [Baquero i Martín, 2015; Galts i wsp., 2019].

Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) z 2017 roku choroba ta dotyka około 350 milionów ludzi na całym świecie. Co więcej, w ciągu ostatnich 30 lat liczba osób cierpiących na depresję wzrosła o prawie 50% [Raport WHO, 2017]. Dane te jednak mogą być niedoszacowane, gdyż wiele przypadków stanowią osoby niezdiagnozowane. Pomimo iż istnieją farmakologiczne metody leczenia depresji, ponad 75% ludzi w krajach o niskich i średnich dochodach nie otrzymuje żadnego leczenia. W Polsce w 2017 roku z 1,5 miliona osób, które zostały zdiagnozowane, tylko około 750 000 było leczonych farmakologicznie. Problemy w skutecznej opiece medycznej związane są między innymi z brakiem zasobów, w tym odpowiednio wyszkolonych pracowników służby zdrowia, czy piętnem społecznym związanym z zaburzeniami psychicznymi, z którymi borykają się osoby chore. Co roku na świecie z powodu podjętej skutecznej próby samobójczej umiera ponad 800 000 osób. Co więcej,

---

samobójstwo jest drugą co do częstości przyczyną śmierci osób pomiędzy 15 a 29 rokiem życia [Raport WHO, 2017]. Niemniej jednak, dane te pochodzą sprzed pandemii COVID-19, podczas której większość osób mierzyła się z nagłymi zmianami w życiu codziennym, które nasilały stres psychologiczny, w tym zaburzenia lękowe i depresyjne. Wiele badań przeprowadzonych w różnych krajach na świecie wykazało wzrost zachorowalności na depresję w trakcie pandemii COVID-19 [Bueno-Notivol i wsp., 2021; Heitzman, 2020; Jia i wsp., 2020; Mazza i wsp., 2020]. Ponadto wybuch wojny w Europie w 2022 roku również stanowi istotny czynnik stresogenny przyczyniający się do rozwoju depresji wśród Europejczyków [Chaaya i wsp., 2022; Riad i wsp., 2022].

Dotychczas nie znaleziono uniwersalnej i skutecznej terapii antydepresyjnej, jak również powszechnie akceptowanych biologicznych markerów zaburzeń depresyjnych [Horwitz i wsp., 2017]. Może to być spowodowane niedostatecznym poznaniem mechanizmów molekularnych i komórkowych leżących u podstaw tej choroby. Obecnie, głównym celem badań neuropsychiatrycznych jest określenie szybszych i bardziej skutecznych farmakoterapii związanych z danym obrazem klinicznym depresji. Z praktyki lekarskiej wynika, że różne leki antydepresyjne wykazują różną skuteczność u pacjentów, w zależności od ich uwarunkowań osobniczych i obrazu klinicznego choroby. Dlatego też zindywidualizowane farmakoterapie oparte na dowodach naukowych stanowią obecnie główne wyzwanie dla badań interdyscyplinarnych psychiatrii i neurobiologii. Ponadto szczególne zainteresowanie naukowców skupiają badania nad mechanizmami biologicznymi leżącymi u podstaw adaptacji ośrodkowego układu nerwowego do warunków chronicznego stresu. Zrozumienie tych mechanizmów umożliwiłoby odpowiedzieć na intrygujące pytanie – dlaczego nie wszystkie osobniki wykształcają objawy depresji w wyniku doświadczania takich samych czynników stresowych?

### **1.3.1. Zaburzona plastyczność synaptyczna w depresji**

Kluczowym systemem związanym z reakcją na stres jest oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA). Wykazano, że chroniczny stres powoduje wzrost aktywności osi HPA (wzrost stężenia glukokortykosteroidów we krwi), co bezpośrednio związane jest z rozwojem fenotypu depresyjnego [Willner, 2017]. Długotrwałe utrzymujące się wysokie stężenie glukokortykosteroidów w oganizmie ma działanie neurotoksyczne, powodujące zarówno uszkodzenia, jak i obumieranie neuronów. Szczególnie wrażliwe na działanie glukokortykosteroidów są struktury mózgu bogate w receptory glukokortykoidowe – głównie hipokamp, kora przedczołowa i ciało migdałowate [Duman i wsp., 2016]. U osób chorujących na depresję obserwuje się zmniejszenie objętości hipokampa oraz uszkodzenie struktur kory przedczołowej i ciała migdałowatego. Zwiększona aktywność

---

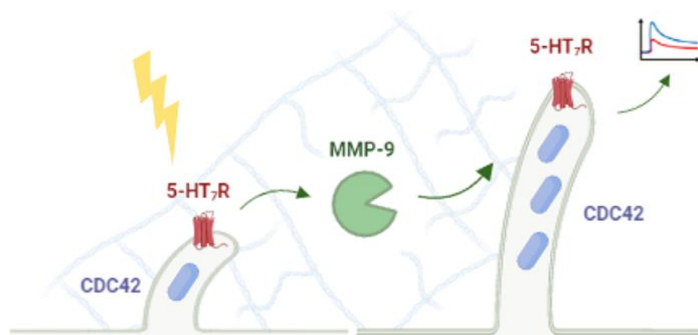
ciała migdałowego negatywnie wpływa na aktywność układu dopaminergicznego zlokalizowanego w środkowej części układu limbicznego, co bezpośrednio związane jest z rozwojem anhedonii (kluczowego objawu w depresji). Stosowanie leków antydepresyjnych aktywuje neurotrofiny stymulując procesy neurogenezy w hipokampie i korze przedczołowej normalizując jednocześnie pracę układu HPA [Willner, 2017]. W związku z tym, wiele badań na temat patogenezy depresji postuluje hipotezy oparte na teoriach związanych z deficytem neuroprzekaźników, atrofią neuronów, stanem zapalnym, czy rozregulowaniem rytmu okołodobowego [Filatova i wsp., 2021]. Niestety żadna z tych teorii nie jest wystarczająco przekonująca, aby wyjaśnić podłoże biologiczne pełnego obrazu klinicznego depresji czy jej podtypów [Filatova i wsp., 2021; Hasler, 2010]. Niemniej jednak wszystkie te teorie dzielą wspólną koncepcję, której założeniem jest, że nieprawidłowa plastyczność synaptyczna leży u podstaw objawów depresyjnych [Duman i wsp., 2016; Holmes i wsp., 2019; Price i Duman, 2020]. Od lat 50. XX wieku, kiedy serotoninowa hipoteza depresji została sformułowana [Woolley i Shaw, 1954], zaburzona sygnalizacja serotonergiczna uznawana jest za istotny czynnik ryzyka w patogenezie zachowań depresyjnych. Warto zauważyć jednak, że hipoteza serotoninowa postulowała niedobór serotoniny jako pierwotną przyczynę, odwracaną przez leki antydepresyjne. Jak dotąd nie ma jasnych i przekonujących dowodów na to, że niedobór serotoniny przyczynia się do rozwoju depresji [Moncrieff i wsp., 2022]. Niemniej jednak, wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zależne od receptorów serotoninowych, wydają się odgrywać szczególną rolę w rozwoju zaburzeń związanych ze stresem, w leczeniu antydepresyjnym oraz w długotrwałej remisji objawów choroby [Belmaker i Agam, 2008; Bhagwagar i wsp., 2004].

Badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych wskazują, że zachowania typu depresyjnego związane są z nieprawidłowościami w utrzymaniu siły połączeń synaptycznych, które objawiają się utratą liczby kolców i/lub zwiększeniem proporcji kolców niedojrzałych [Qiao i wsp., 2016]. Obserwacje te sugerują, że kluczem w zrozumieniu podłoża zachowań typu depresyjnego może być zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za transformację kolców dendrytycznych z formy niedojrzałej w formy bardziej stabilne [Bączyńska i wsp., 2021; Qiao i wsp., 2016]. Zjawisko to jest jednak niezwykle złożone ze względu na fakt, że strukturalna przebudowa kolców dendrytycznych nie jest konieczna dla wywołania efektów antydepresyjnych, natomiast odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu remisji zachowań typu depresyjnego [Beyeler, 2019; Moda-Sava i wsp., 2019; Treccani i wsp., 2019]. Co więcej, wyniki badań wskazują, że to hipokampalne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe regulujące kształt kolców dendrytycznych mogą być kluczowe, zarówno w patogenezie, jak i skutecznym działaniu leków antydepresyjnych [MacQueen i Frodl, 2011; Treccani i wsp., 2019].



### 1.3.2. Szlak sygnałowy zależny od receptora 5-HT<sub>7</sub>

W badaniach Bijata i wsp. (2017) wykazano istnienie *in vitro* szlaku sygnałowego zależnego od receptora 5-HT<sub>7</sub>, którego aktywacja prowadzi do zaburzonej plastyczności synaptycznej. Autorzy udowodnili, że stymulacja receptora 5-HT<sub>7</sub> w pierwotnych hodowlach komórek hipokampa zwiększa aktywność metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) i małej Rho GTPazy CDC42 prowadząc do wydłużania kolców dendrytycznych i upośledzenia LTP /Rycina 7/. Co ciekawe, podobne zmiany strukturalne i funkcjonalne obserwuje się w zwierzęcych modelach depresji [Qiao i wsp., 2016].



**Rycina 7. Schemat przedstawiający aktywację szlaku sygnałowego zależnego od receptora 5-HT<sub>7</sub>.** Stymulacja receptora 5-HT<sub>7</sub> prowadzi do aktywacji metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9) i uwolnienia jej do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, która w wyniku swojej aktywności proteolitycznej trawi białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białka transbłonowe. Zmiany te prowadzą do aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych, w tym wzrostu aktywności małej Rho GTPazy CDC42, która bezpośrednio oddziałuje z cytoszkieletem aktynowym prowadząc do zmian strukturalnych i funkcjonalnych. Wzrost aktywności CDC42 w pierwotnych hodowlach komórek hipokampa prowadzi do wydłużania kolców dendrytycznych oraz zaburzenia długotrwałego wzmocnienia synaptycznego. Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com wzorując się na graficznym streszczeniu publikacji Bijata i wsp. (2017).

Ponadto w innych badaniach wykazano, że zarówno zwierzęta pozbawione ekspresji receptora 5-HT<sub>7</sub>R, jak i farmakologiczna blokada 5-HT<sub>7</sub>R, wywołują efekt antydepresyjny w zwierzęcych modelach depresji, dlatego też 5-HT<sub>7</sub>R uważany jest za potencjalny molekularny punkt uchwytu farmakoterapii antydepresyjnych [Guscott i wsp., 2005; Hedlund, 2009; Wesołowska i wsp., 2006a; Wesołowska i wsp., 2006b; Wesołowska i wsp., 2007]. Co więcej, wiele leków antypsychotycznych i antydepresyjnych (np. klozapina, risperidon i wortioksetyna) oddziałuje bezpośrednio z 5-HT<sub>7</sub>R [D'Agostino i wsp., 2015; Guseva i wsp., 2014; Roth i wsp., 1994]. W szlaku sygnałowym zależnym od 5-HT<sub>7</sub>R również MMP-9 odgrywa istotną rolę w zaburzonej plastyczności synaptycznej w chorobach związanych ze stresem. Wynika to z faktu, że MMP-9 aktywowana jest przy stymulacji neuronów, zarówno w warunkach fizjologicznych (podczas uczenia) [Knapska i Kaczmarek, 2016], jak i w patologicznych (w trakcie ekspozycji na chroniczny stres) [Alaiyed i wsp.,

---

2020; Bijata i wsp., 2022a; Breviario i wsp., 2022; van der Kooij i wsp., 2014]. Wykazano, że przewlekły stres zwiększa aktywność proteolityczną MMP-9 w hipokampie oraz że podawanie rekombinowanego inhibitora MMP-9 – TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) zapobiega rozwojowi zachowań przypominających zachowania depresyjne u szczurów [van der Kooij i wsp., 2014]. Warto zauważyć, że podwyższone poziomy MMP-9 stwierdzono również we krwi u pacjentów z depresją opisując MMP-9 jako jeden z ważniejszych biomarkerów depresji [Domenici i wsp., 2010; Rybakowski i wsp., 2013]. Ponadto w badaniach Puścian i wsp. (2021) zaobserwowano, że leczenie antydepresyjne przy zastosowaniu leków z klasy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (ang. *selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs*) – fluoksetyny – redukowało aktywność MMP-9 w mózgu, ukazując tym samym zależność pomiędzy aktywnością MMP-9 a układem serotoninergicznym [Puścian i wsp., 2021].

Aktywność MMP-9 przyczynia się do tworzenia i stabilizacji struktury kolców dendrytycznych, jak również odgrywa kluczową rolę w regulacji LTP [Bijata i wsp., 2017; Magnowska i wsp., 2016; Stawarski i wsp., 2014]. Ponadto w przebudowie kolców dendrytycznych, synaptogenezie, jak i regulacji LTP, również małe GTPazy z rodziny Rho, takie jak CDC42, Rac i RhoA także odgrywają istotną rolę poprzez regulację organizacji aktyny [Bijata i wsp., 2017; Costa i wsp., 2020; Figiel i wsp., 2021; Jontes i Smith, 2000; Schill i wsp., 2020]. Badania *in vitro* wykazały, że zarówno CDC42, jak i Rac sprzyjają tworzeniu i utrzymaniu kolców dendrytycznych, podczas gdy RhoA może negatywnie regulować synaptogenezę [Ahnert-Hilger i wsp., 2004; Bijata i wsp., 2017; Nakayama i wsp., 2000; Newey i wsp., 2005]. Te GTPazy są regulowane przez wiele różnych aktywatorów, między innymi czynniki wymiany nukleotydów guaninowych, jak i inaktywatorów [Van Aelst i D'Souza-Schorey, 1997]. Co ciekawe, wcześniejsze badania wykazały aktywację CDC42 przez ponad 30 minut w obrębie pojedynczych kolców dendrytycznych podlegających plastyczności strukturalnej. Ta aktywacja była ograniczona do stymulowanych główek kolców, co sugeruje, że CDC42 może być ściśle zaangażowany w utrzymanie długotrwałych zmian w plastyczności kolców dendrytycznych [Matsuzaki i wsp., 2001; Yasuda i Murakoshi, 2011].

Powszechnie uważa się, że szlaki związane z aktywacją CDC42 odgrywają kluczową rolę we wzroście neurytów [Luo, 2000], polaryzacji neuronalnej [Garvalov i wsp., 2007; Schwamborn i Püschel, 2004], neuronalnej migracji [Wong i wsp., 2001] i morfogenezy dendrytycznej [Scott i wsp., 2003] poprzez aktywację szlaków rodziny WASP i rodziny PAK [Kreis i Barnier, 2009]. Niewiele jednak wiadomo na temat roli CDC42 w kolcach dendrytycznych w warunkach fizjologicznych. Niemniej jednak badania *in vivo*, wykazały, że genetycznie zmodyfikowane myszy, u których usunięto CDC42 z neuronów pobudzających w przodomózgowiu, charakteryzowały się zmniejszoną liczbą kolców oraz zaburzonym LTP w hipokampie. W badaniach Bijata i wsp. (2017)

---

opisano, że zwiększona aktywność CDC42 w neuronach hipokampa związana jest z nieprawidłową plastycznością synaptyczną objawiającą się wydłużeniem kolców i zaburzonym LTP, co pokazuje jak subtelne zmiany w aktywności CDC42 mogą zaburzać funkcjonowanie wielu sieci neuronalnych. Podsumowując, doniesienia naukowe wskazują, że aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od receptora 5-HT<sub>7</sub> odgrywa istotną rolę w zaburzonej plastyczności synaptycznej, sugerując potencjalne implikacje w rozwoju zachowań typu depresyjnego. Jednakże występowanie tego szlaku *in vivo* oraz jego rola nie były do tej pory przedmiotem badań.

#### **1.4. Rezyliencja na rozwój zachowań depresyjnych**

Adaptacja organizmu do zmieniających się warunków środowiskowych jest głównym mechanizmem ewolucji [Ho i Zhang, 2018]. Jednym z jej przykładów jest zjawisko rezyliencji (z ang. *stress resilience*), charakteryzujące się zdolnością organizmu do utrzymania funkcji, pomimo narażenia na warunki stresowe przez dostosowanie swoich mechanizmów fizjologicznych i komórkowych. Zjawisko to jest często obserwowane w chorobach neurologicznych człowieka, szczególnie w zaburzeniach neurodegeneracyjnych i neuropsychiatrycznych, takich jak depresja [Arenaza-Urquijo i Vemuri, 2018; Davydov i wsp., 2010; Faye i wsp., 2018; Kane i wsp., 2019; Mizuno i wsp., 2016]. Doświadczenie traumy często powoduje zaburzenia emocjonalne, jednakże nie u wszystkich osób prowadzi do rozwoju depresji. Osoby nierozwijające choroby, określane jako rezyliencjne, wykazują większą zdolność radzenia sobie ze stresem, która wynika z indywidualnych predyspozycji i poziomu wrażliwości na glikokortykosteroidy [Franklin i wsp., 2012; Maul i wsp., 2020; Rakesh i wsp., 2019; Wu i wsp., 2013]. Jednakże gdy stresory są zbyt intensywne i występują przewlekłe, mogą przytłoczyć fizjologiczną reakcję na stres i przekształcić adaptacyjny stan rezyliencji bezpośrednio w patofizjologię leżącą u podstaw depresji, lęku, czy stresu pourazowego [McEwen i wsp., 2014].

Wielu badaczy podkreśla zasadniczą rolę predyspozycji genetycznych w rozwoju rezyliencji, podczas gdy inni uważają, że kluczowe są czynniki środowiskowe wpływające na mechanizmy molekularne związane z układem nagrody, rezerwą neuronalną czy zmianą funkcji pojedynczych białek zaangażowanych w procesy synaptyczne [Friedman i wsp., 2016; Highland i wsp., 2019; Isingrini i wsp., 2016; Krishnan i wsp., 2007; Peña i wsp., 2019; Stainton i wsp., 2019; Wu i wsp., 2013]. Istnieją również dowody na to, że zjawisko rezyliencji jest procesem dynamicznym możliwym do modulowania i wzmacniania przez trening behawioralny [Lambert i wsp., 2016], czy interwencję farmakologiczną np. z wykorzystaniem ketaminy - antagonisty receptora kwasu glutaminowego [Brachman i wsp., 2016; Krzystyniak i wsp., 2019; Okine i wsp., 2020]. Jednakże jednym z podstawowych pytań, na które wciąż brakuje jednoznacznej odpowiedzi, jest to, czy rezyliencja

---

może być również aktywnie regulowanym i wyzwalanym przez czynniki środowiskowe procesem w wieku dorosłym? W ostatnich latach obserwuje się wzrost badań dotyczących tego zagadnienia, jednakże wciąż istotnym ograniczeniem jest dostępność modeli zwierzęcych odwzorowujących różne typy odpowiedzi behawioralnej na chroniczny stres. Jest to szczególnie ważne, gdyż bez odpowiednio scharakteryzowanego modelu badawczego niemożliwym jest zrozumienie różnic molekularnych występujących między jednostkami wykazującymi zachowania typu depresyjnego a rezylientnymi.

### **1.5. Zwierzęce modele zachowań typu depresyjnego**

W związku ze złożoną etiologią depresji w badaniach podstawowych wykorzystywane są różnorodne podejścia metodologiczne do modelowania zachowań typu depresyjnego u zwierząt laboratoryjnych. Można wyróżnić modele farmakologiczne, w których zmiany z zachowaniu (głównie gryzoni) indukowane są przez pojedyncze lub chroniczne podawanie substancji chemicznych np. kortykosteronu, lipopolisacharydu. Modele genetyczne wykorzystujące techniki inżynierii genetycznej umożliwiające generowanie genetycznie zmodyfikowanych zwierząt (np. myszy pozbawione ekspresji danego genu). Modele te stwarzają możliwości do badania mechanizmów związanych z predyspozycjami, uwarunkowaniami genetycznymi, czy zmianami epigenetycznymi leżącymi u podstaw, zarówno depresji, jak i innych zaburzeń związanych ze stresem. Z kolei w modelach fizjologicznych (inaczej behawioralnych) zmiany w zachowaniu powstają w wyniku ekspozycji na stresujące środowiskowo. Jednakże wciąż trwają dyskusje, który z modeli najlepiej odzwierciedla podłoże biologiczne powstawania, zarówno zachowania depresyjnego, jak i rezylientnego [Antoniuk i wsp., 2019; Dziedzicka-Wasylewska i wsp., 2021; Planchez i wsp., 2019].

Początkowo zwierzęce modele depresji związane były z wyuczaniem gryzoni bezradności [Overmier i Seligman, 1967], poddawaniu przymusowemu pływaniu [Porsolt i wsp., 1977], ingerencjach chirurgicznych [Cairncross i wsp., 1978], czy poprzez stosowanie pojedynczych, dotkliwych stresorów np. poprzez zawieszenie za ogon [Steru i wsp., 1985]. Jednakże zważywszy na rozwój wiedzy i to, że podejścia te były uproszczone, przyjęto, że modelowanie zachowań depresyjnych powinno spełniać minimum kryteriów metodologicznych odnoszących się do czasu trwania, dotkliwości i różnorodności stosowanych procedur [Czéh i wsp., 2016; Duman, 2010; Planchez i wsp., 2019; Slattery i Cryan, 2017]. W związku z tym, zwierzęce modele depresji obecnie najczęściej opierają się na długotrwałej ekspozycji na czynniki stresowe, która uznawana jest za główny czynnik ryzyka rozwoju zachowań depresyjnych, zarówno u ludzi, jak i zwierząt laboratoryjnych [Czéh i wsp., 2016; Duman i wsp., 2016; Han i wsp., 2015; Kraus i wsp., 2019; Malhi i Mann, 2018; Schmitt i wsp., 2014]. Spośród nich wyróżnia się takie modele jak: chroniczny stres

---

unieruchomienia (ang. *chronic restraint stress*, CRS) [Renaud, 1959], chroniczny nieprzewidywalny stres (ang. *chronic unpredictable stress*, CUS) [Katz i wsp., 1981; Willner, 1997] oraz chroniczny stres socjalny (ang. *chronic social defeat stress*, CSDS) [Blanchard i wsp., 1998]. Jednakże każde z wyżej wymienionych podejść metodologicznych posiada swoje ograniczenia. Model unieruchomienia jest jednym z najczęściej stosowanych modeli, jednak w ostatnich latach naukowcy zwracają uwagę na jego niską skuteczność i powtarzalność [Mao i wsp., 2022]. Z kolei model chronicznego stresu socjalnego jest głównie stosowany w badaniach jednej płci (samcach). Co prawda, w ostatnich latach powstają nowe protokoły chronicznego stresu socjalnego dedykowane dla samic, niemniej jednak poziom złożoności takiego modelu sprawia, że nie jest on jeszcze dobrze scharakteryzowany pod kątem zmian molekularnych [Harris i wsp., 2018].

Drugim, równie kluczowym aspektem skutecznego modelowania zachowań depresyjnych u zwierząt jest różnorodność stosowanych stresorów oraz występowanie ich w sposób niemożliwy do przewidzenia, utrudniając tym samym adaptacje organizmu do nieustannie zmieniających się warunków środowiskowych. Badania wykazały, że stan w którym organizm jest w stanie lęku związanym z możliwością wystąpienia stresora prowadzi do licznych zaburzeń neurologicznych, w tym atrofii struktur korowych lub/i układu limbicznego [Marsden, 2013], zmniejszenia neurogenezy w hipokampie [Schoenfeld i wsp., 2017], nadwrażliwości układu serotoninerpicznego, nadmiernej aktywacji układu noradrenergicznego [Pereira i wsp., 2019], stanu zapalnego w hipokampie [Beurel i wsp., 2020], wzmożonej aktywacji mikrogleju [Brites i Fernandes, 2015] czy rozregulowania osi HPA [Filatova i wsp., 2021; Ménard i wsp., 2017]. Co ważne, wymienione zaburzenia nie są specyficzne wyłącznie dla zaburzeń depresyjnych, gdyż zarówno w schizofrenii, jak i w chorobie dwubiegunowej, obserwuje się podobne zmiany strukturalne i funkcjonalne [Han i wsp., 2015; Scheltens, 1999]. Dlatego tak ważna jest kompleksowa i interdyscyplinarna charakterystyka różnych fenotypów zachowań typu depresyjnego w stosowanych modelach zwierzęcych. Obecnie dostępny jest szeroki zakres protokołów wywoływania zachowań depresyjnych u gryzoni mierzonych testami behawioralnymi, jednakże charakterystyka plastyczności synaptycznej leżącej u podstaw zmian w zachowaniu po ekspozycji na chroniczny stres jest wciąż mało poznana i trudna do zunifikowania. Wynika to z faktu, iż pomimo stosowania jednakowych podejść metodologicznych np. chronicznego nieprzewidywalnego stresu, protokoły stresu w badaniach często znacznie różnią się między sobą – między innymi czasem trwania protokołu lub rodzajem stosowanych stresorów. Różnorodność protokołów prowadzi do występowania różnic w wynikach końcowych analiz biochemicznych, strukturalnych oraz funkcjonalnych obserwowanych u stresowanych zwierząt [Planchez i wsp., 2019; Wang i wsp., 2017].

---

Uwzględniając wyżej wymienione aspekty związane z modelowaniem zachowań typu depresyjnego u dorosłych zwierząt laboratoryjnych to podejście chronicznego nieprzewidywalnego stresu zyskało najwięcej uznania naukowców [Antoniuk i wsp., 2019]. Wynika to z faktu, że model ten spełnia niezbędne kryteria, zapobiega habituacji do występujących stresorów oraz może być stosowany u obu płci, generując powtarzalne wyniki, zarówno behawioralne, neurochemiczne, jak i neuroendokrynne. Ponadto zastosowanie takiego podejścia prowadzi do rozwoju różnych fenotypów behawioralnych w odpowiedzi na chroniczny stres, w tym rezyliencji. Jest to szczególnie ważne, gdyż umożliwia z dużym prawdopodobieństwem określić specyficzność otrzymanych wyników molekularnych wobec danego typu zachowania [Antoniuk i wsp., 2019; Dziejicka-Wasylewska i wsp., 2021; Planchez i wsp., 2019].

---

## 2. HIPOTEZA I CEL PRACY

Głównym celem rozprawy doktorskiej było poznanie roli szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R w rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy.

Na podstawie danych literaturowych postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. Aktywacja receptora 5-HT<sub>7</sub>R u myszy prowadzi do rozwoju zachowania typu depresyjnego.
2. Występowanie fenotypu depresyjnego związane jest ze zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych.

Do weryfikacji postawionych hipotez wyznaczono następujące, szczegółowe cele badawcze:

- wyjaśnienie wpływu aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R na rozwój zachowań typu depresyjnego u myszy;
- wyjaśnienie czy szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R jest aktywowany w hipokampie myszy wykazujących zachowania typu depresyjnego w wyniku ekspozycji na chroniczny stres;
- wyjaśnienie czy fenotyp depresyjny związany jest ze zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych w hipokampie.

---

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Stosowane odczynniki chemiczne

Lista odczynników chemicznych użytych w eksperymentach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej została przedstawiona w Tabeli 1.

**Tabela 1. Podstawowe odczynniki chemiczne**

Odczynnik	Producent, numer katalogowy
Akryloamid: bis akryloamid, 30% roztwór	Sigma, A3699
Alkohol etylowy 96.6%	POCh, 396420420
Alkohol metylowy	Chempur, 363-116219904
Błękit bromofenolowy	Carl Roch , T116
$\beta$ -merkaptoetanol	Sigma, M6250
Chlorek sodu - NaCl	Chempur, 363-117941206
Chlorek potasu - KCl	Chempur, 363-117397402
Czerwień Ponceau S	Lab Empire, PON001
Dimetylosulfotlenek	Sigma, 67-68-5
Glicerol	POCh, 44332013
Glicyna	Lab Empire, GLN002
Izopropanol	Chempur, 363-117515002
Ketamina	Biowet, Puławy
Kwas octowy	Chempur, 363-115687330
Kwas wersenowy - $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA)	Thermo Fisher Scientific,17892
LP-211 (LP)	Sigma, SML1561-5MG
Monolurynian polioksyetylenosorbitolu – Tween 20	Sigma, P9416
Nadtlenosiarczan diamonu (APS)	Sigma, A3678
N,N,N',N'- tetrametylo-1,2 diamina (TEMED)	Sigma, T9281



Paraformaldehyd 4% w PBS (PFA)	Santa Cruz, sc-281692
Sól sodowa siarczanu dodecylu (SDS)	Lab Empire, SDS999
Tris - (hydroksymetylo) – aminometan (Tris)	POCh, 853470115
Triton X-100	Sigma, T8787
Wodorofosforan sodu - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	POCh, 799230112
Wodorofosforan potasu - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	POCh, 742100117
Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej, pH 7,4 (PBS)	Thermo Fisher Scientific, 18912014

### 3.2. Wektory wirusowe

Wektory wirusowe użyte w eksperymentach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w Tabeli 2.

**Tabela. 2. Spis użytych wektorów wirusowych**

Nazwa	Opis	Źródło
AAV 5-HT <sub>7</sub> R shRNA	Adenowirus niosący sekwencję shRNA, specyficznie rozpoznający sekwencję nukleotydową 5-HT <sub>7</sub> R	Labus i wsp., 2020
AAV scramble shRNA	Adenowirus niosący przypadkową sekwencję shRNA niewykazującą homologii w stosunku do żadnego mysiego genu	

Nośniki adenowirusowe AAV kodujące shRNA scramble (RNA o sekwencji niekomplementarnej do kwasów nukleinowych w obrębie komórki, scr shRNA, ang. *scramble shRNA*) i anti-5-HT<sub>7</sub>R-shRNA (RNA o sekwencji komplementarnej do 5-HT<sub>7</sub>R, 5-HT<sub>7</sub>R shRNA) otrzymano od dr Josephine Labus (Hannover Medical School, Niemcy) i wygenerowano je jak opisano we wcześniejszych badaniach Labus i wsp. (2021). Procedura ta obejmowała kotransfekcję komórek linii HEK293 bicystronowym wektorem wirusowym kodującym sekwencję shRNA specyficzną dla genu *htr7* (5-HT<sub>7</sub>R shRNA: 5' TCCTTTATCATTATGGTGT-3') lub sekwencję scr shRNA, niewyciszającą ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R (scr shRNA : 5' ACTACCGTTGTTATAGGTG-3') wraz z eGFP (plazmid pHelper i plazmid pAAV-DJ) – System pakowania AAV-DJ, Cell Biolabs. Trzy dni po transfekcji komórek AAV wyizolowano materiał poprzez trzykrotne rozmrożenie i zamrożenie próbek, po których następowało trawienie benzonazą. Wektory AAV zatężano przy użyciu probówek

---

do wirowania Amicon z odcięciem 10 kDa. W celu określenia miana wirusów, kapsyd wirusa trawiono przy użyciu proteiny K, natomiast wirusowy DNA analizowano przy użyciu ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) ze starterami ukierunkowanymi na wirusowy potranslacyjny element regulatorowy WPRE (ang. *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*).

Sekwencje starterów:

- E1-F2: 5'-CCTGTTGCTGTCTCTTTATGAGG-3';

- E1-R2: 5'-TGACAGGTGGTGGCAATGC-3';

- sonda 5'-/6FAM/CGTTGTCAGGCAACGTGG CGTGGTG/TAMRA/-3' (Sigma).

Do obliczenia liczby kopii genu wirusa na 1 µl zastosowano metodę względnej krzywej standardowej.

### **3.3. Tkanka ludzka *post mortem***

Próbki mózgu ludzkiego (hipokamp) pobrano podczas rutynowych sekcji zwłok wykonywanych przez patologa sądowego w Zakładzie Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (wg Dz. U. z 2018 r. poz. 617) oraz w Instytucie Medycyny Sądowej Hannover Medical School, Niemcy (zatwierdzenie Komisji Etycznej Hannover Medical School, nr 3440-2016). Grupa eksperymentalna składała się z 10 pacjentów, którzy popełnili samobójstwo i u których w wywiadzie klinicznym zdiagnozowano wcześniej depresję. Grupa kontrolna obejmowała 6 ofiar wypadków drogowych, u których nie zdiagnozowano wcześniej depresji. Zarówno pacjenci z grupy kontrolnej, jak i pacjenci z depresją nie cierpieli na inne choroby przewlekłe, w tym inne zaburzenia psychiczne. Materiał pobrany od osób, u których badania toksykologiczne nie wykazały obecności substancji psychoaktywnych został przeznaczony na analizę aktywności MMP-9 przy zastosowaniu techniki zymografii żelowej opisanej w *Materiały i Metody* (podrozdział 3.6.3). Tkanki hipokampa po pobraniu *post mortem* płukano w PBS (pH 7,4), a następnie zamrożono na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C. W dniu wykonania zymografii żelowej przeprowadzano dysekcję regionów hipokampa, podczas której starano się wyizolować głównie pole rogu Amona (region CA1, łac. *cornu ammonis 1*) hipokampa.

### **3.4. Zwierzęta**

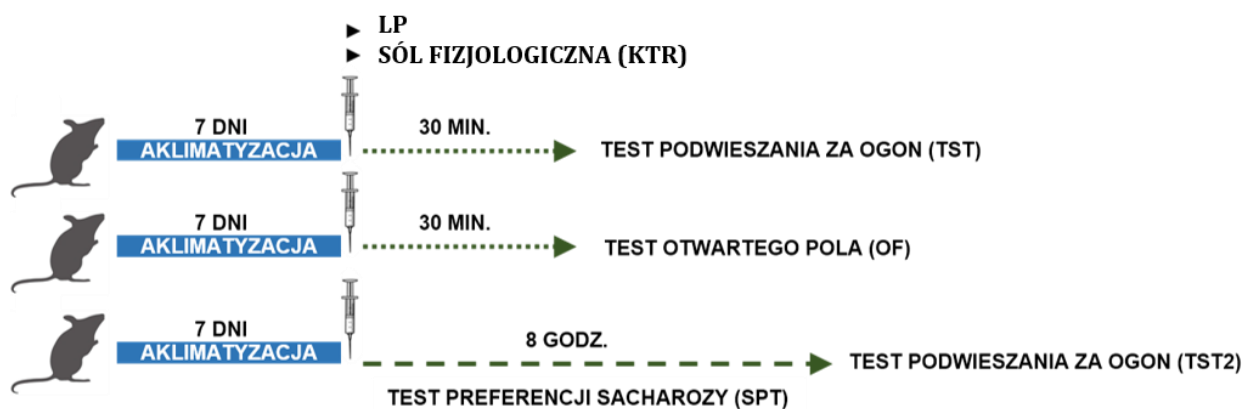
Samce myszy typu dzikiego szczepu C57BL/6J w wieku 8-12 tygodni (Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, Warszawa; Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska) oraz myszy pozbawione ekspresji MMP-9 o tle genetycznym myszy szczepu C57BL/6J, MMP-9 KO (Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN, Warszawa, Polska) poddano eksperymentom

---

behawioralnym i analizom biochemicznym opisanym poniżej. W procedurze CUS wykorzystano dwunastotygodniowe samce myszy szczepu CD1 (Janvier Labs, Francja) i dwunastotygodniowe samce szczurów stada Wistar (Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa, Polska). Wszystkie procedury na zwierzętach wykonano zgodnie z wytycznymi Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (zezwolenie nr 132/2016; 248/2017; 927/2019; 957/2019; 211/2020; 359/2020) oraz zgodnie z zezwoleniami na wykorzystanie organizmów genetycznie zmodyfikowanych (32/2016). Warunki utrzymania zwierząt w doświadczeniach były następujące – temperatura: 21-23°C, wilgotność: 50-60%, liczba wymian powietrza: 10-15 na godzinę, ściółka z włókna drzewnego z topoli (Lignocel Select). Zwierzęta miały dostęp do wody oraz paszy *ad libitum* z wyjątkiem sytuacji, w której specyfika przeprowadzanych procedur to uniemożliwiała. W trakcie doświadczenia zwierzęta utrzymywano w środowisku standardowym – w przypadku zwierząt poddawanych CUS było to środowisko niewzbogacone, natomiast w grupie kontrolnej – środowisko wzbogacone. Wzbogaceniem środowiska były drewniane klocki oraz ręczniki i rury papierowe. Utrzymywanie niewzbogaconego środowiska w grupie stresowanej pozwala na zwiększenie efektu wywołanego chronicznym stresem, co przekłada się na udaną indukcję zachowań typu depresyjnego u zwierząt laboratoryjnych. Liczebność zwierząt wykorzystana w danym eksperymencie została przedstawiona w opisie poszczególnych procedur.

### **3.4.1. Dootrzewnowe zastrzyki u myszy**

Do eksperymentów wykorzystano dwunastotygodniowe samce myszy typu dzikiego szczepu C58BL/6J oraz myszy MMP-9 KO. W celu aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R myszom wykonano zastrzyk dootrzewnowy zawierający roztwór agonisty 5-HT<sub>7</sub>R – LP (Sigma-Aldrich, USA) rozpuszczonego w 3,4% dimetylosulfotlenku (DMSO) w dawce 10mg/kg masy ciała i objętości 10 ml/kg masy ciała. W celu wykluczenia obserwacji efektu wynikającego z samej iniekcji grupę kontrolną (KTR) stanowiły myszy, którym dootrzewnowo podano roztwór soli fizjologicznej z 3,4% DMSO i objętości 10 ml/kg masy ciała. Po iniekcji zwierzęta przebywały pojedynczo w klatce domowej przez 30 min, a następnie były poddawane testom behawioralnym: teście podwieszania za ogon, teście otwartego pola oraz teście preferencji sacharozy. Charakterystyka przygotowania zwierząt do wyżej wymienionych testów behawioralnych została szczegółowo opisana w rozdziale „*Materiały i Metody*” (podrozdział 3.5.). W celu uniknięcia wpływu stosowanych procedur na parametry behawioralne zwierząt, do przeprowadzenia każdego z testu behawioralnego wykorzystano oddzielne kohorty zwierząt. Schemat eksperymentów behawioralnych wraz z liczebnością zwierząt w danej kohorcie został przedstawiony na Rycinie 8.



Test behawioralny	Liczebność grup (typ dziki)	Liczebność grup (KO MMP-9)
TST	KTR: N = 37, LP: N = 35	KTR: N = 16, LP: N = 18
OF	KTR: N = 7, LP: N = 7	-
SPT	KTR: N = 23, LP: N = 26	-
TST2	KTR: N = 12, LP: N = 13	-

**Rycina 8. Schemat eksperymentów behawioralnych** przeprowadzonych 30 min po wykonaniu iniekcji dootrzewnowej agonistą 5-HT<sub>7</sub>R (LP) lub solą fizjologiczną (KTR), przedstawiający kolejność wykonywanych procedur oraz liczebność grup stosowaną w danym teście behawioralnym.

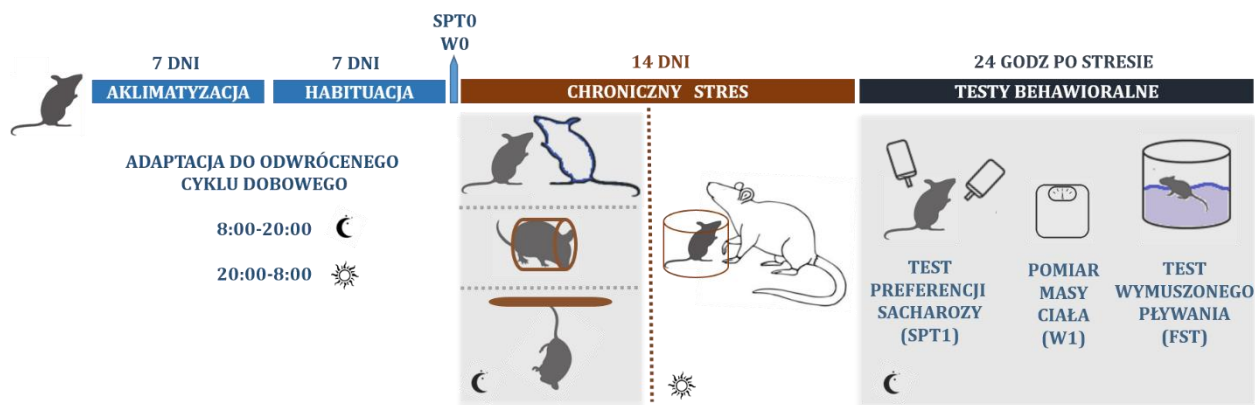
Ponadto w procedurze opisanej w podrozdziale 3.4.2.1., myszom wykonano pojedynczą iniekcję dootrzewnową roztworu ketaminy rozpuszczonej w soli fizjologicznej w dawce 3mg/kg masy ciała i objętości 10 ml/kg masy ciała, natomiast jako wariant kontrolny przeprowadzono zastrzyk z solą fizjologiczną w objętości 10 ml/kg masy ciała. Iniekcje dootrzewnowe (ketamina, sól fizjologiczna) wykonano w tym samym czasie u zwierząt kontrolnych (niestresowanych) i stresowanych (po CUS).

### 3.4.2. Mysi model chronicznego nieprzewidywalnego stresu

Na podstawie dostępnej literatury [Antoniuk i wsp., 2019; Planchez i wsp., 2019] wybrano i wdrożono myszy model depresji, który uznany jest przez naukowców za model najbardziej odzwierciedlający obraz kliniczny depresji występującej u ludzi. Procedurę CUS przeprowadzono według wcześniej opisanych protokołów z niewielkimi modyfikacjami [Couch i wsp., 2013; Strekalova i Steinbusch, 2010]. Procedura ta została zoptymalizowana i wykorzystana we wcześniejszych badaniach zespołu Pracowni Biofizyki Komórki [Bijata i wsp., 2022a; Bijata i wsp.,

---

2022b; Krzystyniak i wsp., 2019]. Ośmiotygodniowe samce myszy typu dzikiego szczepu C57BL/6J trzymano pojedynczo w klatkach hodowlanych w warunkach odwróconego cyklu dobowego – 12 godz. włączone światło białe (faza jasna, 8:00-20:00); 12 godz. wyłączone światło białe (faza ciemna, 20:00-8:00). Po tygodniu aklimatyzacji do pomieszczenia eksperymentalnego myszy poddano codziennej habituacji do eksperymentatora przez kolejnych siedem dni (3-6 min/mysz/dzień). Następnie przeprowadzono test preferencji sacharozy oraz pomiar masy ciała w celu określenia bazowych parametrów behawioralnych (preferencja sacharozy) i fizjologicznych (masa ciała). Na podstawie wyżej wymienionych bazowych parametrów myszy przydzielono do dwóch jednorodnych grup (grupy kontrolnej i grupy stresowanej), które umieszczono w dwóch osobnych pomieszczeniach do końca eksperymentu. Jednorodność obu grup została przetestowana pod kątem jednakowych średnich arytmetycznych, odchyłeń standardowych oraz spełnionych warunków rozkładu normalnego prób danej grupy oraz jednorodności ich wariancji. Następnie, dziesięcioletniowe samce myszy poddano dwutygodniowej procedurze CUS, w której różne typy stresorów (stres unieruchomienia, stres podwieszania za ogon, stres socjalny, stres związany z ekspozycją na drapieżnika) były stosowane codziennie i naprzemiennie w obu fazach (faza jasna i faza ciemna) cyklu dobowego. Dwa z trzech stosowanych stresorów w fazie ciemnej wybierano kolejno z sekwencji o następującej kolejności: stres socjalny, stres unieruchomienia, stres podwieszania za ogon. Stresory w fazie ciemnej przeprowadzono z użyciem światła czerwonego umożliwiającemu eksperymentatorowi przeprowadzenie procedur. Podczas każdej fazy jasnej myszy poddawano 12-godzinnej ekspozycji na obecność drapieżnika (szczur). W czasie przerwy między stresorami trwającej co najmniej 3 godz. myszy przebywały pojedynczo w klatce hodowlanej, w której miały nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Po dwóch tygodniach procedury stresowania wykonano ocenę behawioralną (około 16 godzin od ostatniego stresora) obejmującą test preferencji sacharozy (SPT1) i test wymuszonego pływania (FST) oraz pomiar masy ciała. Zmiana masy ciała stanowi fizjologiczny wskaźnik doświadczenia przewlekłego stresu u zwierząt laboratoryjnych [Tamashiro i wsp., 2011]. Zwierzęta kontrolne (KTR), które nie doświadczyły procedury stresowania równolegle poddawano wyżej wymienionym testom i pomiarom. Zastosowanie procedury CUS prowadzi do wyodrębnienia dwóch subpopulacji behawioralnych w grupie stresowanej – myszy anhedonicznych (ANH) i myszy rezyliencyjnych (RES). Kryterium przydzielenia danej myszy do grupy ANH lub RES była wartość preferencji sacharozy ustalana w danym eksperymencie [Bijata i wsp., 2022b]. W podrozdziale 3.5.2. kryterium anhedonii zostało szczegółowo opisane. Schemat procedury CUS został przedstawiony na Rycinie 9. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych potwórzonaich, wykorzystaniem łącznie 120 myszy, z czego 39 myszy stanowiło grupę kontrolną a 81 grupę stresowaną.



**Rycina 9. Schemat procedury chronicznego nieprzewidywalnego stresu wraz z ewaluacją behawioralną przedstawiającą kolejność wykonywanych procedur.**

Opis stosowanych stresorów w procedurze CUS:

**Stres unieruchomienia.** Myszy umieszczano w przezroczystej plastikowej rurce (26 mm średnicy wewnętrznej) na 2 godz. W celu zapewnienia odpowiedniej wentylacji rurka posiadała otwory na całej powierzchni oraz otwór na ogon.

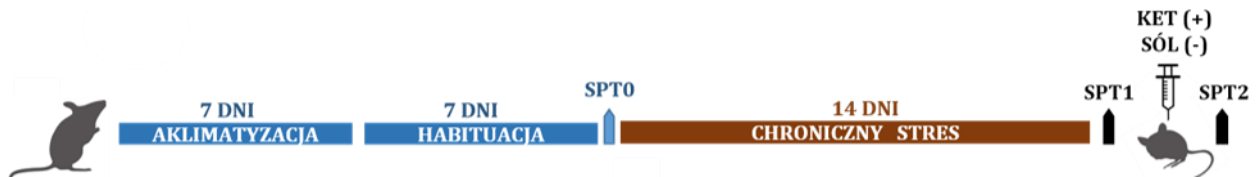
**Stres podwieszania za ogon.** Myszy podwieszano za ogon na 40 min za pomocą taśmy samoprzylepnej, 50 cm nad podłogą. Aby zapobiec wspinaniu się myszy po ogonach, u podstawy ich ogonów umieszczano plastikowe cylindry (0,5 cm × 4 cm).

**Stres socjalny.** Na każdą 30-minutową sesję stresu socjalnego, jedną agresywną mysz szczepu CD1 umieszczano w każdej klatce domowej myszy eksperymentalnej szczepu C57BL/6J. Myszy C57BL/6J wykazywały oznaki stresu związanego ze stresem socjalnym, takie jak ucieczka, uległa postawa i wokalizacje. Jeśli myszy eksperymentalne C57BL/6J nie wykazywały oznak stresu socjalnego wówczas mysz CD1 zastępowano inną, bardziej dominującą, agresywną myszą CD1. W trakcie stresu socjalnego eksperymentator obserwował zachowania myszy i w razie zbyt agresywnych interakcji myszy rozdzielano za pomocą cienkiej pipety serologicznej (objętość 1 ml).

**Stres związany z ekspozycją na drapieżnika.** Myszy umieszczono pojedynczo w przezroczystych, dobrze wentylowanych szklanych cylindrach (15 cm × 8 cm) ze standardowym pożywieniem i ściółką. Cylindry umieszczono następnie w klatce domowej samca szczura na 12 godz. (faza jasna, 20:00-8:00). Tak przeprowadzona procedura umożliwiała myszom eksperymentalnym C57BL/6J widzenie drapieżnika oraz odczuwanie jego zapachu.

### 3.4.2.1. Podanie leku antydepresyjnego w modelu chronicznego nieprzewidywalnego stresu

W celu określenia różnic behawioralnych obserwowanych w fenotypach behawioralnych myszy po ekspozycji na CUS sprawdzono, czy fenotypy te wykazują różnice we wrażliwości na leczenie antydepresyjne ketaminą. W eksperymencie zastosowano wyżej opisaną procedurę CUS, po której myszom kontrolnym i stresowanym wykonano pojedynczy zastrzyk dootrzewnowy z roztworem ketaminy (3 mg/kg masy ciała) lub soli fizjologicznej. W eksperymencie, zarówno myszy w grupie kontrolnej (myszy niestresowane), jak i w grupie eksperymentalnej po stresie (myszy ANH i RES) podzielono na dwie dodatkowe podgrupy, z których jednej grupie wykonano iniekcję z roztworem ketaminy, a drugiej iniekcję z roztworem soli fizjologicznej. Po zastrzykach dootrzewnowych zwierzęta przebywały pojedynczo w klatkach hodowlanych do czasu przeprowadzenia drugiego testu preferencji sacharozy (SPT2), który miał miejsce 12 godz. po wykonaniu iniekcji dootrzewnowej. SPT2 przeprowadzono analogicznie do SPT1, w jednakowych warunkach eksperymentalnych. Schemat eksperymentu przedstawiono na Rycinie 10. Dawkę ketaminy wybrano na podstawie wcześniejszego badania, w którym zastosowano wyżej wymienioną procedurę CUS [Krzystyniak i wsp., 2019]. Eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem 44 myszy, z czego 13 myszy stanowiło grupę kontrolną a 31 grupę stresowaną.



Rycina 10. Schemat procedury chronicznego nieprzewidywalnego stresu wraz z ewaluacją behawioralną po podaniu roztworu ketaminy lub soli fizjologicznej przedstawiający kolejność wykonywanych procedur.

### 3.4.3. Operacje stereotaktyczne

Ośmiotygodniowe samce myszy typu dzikiego szczepu C57BL/6J poddano pełnemu znieczuleniu ogólnemu (izofluran) a następnie umieszczono w ramie stereotaktycznej. W celu uśmierzenia bólu myszom podano podskórnie zastrzyk butorfanolu (Butomidol). Oczy zwierzęcia zabezpieczono maścią zapobiegającą wysychaniu rogówki (Vita-Pos). Skórę na głowie ogolono, oczyszczono (70% alkohol etylowy) oraz miejscowo znieczulono (2% lidokaina w żelu). Następnie wykonano nacięcie skalpelem o długości 0,5 cm i oczyszczono powierzchnię czaszki w celu zlokalizowania punktu bregmy na czaszce, na podstawie którego wyznaczono koordynaty miejsca infuzji. Koordynaty dla regionu CA1 hipokampa wyznaczono

---

na podstawie atlasu anatomicznego mózgu myszy [Paxinos i Franklin, 2008] i wynosiły względem punktu bregmy: przód/tył: -1,9 mm; boczny: +/-1,5 mm; i brzuszny: -1,6 mm. Wiertłem dentystycznym wywiercono w czaszce milimetrowy otwór, przez który wprowadzono igłę strzykawki Hamiltona, w której znajdowała się zawieszona nośnikowa adenowirusowa: adenowirus niosący sekwencje shRNA specyficznie rozpoznający sekwencję nukleotydową 5-HT<sub>7</sub>R (AAV 5-HT<sub>7</sub>R shRNA), adenowirus niosący przypadkową sekwencję shRNA niewykazującą homologii w stosunku do żadnego mysiego genu (AAV scramble shRNA). Następnie przeprowadzono 5-minutową infuzję 1 µl AAV-H1-shRNA-scramble-Syn-GFP lub AAV-H1-5-HT<sub>7</sub>R-shRNA-Syn-eGFP do każdej z półkul mózgu, co stanowiło 2x10<sup>7</sup> genomów wirusowych. Po zakończeniu infuzji igłę pozostawiono w mózgu przez kolejne 3 min w celu umożliwienia dyfuzji nośników wirusowych. Następnie igłę delikatnie usunięto z mózgu, skórę na głowie zaszyto i zdezynfekowano oraz posmarowano maścią znieczulającą (2% lidokaina). Myszy otrzymały podskórnie zastrzyki kwasu tolfenamowego (Tolfedine) i enrofloksacyny (Baytril) w celu wyeliminowania stanu zapalnego wynikającego z przeprowadzonej operacji. Po zakończeniu zabiegu myszy umieszczono w czystej klatce domowej, która była ogrzewana za pomocą poduszki elektrycznej do momentu wybudzenia się zwierząt. Każda operacja trwała do 45 minut. Stan zdrowia i kondycja zwierząt były kontrolowane codziennie przez eksperymentatora. Okres rekonwalescencji po operacji wynosił dwa tygodnie. Jest to czas niezbędny do zajścia ekspresji wprowadzanych wektorów wirusowych. Po okresie rekonwalescencji myszy poddano procedurze CUS wraz z ewaluacją behawioralną. W celu zweryfikowania skuteczności shRNA wobec wyciszenia ekspresji genu *htr7* zainfekowany region CA1 z jednej półkuli mózgu myszy wyizolowano i przeznaczono na analizy RT-qPCR. Druga półkula mózgu została przeznaczona na procedurę znakowania neuronów w celu wizualizacji kolców dendrytycznych (szczegółowy opis w rozdziale „*Materiały i Metody*”, podrozdział 3.8). Eksperyment przeprowadzono w dwóch niezależnych powtórzeniach z wykorzystaniem łącznie 56 myszy, z czego 18 myszy stanowiło grupę kontrolną a 38 grupę stresowaną.

### **3.5. Testy behawioralne**

#### **3.5.1. Test podwieszania za ogon (TST)**

Tydzień przed wykonaniem testu podwieszania za ogon dwunastotygodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J oraz myszy MMP-9 KO rozdzielono do pojedynczych klatek i codziennie przez siedem kolejnych dni (3-4 min/dzień) przyzwyczajano do ręki i obecności eksperymentatora. Test podwieszania za ogon przeprowadzono 30 min po wykonaniu zastrzyku dootrzewnowego zawierającego roztwór agonisty 5-HT<sub>7</sub>R (LP) lub roztwór soli fizjologicznej (KTR). Test ten polega na zawieszeniu myszy za ogon za pomocą taśmy samoprzylepnej w pozycji uniemożliwiającej



---

ucieczkę oraz zaczepienie się o ściany komory eksperymentalnej. Mysz zawieszona za ogon naprzemiennie porusza się i nieruchomieje. Aby zapobiec wspinaniu się myszy po ogonie, u podstawy ogona umieszczono plastikowe cylindry (0,5 cm × 4 cm). Test nagrywano za pomocą kamery a następnie analizowano manualnie z wykorzystaniem stopera. Łączny czas bezruchu 6-minutowego testu stanowi miarę poziomu motywacji do ucieczki i ratowania się. Wydłużony czas bezruchu w porównaniu do zwierząt kontrolnych interpretowano jako obniżony poziom motywacji, komponent behawioralny fenotypu depresyjnego.

### 3.5.2. Test preferencji sacharozy (SPT)

Test preferencji sacharozy jest standardowym testem wykorzystywanym do analizy poziomu anhedonii u myszy C57BL/6J [Liu i wsp., 2018]. Test przeprowadzono w fazie ciemnej cyklu dobowego przy czerwonym świetle, zgodnie z wcześniejszym opisem [Bijata i wsp., 2022a; Bijata i wsp., 2022b; Krzystyniak i wsp., 2019; Liu i wsp., 2018; Strekalova i Steinbusch, 2010]. Myszy umieszczono pojedynczo w klatkach przez 8 godz. ze swobodnym dostępem do 1% roztworu sacharozy i wody, które znajdowały się w dwóch identycznych przezroczystych butelkach w jednakowej objętości. Spożycie wody i roztworu sacharozy przez zwierzęta kontrolne i doświadczalne oszacowano równoległe przez ważenie butelek na początku i na końcu testu. Aby wyeliminować możliwe skutki preferencji strony, pozycje butelek w klatce zamieniono po 4 godz. trwania testu. Natomiast aby zapobiec możliwym skutkom neofobii smakowej, dzień przed SPT wszystkim zwierzętom podano 2,5% roztwór sacharozy na 2 godz. Tydzień przed wykonaniem SPT myszy rozdzielono do pojedynczych klatek i codziennie przez siedem kolejnych dni (3-4 min/dzień) przyzwyczajano do ręki i obecności eksperymentatora. W przypadku procedury CUS aklimatyzacja do warunków eksperymentalnych (odwrócona faza cyklu dobowego) trwała dwa tygodnie, w tym jeden tydzień przyzwyczajania do ręki i obecności eksperymentatora. Preferencja sacharozy obliczana była w następujący sposób:

preferencja sacharozy =  $(\text{masa spożytego roztworu sacharozy} / [\text{masa spożytego roztworu sacharozy} + \text{masa spożytej wody}]) \times 100\%$

W modelu CUS preferencja sacharozy w grupie stresowanej poniżej 70,41%, mierzona 24 godz. po zakończeniu procedury stresowania stanowiła kryterium anhedonii. Kryterium zdefiniowano jako różnicę między grupą kontrolną i stresowaną większą od dwóch odchyłeń standardowych (2x SD, ang. *standard deviations*). Wcześniej wykazano, że myszy anhedoniczne wykazują fenotyp typu depresyjnego [Bijata i wsp., 2022a; Liu i wsp., 2018; Strekalova i wsp., 2004; Strekalova i Steinbusch, 2010].

---

### 3.5.3. Test wymuszonego pływania (FST)

W teście FST myszy umieszczano pojedynczo w szklanym cylindrze (20 cm × 40 cm) wypełnionym ciepłą wodą (~27°C) do poziomu 15 cm. Test przeprowadzono w procedurze CUS (1 godz. po SPT1) w fazie ciemnej cyklu dobowego w świetle czerwonym. Myszy aklimatyzowano przez 1 godz. w pomieszczeniu, w którym wykonano FST. Zwierzęta kontrolne i stresowane poddano testowi równolegle, w tym samym czasie. Test nagrywano za pomocą kamery a następnie analizowano manualnie z wykorzystaniem stopera. Łączny czas bezruchu w czterech ostatnich minutach trwania 6-minutowego testu stanowi miarę poziomu motywacji do ucieczki i ratowania się. Miarą obniżonej motywacji u myszy stresowanych (po procedurze CUS) jest wydłużony czas bezruchu w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

### 3.5.4. Test otwartego pola (OF)

Tydzień przed wykonaniem testu otwartego pola dwunastotygodniowe samce myszy szczepu C57BL/6J rozdzielono do pojedynczych klatek i codziennie przez siedem kolejnych dni (3-4 min/dzień) przyzwyczajano do ręki i obecności eksperymentatora. Test wykonano w fazie ciemnej cyklu dobowego przy czerwonym świetle. Test przeprowadzono 30 min po wykonaniu zastrzyku dootrzewnowego zawierającego roztwór agonisty 5-HT<sub>7</sub>R (LP) lub roztwór soli fizjologicznej (KTR). W teście OF myszy umieszczono pojedynczo na środku białego pudełka z pleksiglasu (33 x 33 x 20 cm) na 10 minut. Aktywność myszy, między innymi całkowita przebyta odległość (cm), rejestrowano i analizowano retrospektywnie przy użyciu programu do śledzenia wideo EthoVision™ (Noldus, Holandia). Aparat czyszczono 70% roztworem etanolu po badaniu każdej myszy, w celu usunięcia wszelkich śladów zapachowych.

## 3.6. Techniki biochemiczne

### 3.6.1. Elektroforeza białek w żelu denaturującym

Elektroforezę białek w żelu denaturującym (ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmliego (1970). Rozdział białek wykonywano przy użyciu systemu Tetra Cell (Bio-Rad). Przygotowywano dwuwarstwowe żele poliakryloamidowe o wymiarach 80 x 100 x 1 mm. Pierwszą warstwę stanowił żel zagęszczający składający się z: 5% akryloamid/bis akryloamid; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8. Z kolei żel rozdzielający zawierał: 15% akryloamid/bis akryloamid; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8. W składzie obu żeli znajdował się 0,1% SDS. Polimeryzacja żeli była indukowana przez dodanie nadsiarczanu amonu i katalizatora TEMED. Do próbek białkowych, przed nałożeniem na żel, dodawano odpowiednią

---

objętość stężonego buforu Laemmliego, a następnie próbki denaturowano przez 6 min w temperaturze 95°C. Elektroforezę prowadzono 30 min przy napięciu 90 V, a następnie 1 godz. przy 120 V. W celu identyfikacji analizowanych białek używano standardów o znanej masie cząsteczkowej białek firmy Thermo Scientific, o zakresie 10-180 kDa (nr. kat. 26616).

### 3.6.2. Technika western blot

Technika ta służy do identyfikacji określonych białek. Pierwszym jej etapem był opisany wyżej rozdział elektroforetyczny białek SDS-PAGE. Po SDS-PAGE przeprowadzano transfer białek z żelu na błonę PVDF Immobilon P (Millipore) metodą mokrego elektrotransferu, w buforze Towbin'a [Towbin i wsp., 1979], w aparacie firmy BioRad, stosując prąd o stałym natężeniu 350 mA przez 1,5 godz. w temperaturze 4°C. W celu oceny jakości i wydajności transferu, białka immobilizowane na błonie nitrocelulozowej barwiono w roztworze czerwieni Ponceau S. Po wybarwieniu błonę płukano buforem TBS-T i inkubowano w buforze blokującym przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzano całonocną immunodetekcję badanego białka poprzez inkubację błonyz odpowiednim przeciwciałem (tzw. przeciwciałem pierwszorzędowym) w temperaturze 4°C. Przeciwciała pierwszorzędowe oraz skład buforów blokujących użytych w niniejszej rozprawie doktorskiej wymieniono w Tabeli 3.

**Tabela 3. Spis użytych przeciwciał pierwszorzędowych oraz warunki reakcji immunoblottingu w technice western blot**

Przeciwciało	Firma, nr katalogowy	Rozcieńczenie	Bufor blokujący
Mysie monoklonalne anty-5-HT <sub>7</sub> R	Abcam/ab128892	1:1000	1 % BSA w TBS-T
Mysie monoklonalne anty-CDC42	Cell Signalling, 11A11	1:500	3 % BSA w TBS-T
Mysie monoklonalne anty-GAPDH	Milipore, MAB374	1:10000	5% mleko w TBS-T

Następnego dnia błonę płukano trzykrotnie buforem TBS-T przez 10 min i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP), rozcieńczonym w buforze blokującym. Błonę ponownie płukano buforem TBS-T, a następnie przeprowadzano detekcję reakcji immunologicznej stosując substrat

---

chemiluminescencyjny dla HRP, do wykrywania CDC42 i 5-HT<sub>7</sub>R – SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate lub do wykrywania GAPDH – SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific). Do wizualizacji wyników wykorzystywano system *Gbox chemi xt4* (Syngene). Oprogramowanie ImageJ zostało użyte do pomiaru średnich gęstości optycznych prążków odpowiadających 5-HT<sub>7</sub>R, CDC42 i GAPDH. Analizy biochemiczne zostały przeprowadzone we współpracy z dr Moniką Bijatą i mgr Krystianem Bijatą (Pracownia Biofizyki Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

### 3.6.3. Zymografia żelowa

Hipokampy myszy homogenizowano w buforze WB (50 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0,02% NaN<sub>3</sub>) w szklanym homogenizatorze. Homogenaty wirowano przez 15 min przy 12000 x g, w 4°C. Z supernatantu pobierano 5 µl w celu wyznaczenia stężenia białek metodą BCA (Thermo Scientific). Z kolei stężenie białka w próbkach wyrównywano poprzez rozcieńczanie buforem WB. W celu wzbogacenia supernatantu w żelatynazy (MMP-9 i MMP-2) używano złoża Gelatin Sepharose 4B (Amersham Biosciences). Złoże było płukane w buforze WB w proporcjach 1:1, a następnie wirowane 3 min przy 6000 x g w 4°C. Kulki żelatynowe zawieszono w buforze WB tak, aby końcowe stężenie wynosiło 50%. Następnie do 350 µl odpowiednio rozcieńczonych próbek dodawano po 100 µl 50% zawiesiny zrównoważonych kulek żelatynowych i inkubowano na rotatorze przez 16 godz. w 4°C, a następnie wirowano (15 min, 6000 x g, 4°C). Supernatant odrzucano, a kulki żelatynowe płukano 1 ml buforu WB. Po odwirowaniu kulki zawieszano w 40 µl buforu WB+DMSO (50 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 10% DMSO) i wytrząsano przy 1000 obr./min w 4°C, przez 2 godz. Ponownie próbki wirowano (15 min, 6000 x g, 4°C) i otrzymany supernatant mieszano z buforem 5x SB bez dodatku β-merkaptometanolu a następnie używano w zymografii żelowej. W tej technice, elektroforetyczny rozdział białek w próbce wykonywany został analogicznie do opisanej wyżej elektroforezy białek w żelu denaturującym z tą różnicą, że 8% żel rozdzielający zawiera dodatkowo żelatynę w stężeniu 1 mg/ml. Po zakończonej elektroforezie żele były płukane w 2,5% Triton X-100 przez 30 min w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowane w buforze wywołującym przez 24 godz. w 37°C. Następnie żele płukano wodą destylowaną przez 5 min i barwiono buforem zawierającym błękit Coomassie przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, po czym płukano w roztworze odbarwiacza przez około 1 godz. Do pomiaru średnich gęstości optycznych uzyskanych prążków, odpowiadających MMP-9 i MMP-2, stosowano oprogramowanie ImageJ.

### 3.6.4. Test aktywności CDC42

Hipokampy myszy po CUS homogenizowano w buforze lizującym, a następnie wirowano 14000 x g przez 10 min. Z supernatantu pobierano 5  $\mu$ l w celu wyznaczenia stężenia białka metodą BCA (Thermo Scientific). Stężenia białka w próbkach wyrównywano poprzez rozcieńczanie wyżej wymienionym buforem. Otrzymane ekstrakty białkowe inkubowano ze złożem zawierającym związane białko fuzyjne GST-PAK-PBD (Cell BioLabs) w 4°C przez noc, a następnie płukano w buforze do homogenizacji. Frakcję aktywnej formy GTPazy CDC42 wykrywano za pomocą techniki western blot z użyciem odpowiedniego przeciwciała (Cell Signalling, 11A11).

Bufory użyte w technikach biochemicznych opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4. Spis użytych buforów w technikach biochemicznych**

Nazwa	Skład
10 x bufor do elektroforezy białek w żelu poliakryloamidowym (Tris-glicyna-SDS)	0,25 M Tris pH 8,4; 2 M glicyna; 10% SDS
10 x TBS	0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,5
1 x TBS-T	0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,1% Tween20
1 x bufor Towbin'a	0,025 M Tris Base; 0,192 M glicyny; 1% SDS; 20% metanol
5 x bufor Laemmliego	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 50% glicerol; 10% SDS; 25% $\beta$ -merkaptoetanol; 0,0125% błękit bromofenolowy
Bufor zawierający błękit Coomassie	0,25% błękit Coomassie, 40% metanol, 10% kwas octowy
Roztwór odbarwiacza	40% metanol; 10% kwas octowy
Bufor blokujący błony nitrocelulozowe	5% mleko odtłuszczone w 1x TBS-T
Roztwór czerwieni Ponceau S	0,25% czerwień Ponceau S; 40% metanol; 15% kwas octowy
Bufor WB	50mM Tris-Cl (pH 7,5); 150mM NaCl, 5mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,02% NaN <sub>3</sub>
Bufor zawierający substrat HRP	Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific 34095);

	SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific 34577)
Bufor lizujący	25 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EDTA; 2% glicerol
Bufor wywołujący w zymografii żelowej	50 mM Tris-Cl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 μM ZnCl <sub>2</sub> ; 1% Triton X-100; 0,02% NaN <sub>3</sub> , pH 7,5

### 3.7. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Izolację całkowitego RNA z tkanki mózgowej (*Stratum Oriens* i *Stratum Radiatum* regionu CA1 hipokampa lub całego regionu CA1 hipokampa myszy) przeprowadzono przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). Równe ilości RNA transkrybowano przy użyciu zestawu SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Poziomy ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R analizowano z użyciem systemu StepOne (Applied Biosystems) przy zastosowaniu TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) oraz zestawu Gene Expression Assays (ThermoFisher). Analize ilościową poziomów ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R przeprowadzono równolegle z analizą ekspresji GAPDH (białko referencyjne) stosując następujące sekwencje starter/sonda:

- E1-F2: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3';
- E1-R2: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3';
- sonda 5'/6FAM/CCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAAC/TAMRA/-30 (Sigma).

### 3.8. Badanie struktury kolców dendrytycznych

#### 3.8.1. Znakowanie neuronów metodą biolistyczną

Aby zobrazować zmiany w strukturze neuronów, wykonano barwienie utrwalonych całych skrawków myszy nadchloranem 1,10-dioktadecylo-3,3,3,3-tetrametyloindokarbocyaniny (DiI; Invitrogen). Barwnik fluorescencyjny DiI wykazuje właściwości lipofilne i wbudowuje się do błon komórkowych. Barwnik ten wprowadzono do komórek za pomocą bombardowania działem genowym (Helios, Gene Gun System, Bio-Rad). W celu przygotowania cząstek wolframu pokrytych barwnikiem DiI najpierw zawieszono DiI (5mg, Invitrogen) w dichlorometanie (5000 μg/ml w metanolu SUPELCO), które następnie rozprowadzono na szkiełku podstawowym, na którym znajdowała się cienka warstwa mikrocząsteczek wolframowych (150 mg, Tungsten M-20 1,3 μM Biorad). Tak przygotowaną monowarstwę polewano trzykrotnie zawieszonym w dichlorometanie barwnikiem DiI. Po wyschnięciu, pokryte barwnikiem cząstki wolframu

---

zawieszano w wodzie i sonikowano przez 30 minut. Wyplukaną w etanolu (EtOH, 99,8%) rurkę do przygotowania naboji do działu genowego (Tefzel Tubing BioRad) pokrywano poliwinylpirolidonem (PVP, BioRad) przygotowanym wcześniej, przez rozpuszczenie roztworu wodnego PVP 20 mg/ml PVP w etanolu (EtOH 99,8%) w stosunku 1:200. Następnie rurkę wypełniono zawiesiną mikrocząstek wolframowych i mieszano ją przez 30 min w stacji do przygotowania naboji (Tubing preparation system, BioRad). Następnie rurkę suszono azotem o przepływie 0,1 LPM AIR przez 30 min oraz 1 godz. 0,4 LPM AIR. Tak przygotowaną rurkę cięto gilotyną (Tubing preparation system, BioRad) na naboje o długości 1 cm, które przechowywano w ciemności, w temperaturze pokojowej.

Myszy po procedurze CUS zostały poddane eutanazji przez przerwanie rdzenia kręgowego, a następnie dekapitacji. W celu wyeliminowania wpływu anestetyków na plastyczność synaptyczną, eutanazja została przeprowadzana bez dodatkowych środków farmakologicznych (zgodnie z otrzymanymi zgodami I Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie). Po dekapitacji mózgi myszy wyizolowano i opłukano zimnym roztworem PBS (1x), a następnie inkubowano przez 1 godz. w buforze 4% paraformaldehydu rozpuszczonego w PBS (1x). Następnie mózg pocięto koronalnie na skrawki o grubości 140  $\mu\text{m}$  przy użyciu wibratomu (Leica). W celu regeneracji tkanki po procedurze krojenia, skrawki zawierające struktury hipokampa, kory przedczołowej oraz ciała migdałowego, pozostawiono na 1,5 godz. w roztworze PBS w temperaturze pokojowej. Losowe znakowanie komórek przeprowadzono przy użyciu uprzednio przygotowanych mikrocząstek wolframu o średnicy 1,6  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) pokrytych barwnikiem fluorescencyjnym (DiI;) dostarczanym do komórek przy użyciu działu genowego przy ciśnieniu helu doprowadzonego do działu wynoszącym 100 psi. Wyznakowane skrawki inkubowano przez 12 godz. w temperaturze 4°C w buforze PBS, w miejscu niedostępnym dla światła. Następnie skrawki dodatkowo utrwalano w buforze 1,5% paraformaldehydu rozpuszczonego w PBS (1x) przez 1,5 godz. w temperaturze pokojowej. Skrawki wykładano na szkiełka podstawowe i zatapiano odczynnikami Fluoromount-G (Invitrogen, 00-4958-02) umożliwiającym obrazowanie preparatów z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej.

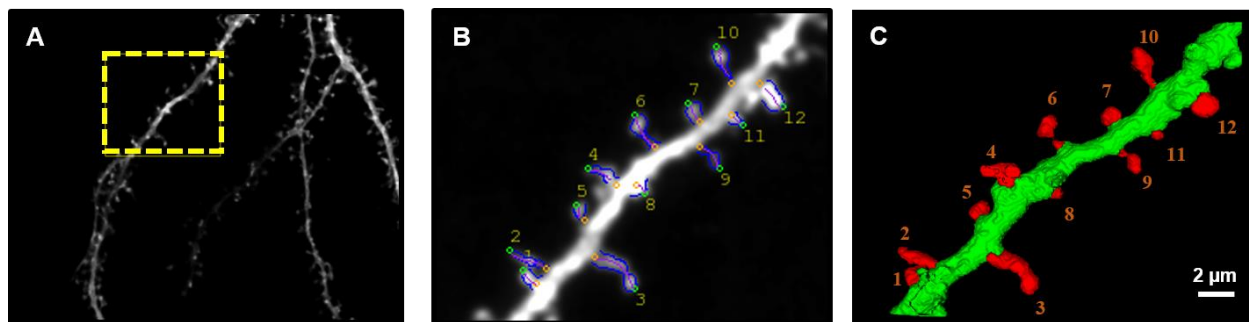
### **3.8.2. Obrazowanie kolców dendrytycznych**

Obrazowanie wyznakowanych skrawków mózgu przeprowadzono z wykorzystaniem fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej (Zeiss LSM800). Zdjęcia dendrytów neuronów z regionów CA1 (łac. *cornu ammonis 1*), CA3 (łac. *cornu ammonis 3*) i zakrętu zębatego (łac. *gyrus dentatus*, DG) hipokampa oraz neuronów kory przedczołowej i ciała migdałowego wykonywano w ustalonej odległości od ciała komórki (50 – 200  $\mu\text{m}$ ). Serie obrazów wzdłuż osi z zbierano w odstępach

wynoszących 0,4  $\mu\text{m}$ , przy rozdzielczości 1024 x 1024 i w dodatkowym powiększeniu 2,4x, co pozwalało na uzyskanie wielkości piksela wynoszącej 0,07  $\mu\text{m}$  x 0,07  $\mu\text{m}$ . Podczas obrazowania używano wzbudzenia światłem lasera o długości fali 561 nm oraz obiektywu 63x o aperturze numerycznej 1,4 NA. Obrazy otrzymane z mikroskopu konfokalnego przetworzono przy użyciu oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### 3.8.3. Analiza struktury kolców dendrytycznych

Otrzymane obrazy konfokalne zawierające fragmenty dendrytów pokryte kolcami dendrytycznymi poddano analizie strukturalnej w obrębie poszczególnych parametrów morfometrycznych (długość kolca, szerokość główki, całkowita powierzchnia) oraz analizie gęstości kolców na dendrycie. W tym celu zastosowano programy bioinformatyczne umożliwiające analizę strukturalną w dwóch wymiarach (SpineMagick) oraz w trzech wymiarach (3dSpAn), jak opisano w pracach: [Basu i wsp., 2018; Bijata i wsp., 2022a; Das i wsp., 2021; Figiel i wsp., 2022; Krzystyniak i wsp., 2019; Strackeljan i wsp., 2021]. Obie metody analizy struktury kolców pozwalają na uzyskanie powtarzalnych wyników z dużą dokładnością. Program 3DSpAn (analiza 3D) został stworzony z wykorzystaniem obrazów uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Analiza porównawcza otrzymanych wyników z wykorzystaniem algorytmów SpineMagick i 3dSpAn nie wykazała istotnych różnic między programami wskazując, że analiza struktury kolców dendrytycznych w 3D nie dostarcza dodatkowych informacji na otrzymanym zestawie danych. W związku z tym, kompleksową analizę morfometryczną kolców dendrytycznych myszy kontrolnych i poddanych CUS (ANH i RES), wykonano w 2D przy wykorzystaniu oprogramowania SpineMagick (półautomatyczne oprogramowanie stworzone na zamówienie, patent nr WO/2013/021001). Rycina 11 przedstawia segmentację i analizę 2D oraz 3D tego samego fragmentu dendrytu pokrytego kolcami dendrytycznymi.



**Rycina 11. (A) Przykładowy obraz konfokalny drzewka dendrytycznego komórki hipokampa na fragmencie, którego wykonano segmentację kolców dendrytycznych (B) w dwóch wymiarach z użyciem programu informatycznego SpineMagick oraz (C) w trzech wymiarach z użyciem stworzonego programu 3dSpAn.**



---

Analizowane kolce dendrytyczne zlokalizowane były na dendrytach drugo- i trzeciorzędowych, co umożliwiło zminimalizowanie różnic w strukturze kolców dendrytycznych wynikających z położenia ich na dendrytach o różnych kategoriach. W związku z tym, że kolce dendrytyczne cechuje duża zmienność strukturalna, w analizie kształtu kolców wykorzystano bezskalowy parametr względnych zmian stosunku długości kolca do szerokości jego główki (długość/szerokość główki). Parametr ten odzwierciedla kształt kolca – im jego wartość jest większa tym kolce są bardziej cienkie i wydłużone, natomiast zmniejszenie tej wartości świadczy o skracaniu długości kolca i/lub zwiększaniu powierzchni jego główki, co wskazuje na powstawanie bardziej stabilnych połączeń synaptycznych. W oprogramowaniu SpineMagick długość kolca dendrytycznego określono poprzez pomiar długości krzywoliniowej wzdłuż dopasowanego wirtualnego szkieletu kształtu kolca. Procedurę dopasowania przeprowadzono szukając krzywej, wzdłuż której emitowana fluorescencja była najbardziej intensywna. Z kolei szerokość główki zdefiniowano przez średnicę największego odcinka kolca z wyłączeniem dolnej części kolca (1/3 długości kolca przylegającego do dendrytu). Analizie morfometrycznej poddano segmenty dendrytyczne komórek hipokampa (po 5 zwierząt na grupę behawioralną; 70-93 dendryty/grupę), komórek kory przedczołowej (po 3 zwierzęta na grupę behawioralną; 29-32 dendryty/grupę) oraz komórek ciała migdałowatego (po 3-5 zwierząt na grupę behawioralną; 10-28 dendryty/grupę). Aby ocenić całkowitą długość przeanalizowanych dendrytów zmierzono długość krzywoliniową wzdłuż analizowanego odcinka dendrytycznego, która została uzyskana przez dopasowanie wielomianu rzędu  $n$ . Następnie przy zastosowaniu oprogramowania ImageJ zliczono manualnie liczbę kolców dendrytycznych na uprzednio zmierzonej długości dendrytów wyliczając w ten sposób gęstość kolców na 100  $\mu\text{m}$  długości dendrytu.

### 3.9. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne i wizualizacja wyników przeprowadzono przy zastosowaniu oprogramowania GraphPad Prism8 (GraphPad Software). Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej ze wszystkich zebranych pomiarów, z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM). W celu sprawdzenia spełnienia warunków rozkładu normalnego prób danej grupy oraz jednorodności ich wariancji zastosowano kolejno test Shapiro – Wilka oraz test Fishera. Do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy dwoma wariantami doświadczalnymi spełniającymi założenia testu parametrycznego zastosowano test t-Studenta. W przypadku nierównych wariancji stosowano poprawkę Welcha, natomiast jeżeli dane nie spełniały założeń rozkładu normalnego, stosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Do porównań wielokrotnych zastosowano analizę wariancji (ANOVA), a następnie odpowiednie dla zestawu

---

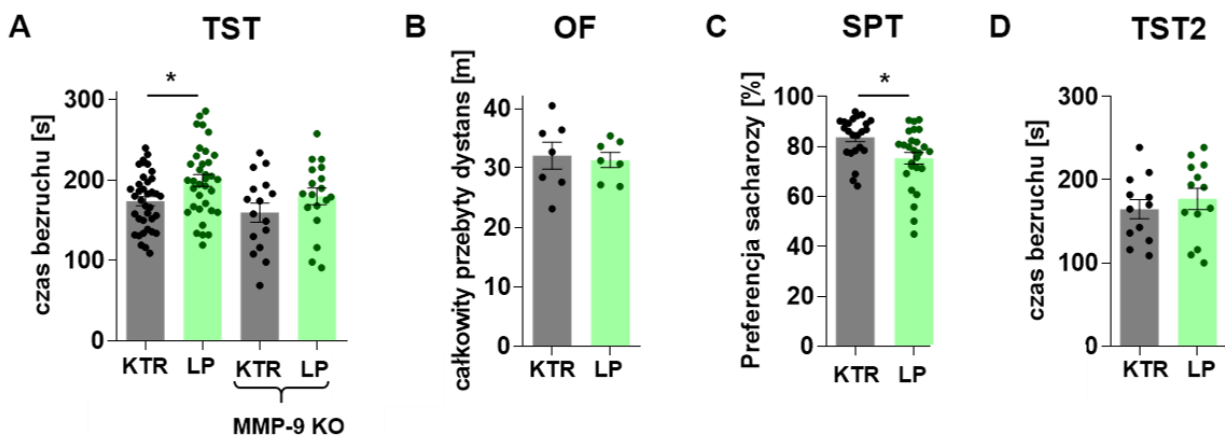
danych testy post-hoc (test Tuckey, test Dunn'a, lub test Holm-Sidak). Wyniki otrzymane za pomocą techniki western blot i zymografii żelowej analizowano ilościowo przez dodanie do siebie poszczególnych powtórzeń (każdy punkt danych na powtórzeniu podzielony został przez sumę wartości wszystkich punktów danych w powtórzeniu) [Degasperi i wsp., 2014]. Wyniki te zostały następnie znormalizowane do warunku kontrolnego. Analizy behawioralne i analizy plastyczności strukturalnej przeprowadzono w sposób zaślepiony. Rodzaj testu statystycznego zastosowany dla konkretnego zbioru danych został wskazany w opisie wyników danego eksperymentu. Zastosowano następujące oznaczenia poziomów istotności: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

---

## 4. WYNIKI

### 4.1. Stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R indukuje zależne od MMP-9 zachowania typu depresyjnego u myszy

W celu poznania roli 5-HT<sub>7</sub>R w rozwoju zachowań typu depresyjnego przeprowadzono charakterystykę behawioralną dorosłych samców myszy po ogólnoustrojowej aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R. Schemat eksperymentu został przedstawiony na Rycinie 8 w *Materiały i Metody*. Analiza parametrów behawioralnych wykazała, że krótkoterminowa (30 min) aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do obniżenia poziomu motywacji mierzonej wydłużeniem czasu bezruchu w teście podwieszania za ogon ( $p = 0,010$ ; dwukierunkowa analiza ANOVA,  $N_{LP} = 35$ ,  $N_{KTR} = 37$ ) /Rycina 12.(A)/, nie wpływając na ogólną aktywność lokomotoryczną zwierząt mierzoną w teście otwartego pola ( $p = 0,783$ ; niesparowany test t-Studenta,  $N_{LP} = 7$ ,  $N_{KTR} = 7$ ) /Rycina 12.(B)/. U myszy traktowanych agonistą 5-HT<sub>7</sub>R (LP) zaobserwowano także spadek preferencji sacharozy (anhedonię) w porównaniu do grupy traktowanej solą fizjologiczną ( $p = 0,012$ ; test Manna-Whitneya,  $N_{LP} = 26$ ,  $N_{KTR} = 23$ ) /Rycina 12.(C)/. Co więcej, po dziewięciu godzinach od wykonania iniekcji dootrzewnowej nie zaobserwowano utrzymującego się wzrostu czasu bezruchu w teście podwieszania za ogon u grupy traktowanej LP w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,479$ ; niesparowany test t-Studenta,  $N_{LP} = 13$ ,  $N_{KTR} = 12$ ) /Rycina 12.(D)/. Ponadto aby sprawdzić, czy wzrost zachowań typu depresyjnego (tj. obniżona motywacja) 30 min po aktywacji 5-HT<sub>7</sub>R jest zależny od MMP-9, przeprowadzono analogiczny eksperyment z wykorzystaniem testu podwieszania za ogon na myszach pozbawionych ekspresji MMP-9 (MMP-9 KO). Zaobserwowano, że u myszy MMP-9 KO wstrzyknięcie LP nie wpływało na czas bezruchu w TST w porównaniu do myszy kontrolnych ( $p = 0,162$ ; dwukierunkowa analiza ANOVA z dwustopniową liniową procedurą stopniową Benjaminiego, Kriegera i Yekutieli,  $N_{MMP-9\ KO/LP} = 18$ ,  $N_{MMP-9\ KO/KTR} = 16$ ) /Rycina 12.(A)/. Pomimo wykorzystania w eksperymencie mniejszej liczby zwierząt KO podjęto się również sprawdzenia czy zwiększenie liczby zwierząt do 36 osobników w grupie mogłoby doprowadzić do osiągnięcia istotności statystycznej na poziomie obserwowanym u zwierząt o fenotypie dzikim. W tym celu przeprowadzono dodatkową analizę metodą szacowania rozkładu błędów estymacji, za pomocą wielokrotnego losowania ze zwracaniem z próby (z ang. *bootstrap*). Analiza *bootstrap* wykazała, że przy założeniu liczebności grupy KO stanowiącej 36 myszy, prawdopodobieństwo istotności statystycznej poniżej  $p = 0,010$  wynosi 24%. Otrzymane wyniki wskazują, że aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R, w którym pośredniczy MMP-9, jest zaangażowana w rozwój zachowań typu depresyjnego u myszy.

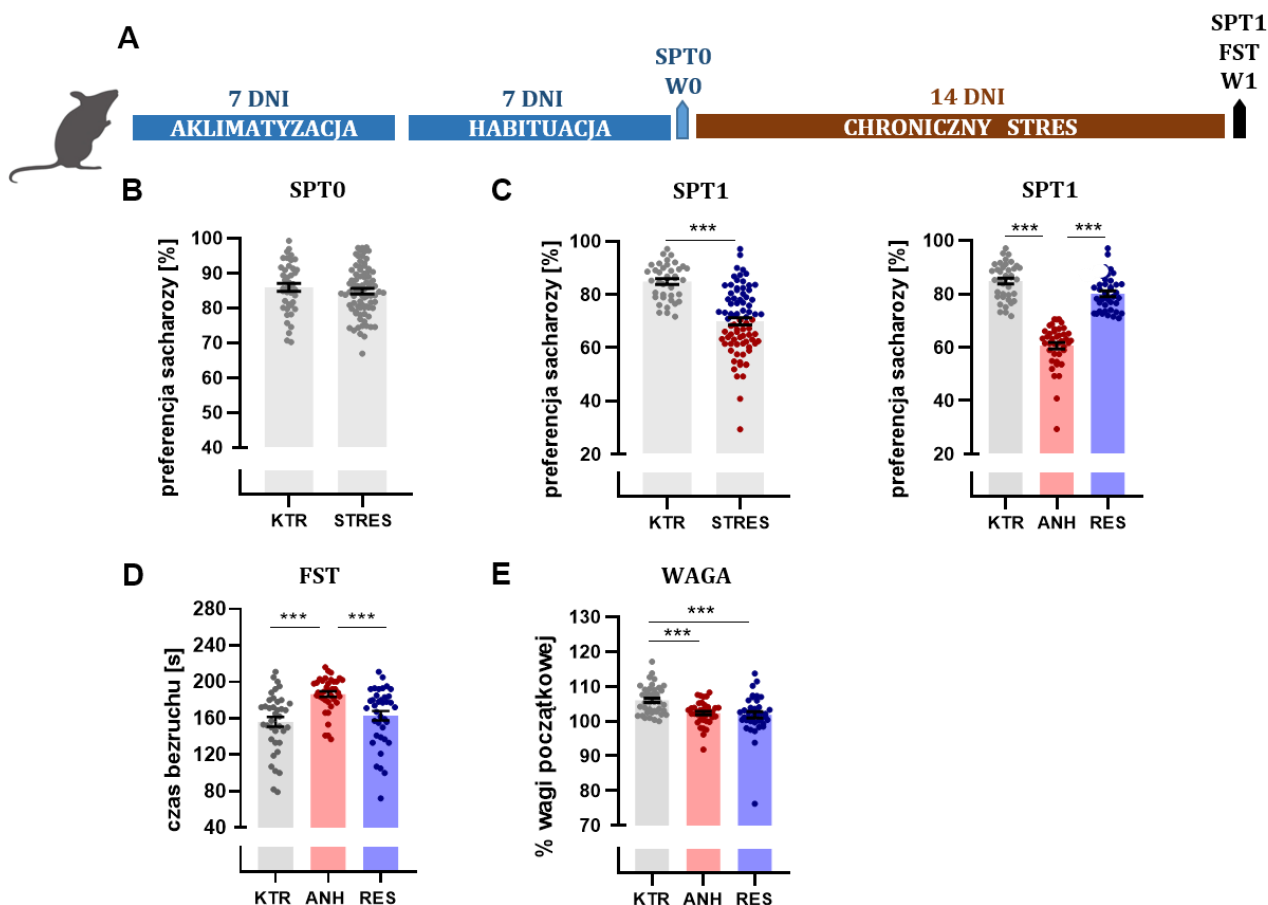


**Rycina 12. Aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* prowadzi do rozwoju zachowań typu depresyjnego.** (A) Czas bezruchu w teście podwieszania za ogon (TST) 30 min. od wykonania iniekcji dootrzewnowej roztworem soli fizjologicznej (KTR) lub agonistą receptora 5-HT<sub>7</sub> (LP) myszy o fenotypie dzikim oraz myszy pozbawionych ekspresji MMP-9 – MMP-9 KO (dwukierunkowa analiza ANOVA). (B) Całkowity przebyty dystans w teście otwartego pola (OF) 30 min. od wykonania iniekcji dootrzewnowej KTR lub LP (niesparowany test t-Studenta). (C) Preferencja sacharozy w teście preferencji sacharozy (SPT) 8 godz. od wykonania iniekcji dootrzewnowej KTR lub LP (test Manna-Whitneya). (D) Czas bezruchu w teście podwieszania za ogon (TST2) 9 godz. od wykonania iniekcji dootrzewnowej KTR lub LP (niesparowany test t-Studenta). Dane przedstawiono jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05.

#### 4.2. Chroniczny stres prowadzi do rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy

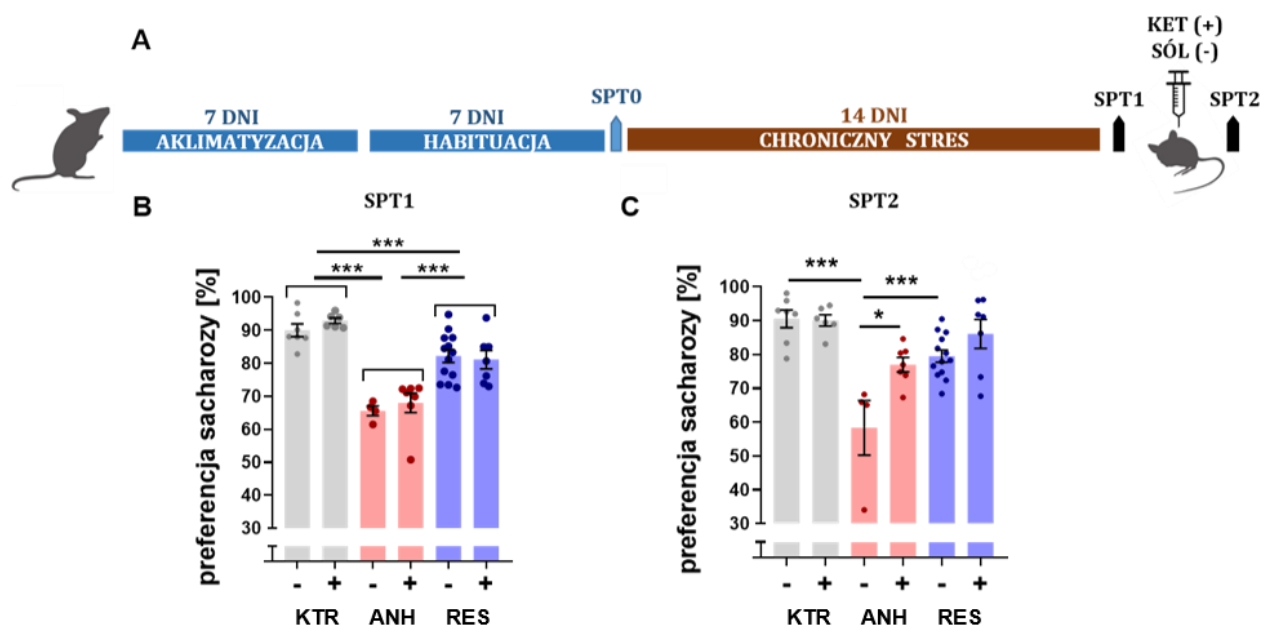
Wykazano, że zastosowanie procedury CUS prowadzi do rozwoju dwóch typów zachowań u myszy: zachowań anhedonicznych (ANH) i zachowań rezylientnych (RES) różniących się wartością preferencji sacharozy w SPT1 /Rycina 13.(A-C)/. Myszy zaklasyfikowano jako myszy ANH jeśli wykazywały preferencję sacharozy w SPT1 < 70,41%. Wartość ta została zdefiniowana poprzez różnicę > 2x odchylenie standardowe między grupą kontrolną (KTR) i stresowaną (p < 0,0001; test Kruskal-Wallis, N<sub>KTR</sub> = 39, N<sub>ANH</sub> = 42, N<sub>RES</sub> = 39) /Rycina 13.(C)/. W populacji myszy ANH zaobserwowano zwiększony czas bezruchu w teście wymuszonego pływania (FST) świadczący o obniżonej motywacji w porównaniu ze zwierzętami niestresowanymi i rezylientnymi (KTR vs. ANH p < 0,0001; KTR vs. RES p < 0,001; analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a) /Rycina 13.(D)/. Myszy, które wykazywały preferencję sacharozy powyżej 70,41% zaklasyfikowano do grupy myszy RES. Zwierzęta RES po procedurze CUS nie wykazywały parametrów behawioralnych jak myszy ANH, tj. brak istotnych różnic w preferencji sacharozy w SPT1 oraz w czasie bezruchu w FST w porównaniu do myszy KTR /Rycina 13.(C-D)/. Po procedurze CUS, zarówno myszy ANH, jak i RES charakteryzowały się mniejszym przyrostem masy ciała w porównaniu z myszami KTR (p < 0,0001; test Kruskal-Wallis, N<sub>KTR</sub> = 39, N<sub>ANH</sub> = 42, N<sub>RES</sub> = 39) /Rycina 13.(E). Podsumowując, zastosowany protokół CUS prowadzi

do rozwoju zachowań anhedonicznych u  $52,07\% \pm 7,94\%$  myszy, podczas gdy pozostałe osobniki ( $47,93 \pm 7,94\%$ ) wykazują fenotyp rezylentny /Rycina 13.(C)/.



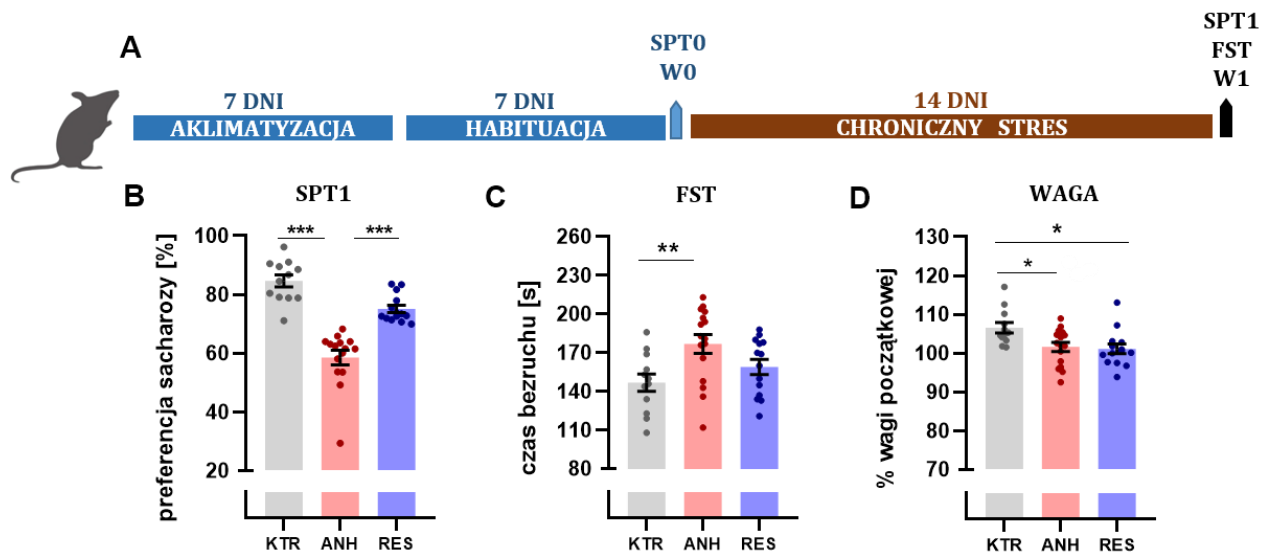
**Rycina 13. Chroniczny nieprzewidywalny stres prowadzi do rozwoju anhedonii i rezylencji u myszy.** (A) Schematyczne przedstawienie planu eksperymentalnego. (B) Bazowa preferencja sacharozy w SPT0, (C) Preferencja sacharozy po ekspozycji na chroniczny stres w SPT1. (D) Czas bezruchu w teście wymuszonego pływania, FST. (E) % wagi początkowej. Dla porównania trzech grup została przeprowadzona analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a (SPT) lub Tuckey'a (FST, waga), natomiast dla porównania dwóch grup niesparowany test t-Studenta. Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \*\*\* < 0,001.

Ponadto w celu lepszego zrozumienia różnic behawioralnych występujących w fenotypach ANH i RES, podjęto się weryfikacji czy myszy ANH i RES wykazują różnice we wrażliwości na interwencję farmakologiczną ketaminą. Przeprowadzone analizy wykazały wzrost preferencji sacharozy u myszy ANH traktowanych ketaminą w porównaniu z myszami ANH traktowanymi solą fizjologiczną ( $p = 0,010$ ; Analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Holm-Sidak) /Rycina 14/. Myszy RES, które otrzymały ketaminę nie wykazywały istotnych różnic w preferencji sacharozy (SPT2) w porównaniu do myszy RES, które otrzymały sól fizjologiczną.



**Rycina 14. Preferencja sacharozy myszy anhedonicznych (ANH) i rezyliencych (RES) po interwencji farmakologicznej.** (A) Schematyczne przedstawienie planu eksperymentalnego. (B) Test preferencji sacharozy po ekspozycji na chroniczny stres (SPT1). (C) Test preferencji sacharozy 24 godz. po wykonaniu dootrzewnowej iniekcji ketaminy w dawce 3mg/kg masy ciała lub soli fizjologicznej (SPT2). Analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Holm-Sidak. Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $< 0,001$ .

Podsumowując, wyniki otrzymane z analiz behawioralnych wykazały, że wdrożenie procedury CUS u dorosłych myszy prowadzi do rozwoju anhedonii lub rezyliencji. W celu sprawdzenia czy szlak sygnałowy 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 aktywowany jest w hipokampie myszy po ekspozycji na CUS, do dalszych analiz biochemicznych wybrano reprezentatywne zwierzęta z wyżej wymienionych grup behawioralnych, których parametry behawioralne (SPT1, FST, wagę) przedstawiono na Rycinie 15.

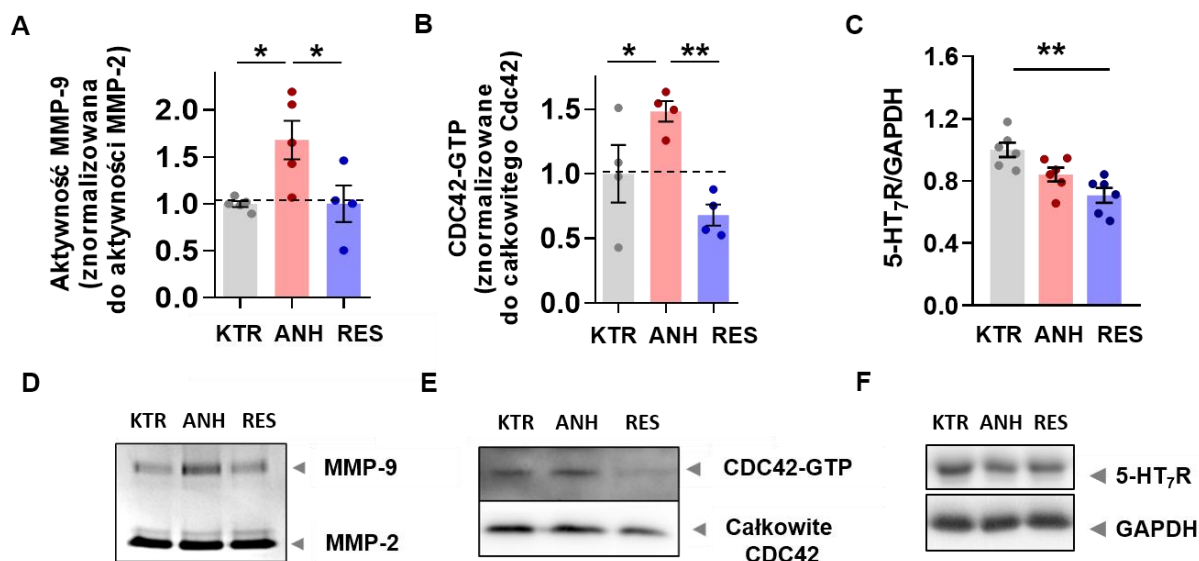


**Rycina 15. Charakterystyka behawioralna reprezentatywnych myszy wybranych do dalszych analiz biochemicznych i analiz plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych. (A)** Schematyczne przedstawienie planu eksperymentalnego. **(B)** Preferencja sacharozy po ekspozycji na chroniczny stres w SPT1. **(C)** Czas bezruchu w teście wymuszonego pływania, FST. **(D)** % wagi początkowej po procedurze chronicznego nieprzewidywalnego stresu. Analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a (SPT) lub Tuckey'a (FST, waga). Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.3. Szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R aktywowany jest w hipokampie myszy poddanych ekspozycji na chroniczny stres

W celu zbadania czy szlak sygnałowy 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 jest aktywowany u myszy po CUS przeprowadzono analizy biochemiczne, które wykazały, że zarówno aktywność MMP-9, (MMP-9: KTR vs. ANH  $p = 0,029$ ; ANH vs. RES  $p = 0,041$ ; analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Sidak'a) /Rycina 16.(A)/, jak i aktywność CDC42 (CDC42: KTR vs. ANH  $p = 0,041$ ; ANH vs. RES  $p = 0,008$ ; jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Sidak'a) w hipokampie zwierząt ANH były zwiększone w porównaniu do poziomów aktywności MMP-9 i CDC42 myszy KTR i RES /Rycina 16.(B)/. Poziom ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R po CUS nie różnił się między myszami ANH i KTR, podczas gdy u myszy RES zaobserwowano istotnie obniżoną ekspresję 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie w porównaniu do myszy KTR (KTR vs. RES  $p = 0,001$ ; analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Sidak'a) /Rycina 16.(C)/.

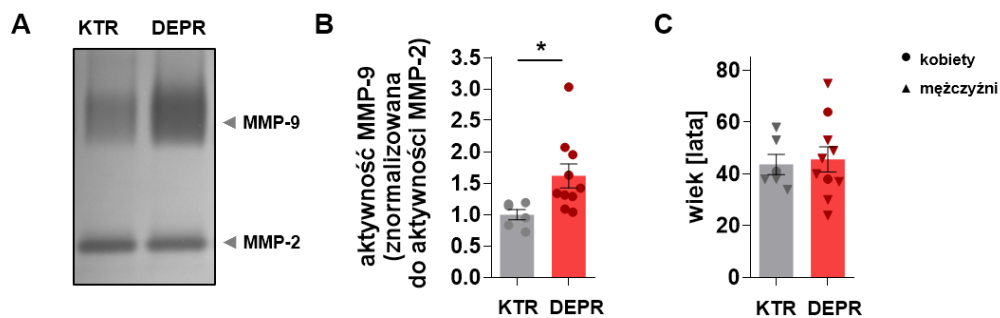
Podsumowując, otrzymane wyniki wykazały aktywację szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 w hipokampie myszy ANH.



**Rycina 16. Chroniczny stres prowadzi do aktywacji szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 w hipokampie myszy ANH.** (A) Analiza ilościowa aktywności MMP-9 mierzona jako stosunek aktywności MMP-9/MMP-2. (B) Aktywność CDC42 mierzona jako stosunek CDC42-GTP do całkowitego poziomu CDC42. (C) Poziom ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie myszy KTR, ANH, RES. Reprezentatywne fragmenty obrazów zymografii żelowej oraz western blot wizualizujące (D) wzrost aktywności MMP-9 i (E) CDC42 u myszy ANH oraz (F) obniżoną ekspresję 5-HT<sub>7</sub>R u myszy RES w porównaniu do myszy KTR. Dla porównania trzech grup została przeprowadzona analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Sidak'a. Dane przedstawiono jako średnie wartości ± SEM. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

#### 4.4. Podwyższona aktywność MMP-9 w hipokampie osób cierpiących na depresję

Dodatkowo, zbadano czy analogiczne zmiany występują również u osób chorujących na depresję. W tym celu przeprowadzono analizę biochemiczną *post mortem* aktywności MMP-9 w hipokampie osób, które popełniły samobójstwo i które w obrazie klinicznym przejawiały wcześniej objawy depresyjne (DEPR). Analizy wykazały, że osoby cierpiące na depresję cechuje podwyższona aktywność MMP-9 w hipokampie /Rycina 17.(A-C)/ w porównaniu do osób zdrowych (p = 0,030; niesparowany test t-Studenta).



**Rycina 17. Wzrost aktywności MMP-9 w hipokampie osób cierpiących na depresję.** (A) Reprezentatywny żel obrazujący aktywność żelatynaz w próbkach pośmiertnych osób ze zdiagnozowaną depresją, które popełniły samobójstwo (N<sub>DEPR</sub> = 10) i osób kontrolnych (N<sub>KTR</sub> = 6). (B) Ilościowa analiza aktywności MMP-9 w stosunku do aktywności MMP-2 (niesparowany test t-Studenta). (C) Wykres przedstawiający wiek



---

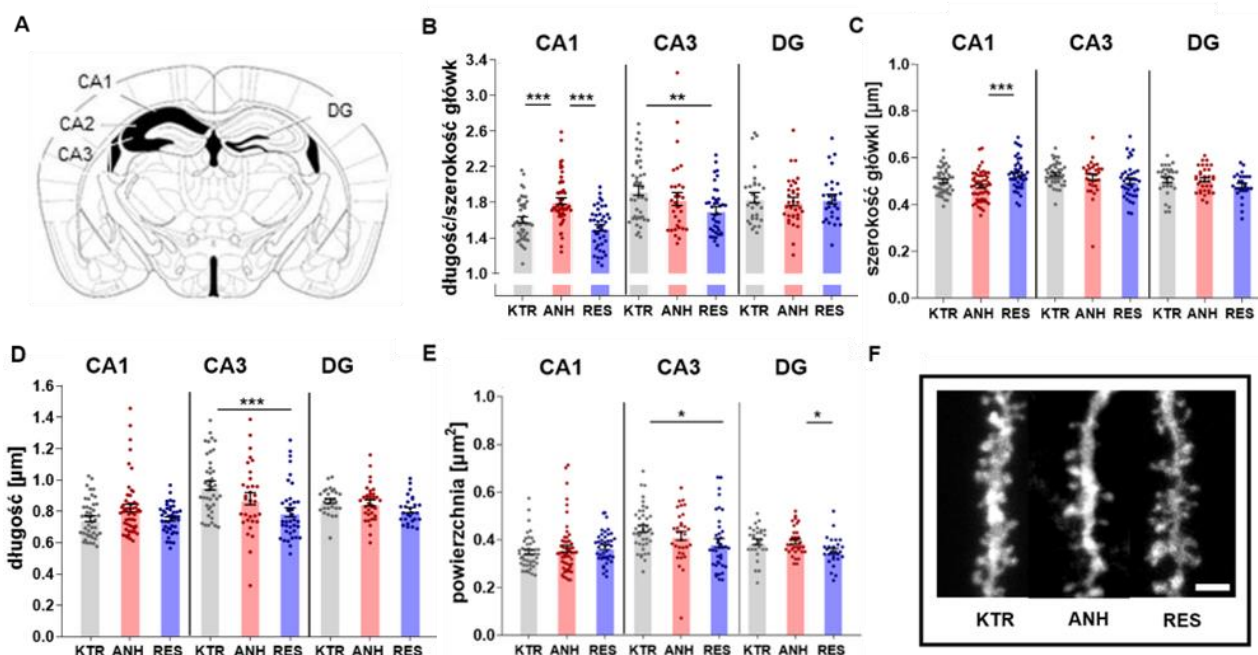
i pięć osób badanych. Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ . Analizy biochemiczne zostały przeprowadzone we współpracy z mgr Krystianem Bijatą (Pracownia Biofizyki Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

#### **4.5. Aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R w wyniku ekspozycji na chroniczny stres prowadzi do zburzonej plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa**

W nawiązaniu do badań Bijata i wsp. (2017), w których wykazano, że aktywacja szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 powoduje zmiany strukturalne kolców dendrytycznych (tj. ich wydłużanie) w pierwotnych hodowlach komórek hipokampa, podjęto się zbadania czy podobne zmiany w strukturze kolców dendrytycznych są obecne również *in vivo* w hipokampie myszy ANH, u których szlak ten jest aktywowany.

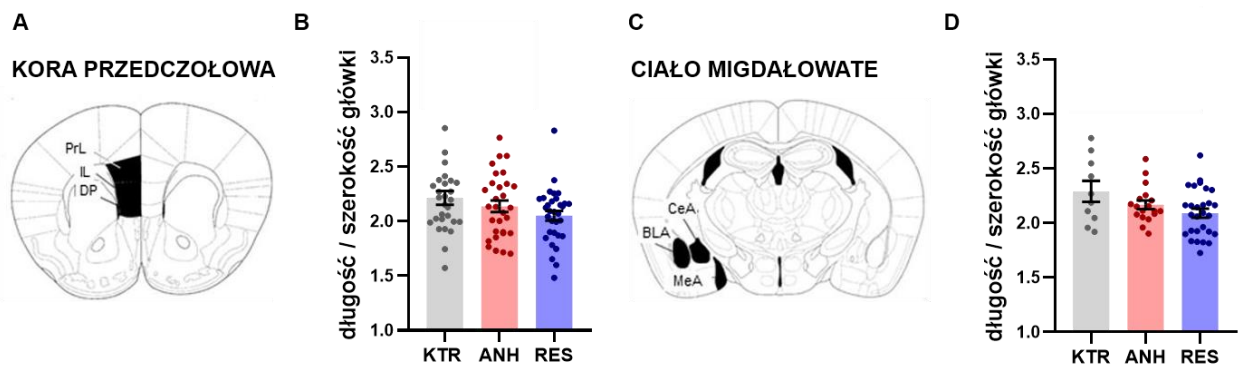
Analizę morfometryczną kolców dendrytycznych przeprowadzono oddzielnie dla każdego z regionów hipokampa: CA1, CA3, DG /Rycina 18.(A)/. Otrzymane wyniki wykazały, że anhedonia wywołana CUS prowadzi do wydłużania kolców dendrytycznych (większa wartość parametru stosunku długości do szerokości główki kolca) /Rycina 18.(B)/. Zaobserwowane wydłużanie kolców dendrytycznych myszy ANH w porównaniu do myszy KTR i RES, występowało wyłącznie w regionie CA1 hipokampa ( $p < 0,001$ ; analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a) /Rycina 18.(B)/. Szczegółowa analiza poszczególnych parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych wykazała także, że kolce dendrytyczne myszy RES w regionie CA1 cechuje zwiększona szerokość główki w porównaniu do myszy ANH ( $p < 0,001$ ; analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 18.(C)/, przy jednoczesnym braku różnic w długości /Rycina 18.(D)/ i powierzchni kolców /Rycina 18.(E)/.

Podsumowując, u zwierząt ANH w regionie CA1 hipokampa kolce dendrytyczne uległy wydłużeniu, podczas gdy u myszy RES zaobserwowano wzrost szerokości główki wykazując, że myszy RES wykształciły bardziej stabilne połączenia synaptyczne w tym regionie pomimo doświadczania takiej samej procedury stresowania jak myszy ANH. Reprezentatywne zdjęcia kolców dendrytycznych regionu CA1 hipokampa myszy po procedurze CUS przedstawiono na Rycinie 18.(F).



**Rycina 18. Analiza morfometryczna kolców dendrytycznych myszy poddanych chronicznemu stresowi wykazała zmiany strukturalne kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa u myszy ANH. (A)** Rysunek skrawka mózgu myszy z atlasu neuroanatomicznego przedstawiający regiony CA1, CA3, DG hipokampa. Analiza ilościowa poszczególnych parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych: **(B)** stosunku długości do szerokości główki kolca, **(C)** szerokości główki, **(D)** długości, **(E)** powierzchni kolca dendrytycznego (analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a). **(F)** Reprezentatywne obrazy konfokalne przedstawiające fragmenty dendrytów pokryte kolcami dendrytycznymi komórek piramidowych regionu CA1 hipokampa myszy KTR, ANH i RES. Skala 2 µm. KTR  $N_{kolce} = 7735$ ,  $N_{dendryty} = 116$ ; ANH  $N_{kolce} = 7918$ ,  $N_{dendryty} = 120$ ; RES  $N_{kolce} = 7026$ ,  $N_{dendryty} = 107$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $< 0,001$ .

W celu sprawdzenia czy obserwowane zmiany kształtu kolców dendrytycznych są charakterystyczne dla regionu CA1 hipokampa, przeprowadzono także analizę morfometryczną kolców dendrytycznych w innych strukturach mózgu, szczególnie wrażliwych na wpływ chronicznego stresu - korze przedczołowej i ciele migdałowatym - u myszy poddanych procedurze CUS. Otrzymane wyniki wskazują, że obserwowane zmiany strukturalne w hipokampie są specyficzne, gdyż w innych strukturach mózgu nie zaobserwowano istotnych zmian w kształcie kolców dendrytycznych (brak zmian w stosunku długości do szerokości główki kolca), zarówno u myszy ANH, jak i RES /Rycina 19/.



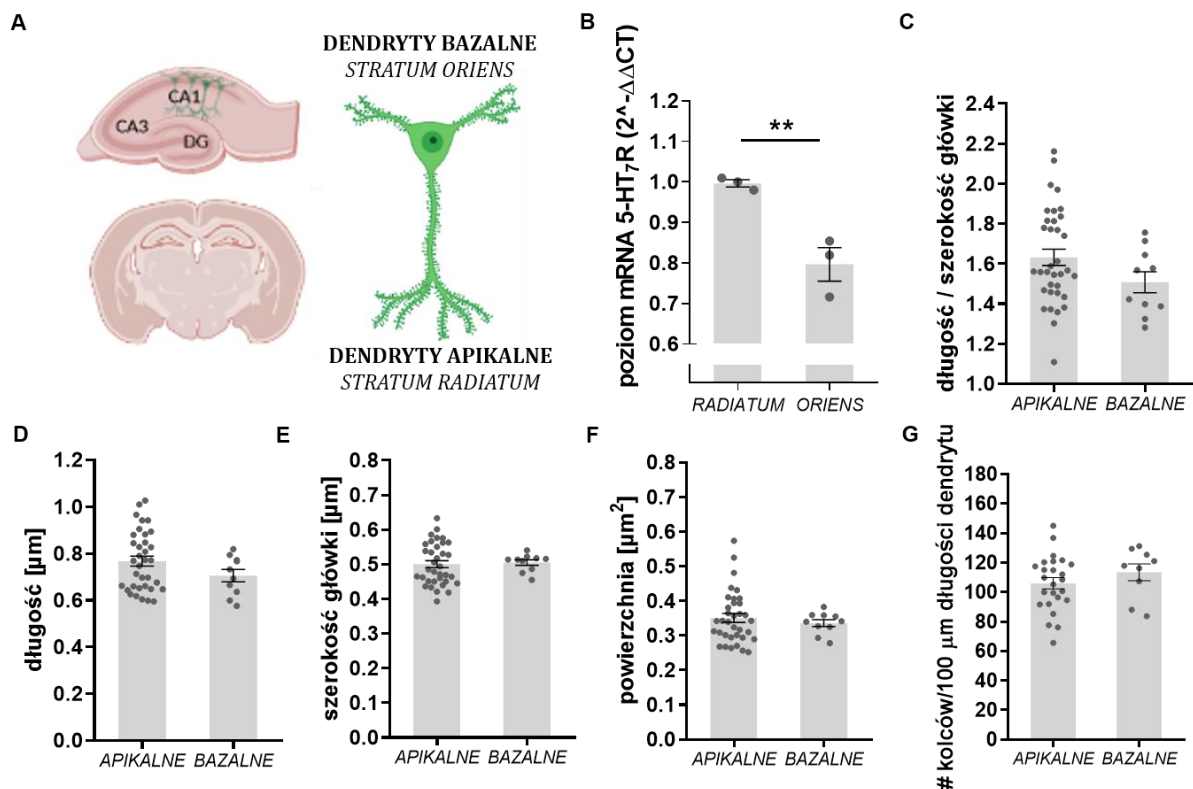
**Rycina 19. Analiza morfometryczna kolców dendrytycznych w korze przedczołowej i ciele migdałowatym myszy poddanych chronicznemu stresowi. (A)** Rysunek skrawka mózgu myszy z atlasu neuroanatomicznego przedstawiający analizowany region kory przedczołowej. **(B)** Analiza ilościowa stosunku długości do szerokości główki kolców dendrytycznych kory przedczołowej. **(C)** Rysunek skrawka mózgu myszy z atlasu neuroanatomicznego przedstawiający analizowany region ciała migdałowatego. **(D)** Analiza ilościowa stosunku długości do szerokości główki kolców dendrytycznych ciała migdałowatego. Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnych zmian między grupami eksperymentalnymi (analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a). Kora przedczołowa: KTR  $N_{kolce} = 2769$ ,  $N_{dendryty} = 29$ ; ANH  $N_{kolce} = 2753$ ,  $N_{dendryty} = 30$ ; RES  $N_{kolce} = 3351$ ,  $N_{dendryty} = 32$ . Ciało migdałowate: KTR  $N_{kolce} = 1107$ ,  $N_{dendryty} = 10$ ; ANH  $N_{kolce} = 1989$ ,  $N_{dendryty} = 18$ ; RES  $N_{kolce} = 2051$ ,  $N_{dendryty} = 28$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM.

#### 4.6. Chroniczny stres prowadzi do zróżnicowanych zmian strukturalnych w drzewku apikalnym i bazalnym komórek piramidowych w hipokampie myszy

Następnie podjęto się próby zweryfikowania czy ekspresja 5-HT<sub>7</sub>R oraz struktura kolców dendrytycznych analizowanych komórek piramidowych w regionie CA1 różni się w obrębie obszarów komórkowych w warunkach bazowych (myszy KTR) oraz po ekspozycji na CUS.

W celu określenia ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie w warunkach bazowych przeprowadzono dysekcję tkanek *Stratum Oriens* i *Stratum Radiatum* regionu CA1 hipokampa u myszy o fenotypie dzikim i następnie poddano je analizie RT-qPCR /Rycina 20.(A-B)/. Otrzymane wyniki wykazały, że *Stratum Oriens* cechuje obniżona ekspresja genu *htr7* w porównaniu do *Stratum Radiatum* ( $p = 0,009$ ; niesparowany test t-Studenta,  $N_{myszy} = 3$ ) /Rycina 20.(B)/. Ilościowa analiza struktury kolców dendrytycznych hipokampa nie wykazała istotnych różnic między dendrytami bazalnymi a apikalnymi w parametrach morfometrycznych kolców dendrytycznych takich jak: stosunek długości do szerokości główki /Rycina 20.(C)/, długość kolca /Rycina 20.(D)/, szerokość główki /Rycina 20.(E)/, całkowita powierzchnia /Rycina 20.(F)/ oraz w gęstości kolców /Rycina 20.(G)/.

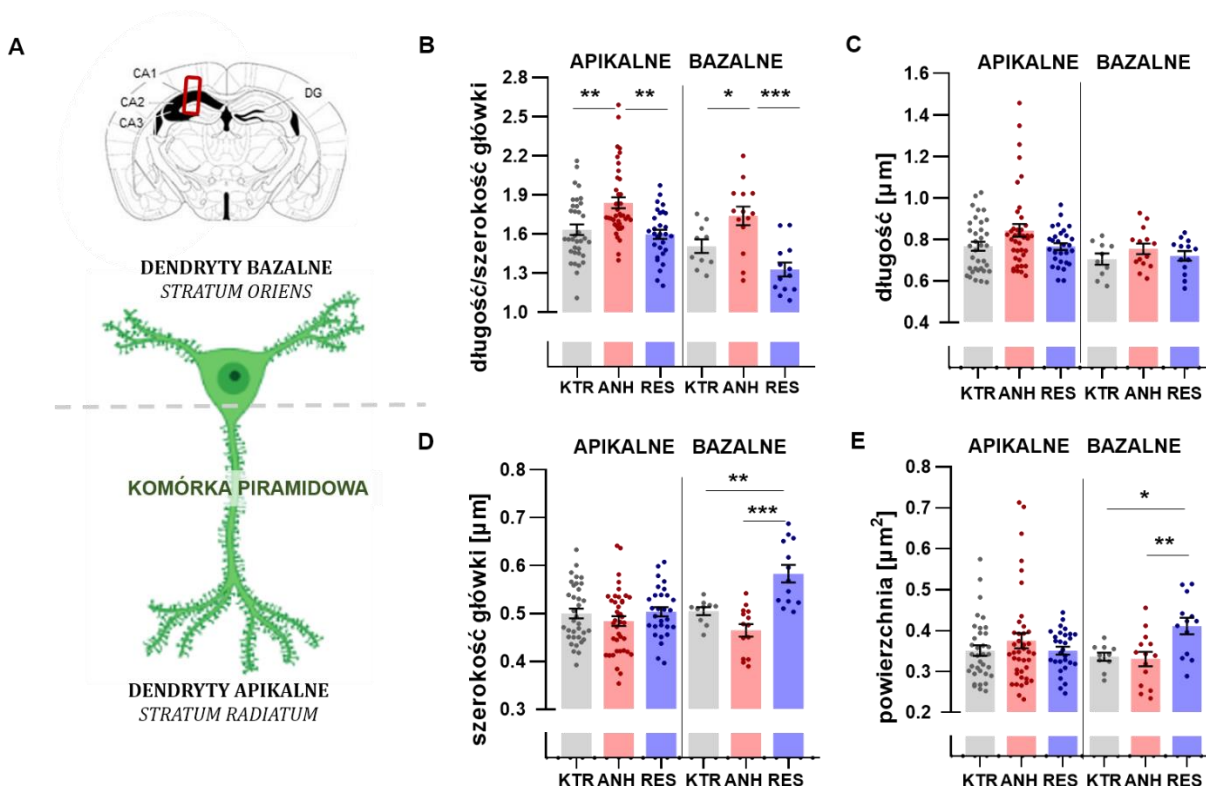
Podsumowując, w warunkach bazowych (bez stresu) *Stratum Oriens* CA1 cechuje obniżona ekspresja genu *htr7* w porównaniu do *Stratum Radiatum*, podczas gdy kształt kolców dendrytycznych nie różni się w obrębie dendrytów komórek piramidowych zlokalizowanych we wspomnianych obszarach hipokampa.



Rycina 20. Ekspresja genu *htr7* i analiza strukturalna kolców dendrytycznych w *Stratum Oriens* i *Radiatum* regionu CA1 hipokampa myszy o fenotypie dzikim niepoddanych chronicznemu stresowi. (A) Rysunek skrawka mózgu myszy przedstawiający miejsce lokalizacji komórek piramidowych regionu CA1 hipokampa zbudowanych z dwóch drzewek dendrytycznych: bazalnych umiejscowionych w *Stratum Oriens* i apikalnych w *Stratum Radiatum*. (B) Analiza ilościowa ekspresji genu *htr7* w *Stratum Oriens* i *Stratum Radiatum* (niesparowany test t-Studenta). Analiza poszczególnych parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych: (C) stosunek długości do szerokości główki (niesparowany test t-Studenta); (D) długość (niesparowany test t-Studenta); (E) szerokość główki (test Manna-Whitneya); (F) powierzchnia (niesparowany test t-Studenta); (G) gęstość kolców wyrażona przez liczbę kolców na 100  $\mu\text{m}$  długości dendrytu (niesparowany test t-Studenta). BAZALNE  $N_{\text{kolce}} = 747$ ,  $N_{\text{dendryty}} = 10$ , długość przeanalizowanych dendrytów = 2743, 25  $\mu\text{m}$ . APIKALNE  $N_{\text{kolce}} = 2368$ ,  $N_{\text{dendryty}} = 35$ , długość przeanalizowanych dendrytów = 7413,15  $\mu\text{m}$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$ . Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com.

Z kolei analiza plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych myszy poddanych procedurze CUS wykazała u zwierząt ANH jednakowy kierunek zmian strukturalnych w obrębie dendrytów bazalnych i apikalnych w regionie CA1 hipokampa /Rycina 21.(A-E)/. Kolce myszy ANH wydłużały się w porównaniu do kolców myszy KTR i RES (dendryty apikalne: KTR vs. ANH  $p = 0,003$ ; RES vs. ANH  $p = 0,001$ ; analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a; dendryty bazalne: KTR vs. ANH  $p = 0,036$ ; RES vs. ANH  $p < 0,001$ , analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 21.(B)/. Co więcej, szczegółowa analiza parametrów

morfometrycznych kolców dendrytycznych, takich jak długość kolca /Rycina 21.(C)/, szerokość główki /Rycina 21.(D)/ czy całkowita powierzchnia /Rycina 21.(E)/ wykazała, że myszy RES na dendrytach bazalnych cechują bardziej dojrzałe kolce dendrytyczne charakteryzujące się większą szerokością główki (KTR vs. RES  $p = 0,003$ ; RES vs. ANH  $p < 0,001$ , analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 21.(D)/ i całkowitą powierzchnią, w porównaniu do myszy KTR (KTR vs. RES  $p = 0,017$ ; RES vs. ANH  $p = 0,005$ ; analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 21.(E)/.

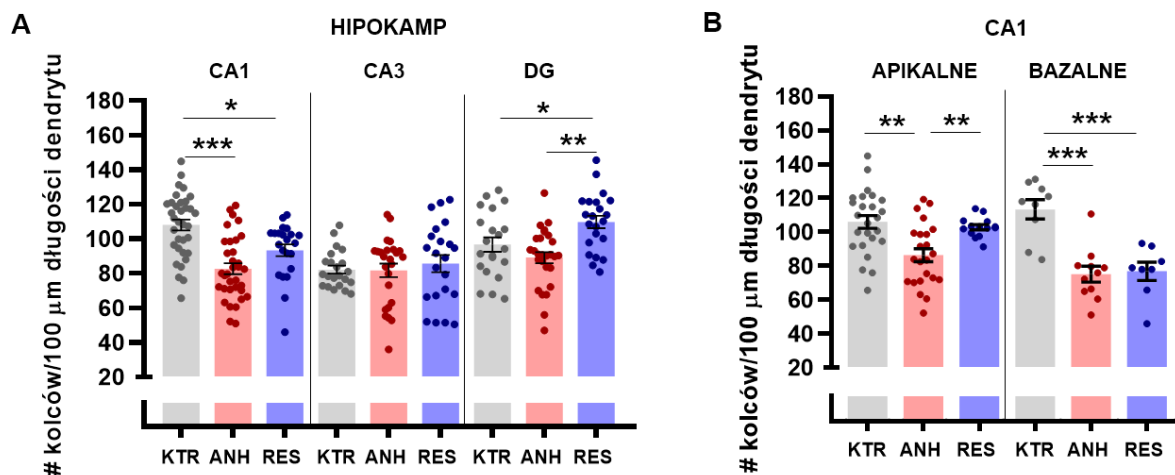


**Rycina 21. Analiza morfometryczna kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa myszy poddanych chronicznemu stresowi wykazała odmienne zmiany strukturalne w obrębie drzewka apikalnego i bazalnego komórek piramidowych. (A)** Schemat skrawka mózgu myszy przedstawiający lokalizację regionów hipokampa (CA1, CA3, DG) oraz budowę komórki piramidowej. Analiza ilościowa poszczególnych parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych w drzewku apikalnym i bazalnym: **(B)** stosunku długości do szerokości główki kolca, **(C)** długości, **(D)** szerokości główki oraz **(E)** powierzchni kolca dendrytycznego (analiza jednoczynnikowa wariancji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a). KTR  $N_{kolce} = 3105$ ,  $N_{dendryty} = 45$ ; ANH  $N_{kolce} = 3542$ ,  $N_{dendryty} = 54$ ; RES  $N_{kolce} = 3075$ ,  $N_{dendryty} = 42$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $< 0,001$ . Schemat utworzono z wykorzystaniem programu BioRender.com.

W celu lepszego zrozumienia obserwowanych zmian kształtu kolców dendrytycznych podjęto się zbadania wpływu CUS na gęstość kolców dendrytycznych w poszczególnych regionach hipokampa

oraz w dendrytach apikalnych i bazalnych komórek piramidowych regionu CA1 hipokampa /Rycina 22/. Otrzymane wyniki wykazały, że zwierzęta ANH i RES charakteryzują się istotnym spadkiem gęstości kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do myszy KTR (KTR vs. ANH  $p < 0,0001$ ; KTR vs. RES  $p = 0,044$ ; analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Dunn'a), podczas gdy w regionie CA3 i DG zmiany te nie występowały /Rycina 22.(A)/. Niemniej jednak, u myszy RES zaobserwowano wzrost gęstości kolców w regionie DG hipokampa w porównaniu do myszy KTR i ANH (KTR vs. RES  $p = 0,047$ ; RES vs. ANH  $p < 0,001$ , analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 22.(A)/.

Analiza gęstości kolców w poszczególnych obszarach dendrytycznych komórek piramidowych regionu CA1 wykazała spadek gęstości kolców dendrytycznych u myszy ANH, zarówno w drzewkach apikalnych, jak i bazalnych, co pokrywa się z obserwowanymi zmianami kształtu kolców dendrytycznych (tj. wydłużanie) w tych obszarach komórkowych /Rycina 22.(B)/. Co ciekawe, obserwowany spadek gęstości kolców w regionie CA1 u myszy RES w porównaniu do myszy KTR, związany był z obniżoną gęstością kolców wyłącznie w drzewku bazalnym (KTR vs. RES  $p < 0,001$ , analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych testem Tuckey'a) /Rycina 22.(B)/. W drzewku apikalnym myszy RES nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic, zarówno w gęstości, jak i kształcie kolców dendrytycznych w porównaniu do myszy KTR.



**Rycina 22. Analiza gęstości kolców dendrytycznych myszy poddanych chronicznemu stresowi w poszczególnych (A) regionach hipokampa (CA1, CA3, DG) oraz (B) obszarach komórki piramidowej regionu CA1 – dendryty apikalne i dendryty bazalne (analiza jednoczynnikowa wariacji z wielokrotnym porównaniem grup eksperymentalnych).** Długość przeanalizowanych dendrytów KTR = 23 795,67  $\mu\text{m}$ , ANH = 27 179,45  $\mu\text{m}$ , RES = 21 996,42  $\mu\text{m}$ ; dendryty apikalne CA1: KTR = 7413,15  $\mu\text{m}$ ; ANH = 8646,39  $\mu\text{m}$ ; RES = 8160,43  $\mu\text{m}$ ; dendryty bazalne: KTR = 2743,25  $\mu\text{m}$ ; ANH = 4197,49  $\mu\text{m}$ ; RES = 3269,78  $\mu\text{m}$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $< 0,001$ .

---

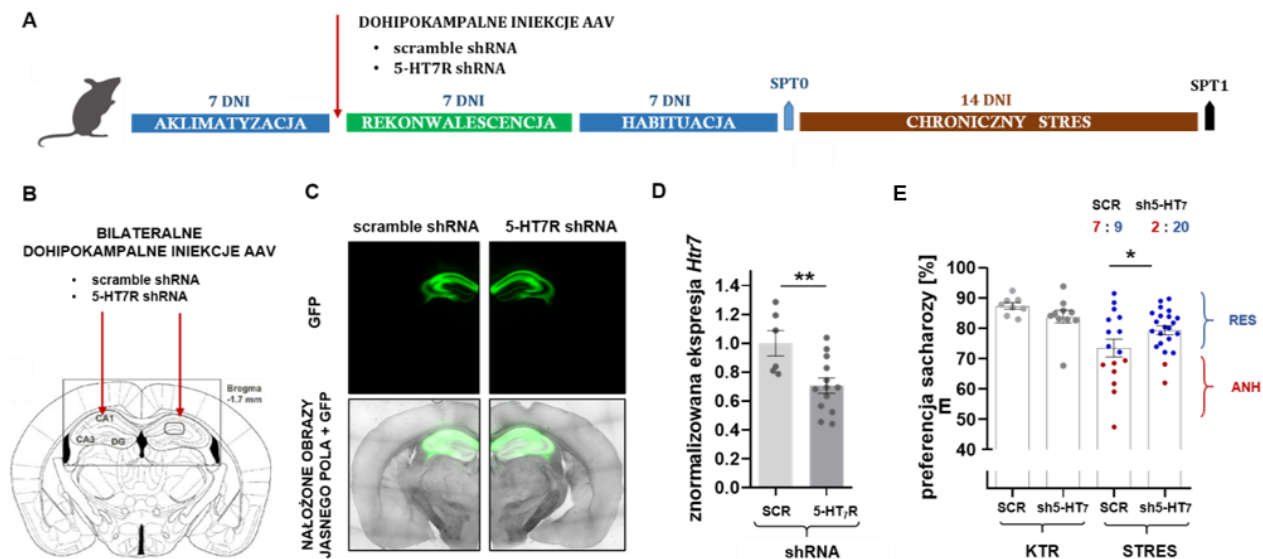
Podsumowując, wyniki analizy strukturalnej wykazały, że zachowanie typu depresyjnego cechuje wydłużenie kolców dendrytycznych i zmniejszona gęstość kolców w regionie CA1 hipokampa myszy, podczas gdy zachowanie rezylienne kompensacja strukturalna w tym regionie (zwiększona szerokość główek kolców pomimo zmniejszonej ich liczby).

#### **4.7. Obniżenie ekspresji genu *htr7* w hipokampie przed ekspozycją na chroniczny stres zapobiega rozwojowi anhedonii u myszy**

Aby zweryfikować, czy ekspresja 5-HT<sub>7</sub>R w regionie CA1 hipokampa jest konieczna do wywoływania zachowań typu depresyjnego przeprowadzono eksperyment, w którym lokalnie i selektywne obniżono ekspresję genu *htr7* kodującego 5-HT<sub>7</sub>R. Następnie zwierzęta poddano procedurze CUS wraz z ewaluacją behawioralną testem preferencji sacharozy (SPT1) /Rycina 23.(A)/. Jako wariant kontrolny zastosowano wirus AAV niosący sekwencję shRNA (scr shRNA), niewyciszającą ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R. Oba konstrukty kodujące 5-HT<sub>7</sub>R shRNA oraz scr shRNA zawierały dodatkową sekwencję kodującą białko zielonej fluorescencji (GFP) pod promotorem synapsyny, co umożliwiała wizualizację i tym samym identyfikację zainfekowanych obszarów /Rycina 23.(B-C)/. Zainfekowany region CA1 z jednej półkuli mózgu poddano dysekcji i przeznaczono na analizy RT-qPCR w celu zweryfikowania skuteczności shRNA wobec wyciszenia ekspresji genu *htr7* /Rycina 23.(D)/.

Analiza parametrów behawioralnych wykazała, że obniżenie ekspresji genu *htr7* nie wpłynęło na bazową preferencję sacharozy (SPT0), gdyż nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami traktowanymi 5-HT<sub>7</sub>R shRNA i kontrolnymi scr shRNA. Natomiast analiza preferencji sacharozy po procedurze CUS (SPT1) wykazała, że obniżenie ekspresji genu *htr7* w regionie CA1 hipokampa przed procedurą CUS zapobiega rozwojowi anhedonii po stresie /Rycina 23.(E)/. Otrzymane wyniki wykazały, że siedem z 16 zwierząt (44%), którym wprowadzono wektor AAV kodujący scr shRNA rozwinęło zachowanie anhedoniczne, podczas gdy w grupie, której wprowadzono AAV kodujący 5-HT<sub>7</sub>R shRNA były to dwie z 22 myszy (9%) /Rycina 23.(E)/.

Podsumowując, ekspresja 5-HT<sub>7</sub>R w regionie CA1 hipokampa związana jest z behawioralną odpowiedzią na chroniczny stres.



**Rycina 23. Wyciszenie ekspresji genu *htr7* przed procedurą chronicznego stresu zapobiega rozwojowi anhedoni u myszy. (A)** Schematyczne przedstawienie planu eksperymentalnego. **(B)** Rysunek skrawka mózgu myszy z atlasu neuroanatomicznego przedstawiający miejsce wprowadzanych konstruktów AAV. **(C)** Reprezentatywne zdjęcia otrzymane z mikroskopu fluorescencyjnego skrawków mózgu myszy po podaniu AAV niosących scramble shRNA i 5-HT<sub>7</sub>R shRNA. **(D)** Analiza ilościowa ekspresji genu *htr7* w zainfekowanych obszarach regionu CA1 (niesparowany test t-Studenta). **(E)** Preferencja sacharozy myszy kontrolnych (KTR) i stresowanych (STRES) po podaniu AAV zawierających sekwencję scramble shRNA, SCR ( $N_{KTR} = 8$ ;  $N_{STRES} = 16$ ) lub 5-HT<sub>7</sub>R shRNA ( $N_{KTR} = 10$ ;  $N_{STRES} = 22$ ), Test Chi-Kwadrat. Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

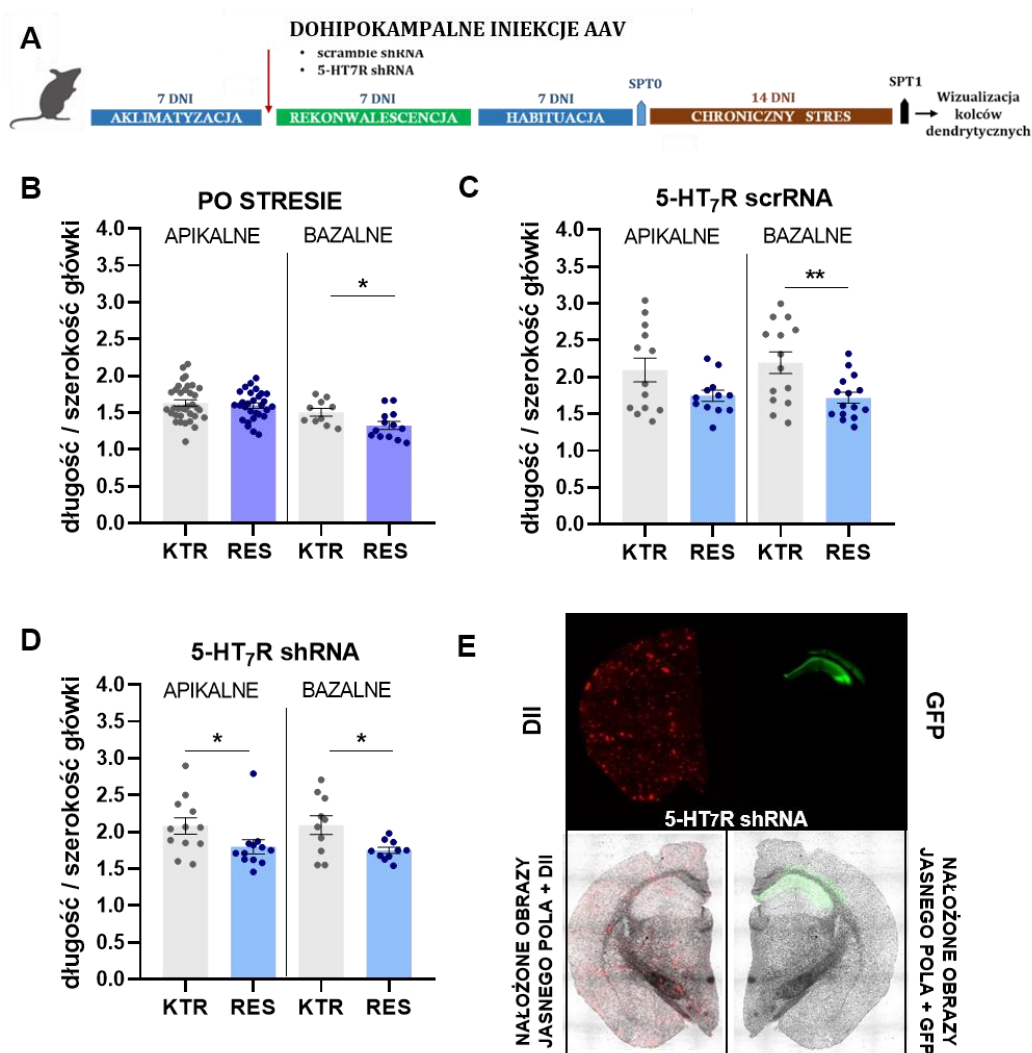
#### 4.8. Obniżenie ekspresji genu *htr7* w hipokampie myszy przed ekspozycją na chroniczny stres prowadzi do zmian strukturalnych kolców dendrytycznych

Otrzymane wyniki behawioralne wykazały, że obniżenie ekspresji genu *htr7* w regionie CA1 hipokampa promuje powstawanie fenotypu rezylientnego. Dlatego podjęto się próby zweryfikowania, czy fenotyp RES powstały przez obniżenie ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R w regionie CA1 hipokampa charakteryzują podobne zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, jak te obserwowane u myszy RES powstałych spontanicznie po ekspozycji na CUS /Rycina 24.(A-D)/.

Procedura wizualizacji kolców dendrytycznych została przeprowadzona na drugiej półkuli mózgu myszy, którym wykonano dohipokampalne iniekcje stereotaktyczne AAV kodującym scr shRNA lub shRNA 5-HT<sub>7</sub>R oraz protokole CUS /Rycina 24.(E)/. Analiza morfometryczna wykazała, że u myszy scr shRNA RES kolce dendrytyczne charakteryzowały się mniejszą wartością stosunku długości do szerokości w dendrytach bazalnych w porównaniu do scr shRNA KTR ( $p = 0,006$ ; niesparowany test t-Studenta) /Rycina 24.(C)/. Z kolei w grupie 5-HT<sub>7</sub>R shRNA RES zaobserwowano mniejszą wartość tego parametru, zarówno w dendrytach apikalnych ( $p = 0,021$ ; niesparowany test t-Studenta), jak i bazalnych ( $p = 0,020$ ; niesparowany test t-Studenta) komórek piramidowych regionu CA1 hipokampa w porównaniu do myszy 5-HT<sub>7</sub>R shRNA KTR /Rycina 24.(D)/.



Podsumowując, otrzymane wyniki analizy strukturalnej kolców dendrytycznych wykazały, że myszy 5-HT<sub>7</sub>R shRNA RES cechują bardziej stabilne połączenia synaptyczne w obrębie obu drzewek dendrytycznych komórek piramidowych regionu CA1 w porównaniu do myszy RES /Rycina 24/.



**Rycina 24. Wyciszenie ekspresji genu *htr7* przed procedurą chronicznego stresu prowadzi do zmian strukturalnych kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa. (A)** Schematyczne przedstawienie planu eksperymentalnego. Analiza morfometryczna kolców dendrytycznych w dendrytach apikalnych i bazalnych komórek piramidowych regionu CA1: **(B-D)** stosunek długości do szerokości główki kolca (niesparowany test t-Studenta). **(E)** Zdjęcie tego samego skrawka mózgu myszy 5-HT<sub>7</sub>R shRNA, którego neurony zostały wyznakowane barwnikiem DiI. Dendryty apikalne:  $N_{\text{kolcówscrRNA KTR}} = 612$ ,  $N_{\text{dendrytówscrRNA KTR}} = 13$ ,  $N_{\text{kolcówScrRNA RES}} = 984$ ,  $N_{\text{dendrytówScrRNA RES}} = 17$ .  $N_{\text{kolcówshRNA KTR}} = 505$ ,  $N_{\text{dendrytówShRNA KTR}} = 12$ ,  $N_{\text{kolców shRNA RES}} = 901$ ,  $N_{\text{dendrytówshRNA RES}} = 14$ . Dendryty bazalne:  $N_{\text{kolcówscrRNA KTR}} = 726$ ,  $N_{\text{dendrytówscrRNA KTR}} = 16$ ,  $N_{\text{kolcówScrRNA RES}} = 977$ ,  $N_{\text{dendrytówscrRNA RES}} = 20$ ,  $N_{\text{kolcówShRNA KTR}} = 506$ ,  $N_{\text{dendrytówshRNA KTR}} = 10$ ,  $N_{\text{kolców shRNA RES}} = 804$ ,  $N_{\text{dendrytówshRNA RES}} = 15$ . Dendryty apikalne:  $N_{\text{kolcówKTR}} = 2368$ ,  $N_{\text{dendrytów KTR}} = 35$ ,  $N_{\text{kolców RES}} = 2147$ ,  $N_{\text{dendrytówRES}} = 29$ ; dendryty bazalne:  $N_{\text{kolców KTR}} = 747$ ,  $N_{\text{dendrytów KTR}} = 10$ ,  $N_{\text{kolców RES}} = 928$ ,  $N_{\text{dendrytówRES}} = 13$ . Dane przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

---

## 5. DYSKUSJA

Receptor serotoninowy typu 7 występuje w obszarach mózgu kluczowych dla prawidłowego rozwoju i transmisji synaptycznej, przez co odpowiedzialny jest za różne funkcje, w tym między innymi uczenie się i pamięć, regulacje cyklu dobowego, czy odczuwanie bólu [Ciranna i Catania, 2014]. Szereg badań sugeruje, że 5-HT<sub>7</sub>R może być potencjalnym celem farmakoterapeutycznym dla zaburzeń poznawczych takich jak np. zmiany otępienne w chorobie Alzheimera [Cifariello i wsp., 2008; Gasbarri i Pompili, 2014; Hedlund, 2009; Solas i wsp., 2021]. Badania, w których stosowano, zarówno farmakologiczne interwencje, jak i genetyczne modyfikacje 5-HT<sub>7</sub>R wskazują, że receptor ten może także odgrywać istotną rolę w regulowaniu nastroju, a tym samym w chorobach związanych ze stresem [Hedlund, 2009; Nikiforuk, 2015]. Niemniej jednak, mechanizm molekularny 5-HT<sub>7</sub>R leżący u podstaw regulowania zmian w zachowaniu nie został do tej pory opisany.

Interesującymi badaniami dotyczącymi roli 5-HT<sub>7</sub>R w regulowaniu plastyczności synaptycznej jest praca Bijata i wsp. (2017), w której opisano funkcjonalne oddziaływanie między 5HT<sub>7</sub>R a proteazą MMP-9 w hipokampalnych hodowlach komórkowych. W badaniach tych wykazano, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R *in vitro* prowadzi do wzrostu aktywności MMP-9, w konsekwencji wywołując patologiczne zmiany strukturalne i funkcjonalne w synapsach – upośledzenie komórkowych procesów uczenia przez zmniejszenie wydajności istniejących połączeń synaptycznych (wydłużanie kolców dendrytycznych). Aktywność MMP-9 stanowi istotny regulator plastyczności synaptycznej oraz marker wielu stanów patologicznych chorób neurologicznych [Reinhard i wsp., 2015; Stawarski i wsp., 2014; Vafadari i wsp., 2016]. Co ważne, wiele badań omawianych w niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystujących zwierzęce modele zachowań typu depresyjnego również opisuje podobne zmiany w strukturze i funkcji komórek nerwowych w hipokampie, jak te obserwowane w badaniach Bijata i wsp. (2017). Jednakże to jaką dokładnie rolę pełni 5-HT<sub>7</sub>R w plastyczności synaptycznej w hipokampie *in vivo* oraz czy aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R związana jest z rozwojem zachowań typu depresyjnego nie zostało do tej pory zbadane. Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poznanie roli 5-HT<sub>7</sub>R *in vivo* w rozwoju zachowań typu depresyjnego oraz określenie funkcjonalnych konsekwencji aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R.

Przeprowadzone badania wykazały, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R prowadzi do rozwoju zachowań typu depresyjnego oraz zmian strukturalnych w komórkach nerwowych w hipokampie myszy. Szczegółowa charakterystyka behawioralna wykazała, że szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R aktywowany jest w hipokampie myszy ANH po ekspozycji na CUS [Bijata i wsp., 2022a]. Ponadto, dzięki wynikom otrzymanym w ramach niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono, że MMP-9 zwiększa swoją aktywność w hipokampie *in vivo* podczas ekspozycji na chroniczny stres [Bączyńska

---

i wsp., 2022, *bioRxiv*; Bijata i wsp. 2022a]. Co więcej, zmiany te są specyficznie związane z fenotypem depresyjnym, gdyż u zwierząt RES nie zaobserwowano, zarówno aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R, jak i wydłużania kolców dendrytycznych [Bączyńska i wsp., 2022, *bioRxiv*]. Niemniej jednak, nie można wykluczyć, że szlak ten jest również aktywowany w innych strukturach mózgu wrażliwych na wpływ chronicznego stresu (kora przedczołowa, ciało migdałowe) i że zmiany w plastyczności synaptycznej mają ogólny charakter. Wyniki zawarte w badaniach Bijata i wsp. (2022a) mogą pośrednio potwierdzać to założenie, gdyż przeprowadzone analizy biochemiczne wykazały wzrost aktywności MMP-9 i CDC42 w korze przedczołowej po wykonaniu iniekcji LP. Aczkolwiek analiza kształtu kolców dendrytycznych po CUS nie wykazała istotnych zmian w korze przedczołowej myszy ANH, co może świadczyć o tym, że szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R nie jest aktywowany w korze przedczołowej podczas CUS lub że jego aktywacja jest niewystarczająca do wywołania zmian strukturalnych w kolcach dendrytycznych. Zagadnienie to wymaga dodatkowych analiz biochemicznych i strukturalnych przeprowadzonych w korze przedczołowej. Niemniej jednak, otrzymane wyniki wskazują, że aktywacja 5-HT<sub>7</sub>R związana jest z rozwojem zachowań typu depresyjnego u myszy.

Co warto podkreślić, do przeprowadzonych analiz biochemicznych i strukturalnych kolców dendrytycznych wybrano reprezentatywne myszy dla danego fenotypu behawioralnego CUS /Rycina 15/. Biorąc pod uwagę, że obecnie dostępne są różne podejścia metodologiczne w modelowaniu zachowań typu depresyjnego u zwierząt laboratoryjnych, jak np. stres unieruchomienia, to wybór modelu CUS umożliwił potwierdzenie, że ekspresja receptora 5-HT<sub>7</sub>R w hipokampie związana jest regulacją odpowiedzi behawioralnej na stres. Wynika to z faktu, że w modelu tym występują dwie behawioralne subpopulacje myszy po CUS (ANH i RES) w jednakowych proporcjach (1:1), co stanowi odpowiedni model do badania mechanizmów, zarówno prodepresyjnych, jak i promujących rezyliencje [Bijata i wsp., 2022b]. Co więcej, dodatkowa charakterystyka behawioralna myszy po procedurze CUS i zastosowaniu ketaminy wskazuje, że myszy ANH mogą wykazywać odpowiedź behawioralną na leki antydepresyjne. Niemniej jednak, aby to potwierdzić potrzebnych jest więcej badań z zastosowaniem tego modelu, w których stosowane byłyby klasyczne interwencje farmakologiczne lekami z grupy SSRIs.

Wprawdzie liczne badania sugerują, że 5-HT<sub>7</sub>R może odgrywać ważną rolę w chorobach związanych ze stresem (ze względu na terapeutyczne efekty blokowania jego ekspresji oraz zdolność do interakcji z licznymi lekami antydepresyjnymi), to dokładny mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska wciąż wydaje się niewyjaśniony [Bijata i wsp., 2022a; Guscott i wsp., 2005; Hedlund i wsp., 2005; Roth i wsp., 1994; Wesołowska i wsp., 2006a; Wesołowska i wsp., 2006b; Wesołowska i wsp., 2007]. Podobnie jest z rolą MMP-9 w rozwoju zaburzeń depresyjnych, której mechanizm molekularny

---

działania wydaje się równie skomplikowany [Li i wsp., 2022]. Dlatego, żeby lepiej zrozumieć rolę szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R w regulacji, zarówno w behawioralnej odpowiedzi na CUS, jak i plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych potrzebne są dodatkowe badania w tym analizy biochemiczne w poszczególnych regionach hipokampa oraz obszarach komórkowych (*Stratum Oriens*, *Stratum Radiatum*) regionu CA1 hipokampa myszy poddanych CUS. Wiedza na ten temat jest wciąż niekompletna i wymaga dalszych badań.

Pomimo iż wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy wykazały istnienie szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9 *in vivo* to wcześniejsze doniesienia naukowe pośrednio mogą sugerować jego istnienie. W badaniach Stroth i Svenningsson (2015) wykazano, że 5-HT<sub>7</sub>R oddziałuje z astrocytarnym białkiem S100β (ang. *S100 calcium binding protein β subunit*), o którym wiadomo, że reguluje poziom cAMP. Z kolei w badaniach Szepesi i wsp. (2013) udowodniono, że wzrost cAMP zwiększa aktywność MMP-9, natomiast badania Xu i wsp. (2016) wykazały, że białko S100β indukuje uwalnianie MMP-9. Otrzymane wyniki, zawarte w pracy Bijata i wsp. (2022a), potwierdziły, że stymulacja 5-HT<sub>7</sub>R specyficznym agonistą (LP) *in vivo* zwiększa poziom aktywności MMP-9 w hipokampie oraz że blokada konstytutywnej aktywności 5-HT<sub>7</sub>R poprzez 5-HT<sub>7</sub>R KO lub traktowanie odwrotnym agonistą SB269970 prowadzi do zmniejszenia jej aktywności. Istotną rolę aktywacji MMP-9 w rozwoju zachowań depresyjnych indukowanych stymulacją 5-HT<sub>7</sub>R potwierdziły również przeprowadzone eksperymenty na myszach MMP-9 KO. U zwierząt tych nie zaobserwowano zmian behawioralnych po traktowaniu agonistą 5-HT<sub>7</sub>R (LP), w przeciwieństwie do efektów prodepresyjnych obserwowanych u myszy o fenotypie dzikim po traktowaniu LP /Rycina 12.(A)/. Co ważne, wyniki te mogą potwierdzać inne dotychczas prowadzone badania związane z analizą krwi pacjentów ze depresją, u których zaobserwowano podwyższony poziom MMP-9 w porównaniu do osób zdrowych [Domenici i wsp., 2010; Garvin i wsp., 2009; Jönsson i wsp., 2014; Rybakowski i wsp., 2013]. Badania te świadczą o tym, że pomiar MMP-9 w krwi może stanowić skuteczny biomarker zaburzeń depresyjnych [Li i wsp., 2022], chociaż wciąż nie ma jednoznacznego dowodu wskazującego na korelację poziomu MMP-9 we krwi a aktywnością tego białka w mózgu.

Badania opierające się na analizach *post mortem* poziomu MMP-9 w strukturach korowych osób chorujących na depresję nie wykazały istotnych różnic w porównaniu do osób zdrowych [Alaiyed i wsp., 2020]. Wydaje się to przeciwstawną obserwacją w odniesieniu do wyników prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, które wskazują na wzrost aktywności MMP-9 w hipokampach osób z depresją w porównaniu do osób zdrowych. Te pozornie sprzeczne obserwacje można jednak wyjaśnić różnymi protokołami badawczymi, gdyż we wspomnianym badaniu [Alaiyed i wsp., 2020] badano poziom nieaktywnej enzymatycznie proMMP-9, podczas gdy w badaniach

---

prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej oznaczony został poziom aktywności MMP-9 z wykorzystaniem zymografii żelowej. Ponadto przedmiotem obu badań były inne struktury anatomiczne – kora przedczołowa oraz hipokamp, które w zależności od obrazu klinicznego depresji mogą wykazywać różnice funkcjonalne i molekularne [Trifu i wsp., 2020]. Otrzymany wynik wskazujący na wzrost aktywności MMP-9 *post mortem* w hipokampie osób z depresją może świadczyć o tym, że szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R także jest aktywowany u tych osób. Niemniej jednak, analiza *post mortem* aktywności CDC42 nie została przeprowadzona, gdyż aktywność GTPaz jest szczególnie wrażliwa na hydrolizę i była niemożliwa do wykrycia w otrzymanym materiale badawczym. Główną przyczyną był sposób przechowywania materiału do momentu pobrania tkanek hipokampa (warunki chłodnicze). Ponadto, istotnym ograniczeniem był także czas pobrania materiału. Zgodnie z polskim prawem sekcja zwłok nie może odbyć się wcześniej niż 12 godzin po śmierci. W praktyce autopsje zwykle odbywają się nawet do 24–48 godzin, a opóźnienie to może wpływać na uzyskane wyniki, uniemożliwiając wykonanie niektórych pomiarów biochemicznych, np. aktywności CDC42. Niemniej jednak, badania kliniczne wykazały, że polimorfizmy genu MMP-9 związane są z zaburzeniami depresyjnymi [Bobińska i wsp., 2016; Rybakowski, 2009], dlatego też MMP-9 obecnie skupia uwagę neuropsychiatrów jako potencjalny predyktor i/lub biomarker epizodów depresyjnych [Li i wsp., 2022].

Regulacja aktywności MMP-9 może odbywać się na wielu poziomach między innymi poprzez interakcję z endogennym inhibitorem TIMP-1, którego obecność jest potrzebna do powstawania stabilnych połączeń synaptycznych w hipokampie [Magnowska i wsp., 2016]. Ponadto aktywacja MMP-9 może być także kontrolowana przez kaskady sygnalizacyjne obejmujące inne proteazy i inhibitory. Jednym z nich jest tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), który aktywuje konwersję plazminogenu do plazminy, która następnie aktywuje MMP-9 [Baramova i wsp., 1997]. Co ciekawe, w badaniach Pawlak i wsp. (2005) zaobserwowano, że po przewlekłym stresie szybkość aktywacji plazminogenu do plazminy przez tPA jest najwyższa w regionie CA1 hipokampa. Co więcej, dane te są zgodne z innymi badaniami opisującymi wzrost aktywności MMP-9 w regionie CA1 u szczurów poddanych przewlekłemu stresowi [van der Kooij i wsp., 2014]. Obserwacje te potwierdzają otrzymane wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej związane ze wzrostem aktywności MMP-9 w hipokampie, zarówno myszy ANH, jak i u pacjentów z depresją. W związku z tym możliwym jest, że zwiększona aktywność MMP-9 w depresji jest specyficzna dla regionu CA1 hipokampa, co może bezpośrednio być związane z obserwowanymi zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych w tym regionie. Jednak wciąż niejednoznaczny jest czy podwyższony poziom aktywności MMP-9 pochodzi z neuronów, czy może komórek mikrogleju, które również ulegają aktywacji podczas chronicznego stresu [Couch i wsp., 2013;

---

Hinwood i wsp., 2012]. Niemniej jednak, wyniki te wskazują, że aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R, w tym zwiększona aktywność MMP-9, w hipokampie związane są z rozwojem zachowań typu depresyjnego. Co więcej, przeprowadzony eksperyment, w którym obniżono ekspresję genu *htr7* specyficznym w regionie CA1 hipokampa myszy zapobiegając tym samym rozwojowi anhedonii potwierdził, że region CA1 odgrywa szczególną rolę w plastyczności synaptycznej leżącej u podstaw zachowań depresyjnych. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami opisującymi zaburzoną plastyczność synaptyczną w regionie CA1 podczas chronicznego stresu [Alfarez i wsp., 2003; Champagne i wsp., 2008; Dahlin i wsp., 2019; Zhang i wsp., 2019].

Kolejnymi dowodami wskazującymi na istotną rolę MMP-9 w depresji są badania Puścian i wsp. (2020), w których autorzy wykazali, że leczenie lekiem antydepresyjnym z grupy SSRI (fluoksetyną) prowadzi do spadku aktywności MMP-9 w mózgu. Zjawisko to można tłumaczyć wpływem działania fluoksetyny na poziom serotoniny w synapsie, od której stężenia zależy profil modyfikacji potranslacyjnych 5-HT<sub>7</sub>R regulujących między innymi jego konstytutywną aktywność [Gorinski i Ponimaskin, 2013]. Przykładem takiej modyfikacji jest S-palmitoilacja, która w ostatnich latach zwróciła szczególną uwagę naukowców jako potencjalny cel molekularny terapii chorób związanych ze stresem [Gorinski i Ponimaskin, 2013; Liu i wsp., 2022; Zareba-Kozioł i wsp., 2019; Zareba-Kozioł i wsp., 2018] i regulacją plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych [Albanesi i wsp., 2020; Ji i Skup, 2021]. Można zatem założyć, że zwiększenie poziomu serotoniny zwiększa palmitoilację 5-HT<sub>7</sub>R, co z kolei zmniejsza jego konstytutywną aktywność związaną z białkami G $\alpha$ s prawdopodobnie pośredniczącymi w aktywacji MMP-9. Z drugiej strony obniżony poziom serotoniny podczas chronicznego stresu może powodować odwrotny efekt – wzrost aktywności MMP-9 w wyniku wzrostu konstytutywnej aktywności receptora związanej z białkami G $\alpha$ s. Jednakże oba te założenia wymagają weryfikacji eksperymentalnej *in vitro* z zastosowaniem narzędzi biofizycznych umożliwiających określenie związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy palmitoilacją, ekspresją 5-HT<sub>7</sub>R oraz aktywnością MMP-9. Co ciekawe, najnowsze dane wskazują, że przewlekły stres może modyfikować profil palmitoilacji wielu białek, w tym receptorów serotoninowych, zarówno u gryzoni, jak i u ludzi [Gorinski i wsp., 2019; Zareba-Kozioł i wsp., 2019, Bączyńska i wsp., 2022, *bioRxiv*]. Warto jednak podkreślić, że aby zrozumieć rolę palmitoilacji w mechanizmie zależnym od 5-HT<sub>7</sub>R w stresie należałoby zbadać jej dynamikę i związek z aktywnością MMP-9. Ponadto chociaż dane sugerują, że aktywacja MMP-9, w wyniku stymulacji 5-HT<sub>7</sub>R, jest istotnym etapem rozwoju zachowań typu depresyjnego, proces ten może być bardziej złożony przez możliwe zaangażowanie innych szlaków sygnałowych np. obejmować aktywację CDC42 przez białko G $\alpha_{12}$  lub inne modyfikacje potranslacyjne, co również może indukować różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe zależne od 5-HT<sub>7</sub>R [Guseva i wsp., 2014].

---

Niemniej jednak, doniesienia te ukazują jak skomplikowany i zarazem ważny jest mechanizm molekularny szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9 w zrozumieniu zaburzonej plastyczności synaptycznej w stresie.

Jako przejaw plastyczności mózgu, przebudowa kolców dendrytycznych może przybierać różne formy – od zmian kształtu do zmian liczby kolców na dendrycie [Bączyńska i wsp., 2021]. Zmiany zachodzące w środowisku takie jak np. chroniczny stres wpływają na dynamikę zmian kolców dendrytycznych przez zwiększanie lub zmniejszanie ich gęstości oraz zmianę ich kształtu, co bezpośrednio wpływa na transmisję synaptyczną [Laine i Shansky, 2022]. Analizy gęstości kolców dendrytycznych w różnych obszarach anatomicznych mózgu, szczególnie wrażliwych na wpływ chronicznego stresu (hipokamp, kora przedczołowa i ciało migdałowate) wykazały, że wpływ stresu na kolce dendrytyczne jest zależny od struktury mózgu. Wczesne prace skupiały się głównie na badaniach gęstości kolców dendrytycznych w strukturach korowych i hipokampa donosząc, że ekspozycja na chroniczny stres prowadzi do atrofii dendrytów i zmniejszenia gęstości kolców dendrytycznych w tych obszarach [Colyn i wsp., 2019; Conrad i wsp., 2017; Cook i Wellman, 2004; Eiland i wsp., 2012; Goldwater i wsp., 2009; Henckens i wsp., 2015; Lambert i wsp., 1998; Liston i wsp., 2006; Luczynski i wsp., 2015; Patel i wsp., 2018; Radley i wsp., 2005, 2006]. W późniejszych latach, badacze odkryli, że w ciele migdałowatym występuje przeciwstawny efekt – hipertrofia komórek nerwowych i wzrost gęstości kolców dendrytycznych [Bennur i wsp., 2007; Mitra i wsp., 2005; Vyas i wsp., 2003, 2004, 2006; Yi i wsp., 2017]. Co więcej, badanie *in vitro* przeprowadzone przez Bijata i wsp. (2015) wskazuje na to, że również podwyższona aktywność MMP-9 prowadzi do atrofii drzewek dendrytycznych w hipokampie. Prezentowane wyniki w niniejszej rozprawie doktorskiej potwierdzają wcześniejsze doniesienia naukowe *in vitro* i *in vivo*, gdyż w hipokampie również zaobserwowano wzrost aktywności MMP-9 oraz spadek gęstości kolców dendrytycznych u myszy ANH /Rycina 16, 22/. Co więcej, otrzymane wyniki wskazują na związek między typem odpowiedzi behawioralnej na CUS (ANH, RES) a aktywnością MMP-9 oraz zmianami strukturalnymi w neuronach hipokampa. Ponadto, przeprowadzony eksperyment, w którym lokalnie wyciszono ekspresję genu *htr7* w regionie CA1 hipokampa potwierdził, że ekspresja 5-HT<sub>7</sub>R jest konieczna dla rozwoju fenotypu depresyjnego.

Istotną cechą komórek nerwowych jest także ich zdolność do regeneracji po ekspozycji na chroniczny stres, co obserwuje się często w zwierzęcych modelach po okresie rekonwalescencji, interwencji antydepresyjnej czy ekspozycji na wzbogacone środowisko [Ashokan i wsp., 2018; Bessa i wsp., 2009; Ortiz i Conrad, 2018; Vyas i wsp., 2004]. Co ciekawe, wykazano, że to proksymalne części dendrytów posiadają większe zdolności do regeneracji w porównaniu do dendrytów dystalnych [Goldwater i wsp., 2009; Radley i wsp., 2005], co jest zgodne z obserwowanymi różnymi efektami

---

strukturalnymi w bazalnych i apikalnych drzewkach dendrytycznych komórek piramidowych po ekspozycji na CUS /Rycina 21, 22/. Otrzymane wyniki z analiz strukturalnych wydają się szczególnie interesujące zważywszy na fakt, że poza różnym rozmieszczeniem neuroanatomicznym drzewka te różnią się pod kątem molekularnym i funkcjonalnym, w tym również aktywnością metaloproteaz [Brzdak i wsp., 2019]. Otrzymane wyniki z analiz plastyczności strukturalnej sugerują, że chroniczny stres w różny sposób wpływa na plastyczność proksymalnych (dendryty bazalne) i dystalnych obszarów komórki (dendryty apikalne) w regionie CA1 hipokampa. Specyficzne zmiany w tych obszarach związane są również z rodzajem fenotypu rozwiniętego w wyniku CUS (RES lub ANH). Co ciekawe, zmiany te nie są obserwowane w warunkach bazowych (bez stresu). Wyniki te mogą sugerować, że szlak sygnałowy zależny od 5-HT<sub>7</sub>R w warunkach chronicznego stresu jest aktywowany w różny sposób w obrębie dwóch drzewek dendrytycznych zlokalizowanych w *Stratum Oriens* i *Stratum Radiatum* regionu CA1. Obecnie poza technikami biofizycznymi wykorzystującymi obrazowanie w wysokiej rozdzielczości oraz analizami biochemicznymi brakuje metod genetycznych, które umożliwiłyby specyficzne kontrolowanie ekspresji 5-HT<sub>7</sub>R, MMP-9 czy CDC42 w różnych obszarach komórkowych.

Przyżyciowe obrazowanie kolców dendrytycznych z użyciem mikroskopu dwufotonowego myszy wystawionych na chroniczny stres ujawniło, że to kolce grzybkowate (bardziej dojrzałe) są eliminowane najszybciej, natomiast profilaktycznie, antydepresyjne leczenie ketaminą może zapobiegać tej eliminacji [Ng i wsp., 2018]. Co ciekawe, badania przeprowadzone z wykorzystaniem ketaminy przed procedurą CUS wykazały, że farmaceutyk ten promuje rezyliencje za pośrednictwem zmian strukturalnych w kolcach dendrytycznych w hipokampie [Krzystyniak i wsp., 2019]. Może to również stanowić przesłankę do tego, że regulacja kolców dendrytycznych jest kluczowa dla behawioralnej odpowiedzi na stres. Otrzymane wyniki w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, że receptor 5-HT<sub>7</sub>R może stanowić potencjalny cel molekularny, wzmacniający plastyczność strukturalną w obszarach mózgu szczególnie podatnych na atrofię neuronów w wyniku ekspozycji na chroniczny stres. Jednakże do tej pory nikt nie badał zmian kształtu kolców dendrytycznych w obrębie drzewka bazalnego i apikalnego komórek piramidowych w różnych fenotypach behawioralnych po ekspozycji na CUS. Dlatego też obserwacja, że zwierzęta RES wykazują kompensację strukturalną w regionie CA1 hipokampa wydaje się szczególnie intrygująca. Obserwowane zmiany strukturalne u myszy RES (spadek gęstości kolców oraz wytworzenie bardziej stabilnych połączeń synaptycznych na już istniejących kolcach dendrytów bazalnych) sugeruje, że transmisja synaptyczna leżąca u podstaw LTP u tych myszy może różnić się od LTP w hipokampie myszy ANH, które doświadczyły tej samej procedury stresowania, ale wykazują przeciwny efekt w strukturze kolców dendrytycznych (wydłużanie się kolców dendrytycznych).



---

Protokół CUS stosowany w prezentowanych badaniach oparty jest na wcześniejszych badaniach [Couch i wsp., 2013; Strekalova i wsp., 2004; Strekalova i Steinbusch, 2010], w których przeprowadzono ocenę behawioralną procesów uczenia i pamięci, wykazując upośledzenie funkcji poznawczych u zwierząt ANH oraz brak zmian u zwierząt RES. Jednakże czy zmiany strukturalne kolców dendrytycznych w hipokampie u myszy ANH i RES mają odzwierciedlenie w zmianach LTP oraz jaki to ma wpływ na zachowanie zwierząt, wymaga dodatkowych badań uwzględniających pomiary elektrofizjologiczne wraz z kompleksową ewaluacją behawioralną. Niemniej jednak, ten kierunek badań wydaje się szczególnie interesujący, gdyż badania na ludziach wykazały, że osoby rezylienne również cechuje poprawa funkcji poznawczych [Miyagi i wsp., 2020; Parsons i wsp., 2016]. Co więcej, wzrost gęstości kolców w DG myszy RES w porównaniu do myszy KTR i ANH również sugeruje, że transmisja synaptyczna u tych myszy może być inaczej regulowana /Rycina 22/. Badania te mogą przybliżyć nas do odpowiedzi na pytanie - czy zmiany kształtu kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa mogą stanowić strukturalny marker stanu behawioralnego po stresie.

Warto zauważyć, że prawie wszystkie wyżej wymienione badania, w których stosowano protokoły chronicznego stresu przeprowadzono z wykorzystaniem wyłącznie samców myszy i szczurów. Biorąc pod uwagę częstsze występowanie zaburzeń psychicznych związanych ze stresem, takich jak depresja, u kobiet w porównaniu z mężczyznami jest to istotne wykluczenie [Bangasser i Cuarenta, 2021; Hasin i wsp., 2005; Helzer i wsp., 1987; Kessler, 2007; McLaughlin i wsp., 2009; McLean i wsp., 2011]. Ponadto coraz więcej doniesień naukowych wskazuje, że wpływ chronicznego stresu na strukturę neuronów może mieć różne skutki u obu płci np. u samców mogą być one nieobecne lub występować w odwrotnym kierunku niż u samic. W badaniach Gaspar i wsp. (2021) wykazano, że procedura CUS prowadzi do atrofii dendrytów w hipokampie wyłącznie u samców szczurów, podczas gdy u samic efektów tych nie zaobserwowano. W innym badaniu z wykorzystaniem procedury CUS u samic myszy zaobserwowano wzrost gęstości kolców w korze przedczołowej, podczas gdy u samców występował przeciwny efekt – spadek gęstości [Bueno-Fernandez i wsp., 2021]. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Galea i wsp. (1997) wykazano, że procedura chronicznego stresu unieruchomienia związana jest atrofią dendrytów apikalnych komórek piramidowych regionu CA3 hipokampa samców szczurów, podczas gdy u samic atrofia ta przejawiała się wyłącznie w dendrytach bazalnych. Co ciekawe, badania przeprowadzone na młodych szczurach świadczą o tym, że chroniczny stres prowadzi do podobnych efektów strukturalnych w hipokampie, korze przedczołowej i ciele migdałowatym u obu płci. Wyniki te wskazują, że zarówno etap rozwoju, jak i długość trwania stresu są ważnym modulatorem potencjalnych różnic między płciami [Eiland i wsp., 2012; Planchez i wsp., 2019].

---

Niemniej jednak, dużo więcej spójnych wyników z analiz plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych dotyczy samców myszy szczepu C57BL6J, wykazujących zachowania typu depresyjnego. Dlatego też w badaniach stanowiących podstawę prezentowanej rozprawy doktorskiej skupiono się głównie na zweryfikowaniu czy zaimplementowany model CUS prowadzi do podobnych zmian behawioralnych i strukturalnych w hipokampie, jak te obserwowane w wyżej wymienionych badaniach. Kompleksowa charakterystyka strukturalna kolców dendrytycznych myszy ANH i RES w różnych regionach hipokampa dostarczyła nowych informacji na temat tego jak zmiany behawioralne korelują ze zmianami strukturalnymi w mózgu. Z pewnością analogicznie przeprowadzone badania na samicach mogłyby dostarczyć kluczowych informacji na temat różnic płciowych występujących po ekspozycji na chroniczny stres.

Kolejnym istotnym aspektem w badaniach nad mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw zachowań typu depresyjnego jest negatywny wpływ długotrwałych zmian poziomów glikokortykoidów oraz neutrofin na funkcjonowanie neuronów [Altar, 1999; Numakawa i wsp., 2014]. Liczne badania wykazały, że egzogenne podanie glikokortykoidów (kortykosteronu) wywołuje atrofię komórek w hipokampie i korze przedczołowej oraz hipertrofię w ciele migdałowatym [Cerqueira i wsp., 2008; Kim i wsp., 2014; Roozendaal i wsp., 2009; Sousa i wsp., 2000]. Zmiany strukturalne w kolcach dendrytycznych w wyżej wymienionych obszarach mózgu mogą wynikać z faktu, że struktury te są szczególnie bogate w receptory glukokortykoidowe w porównaniu do innych obszarów mózgu [Krugers i wsp., 2010]. Innym peptydem często wiązany ze stresem, plastycznością, a nawet leczeniem antydepresyjnym, jest neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (z ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) [Castrén i Monteggia, 2021]. BDNF należy do rodziny neurotrofin, która odgrywa kluczową rolę w wielu procesach neuronalnych [Yang i wsp., 2020]. W hipokampie delecja genu kodującego BDNF jest wystarczająca do wywołania zmian strukturalnych, podobnych do tych jakie obserwuje się w chronicznym stresie [Magariños i wsp., 2011]. Z kolei nadekspresja BDNF osłabia często atrofię dendrytów hipokampa obserwowaną po ekspozycji na chroniczny stres, a także hipertrofię dendrytów w ciele migdałowatym [Govindarajan i wsp., 2006]. Co więcej, badania wykazały odmienny wpływ BDNF w zależności od płci zwierząt. W szczególności stężenie BDNF w niektórych częściach mózgu, jak również tendencja do rozwoju chorób związanych z niedoborem BDNF (takich jak zachowania typu depresyjnego) są większe u samic. Najprawdopodobniej wynika to ze wzajemnego oddziaływania między BDNF i hormonami płciowymi, gdyż wykazano między innymi, że estrogen wpływa stymulująco na ekspresję i sygnalizację BDNF [Chan i Ye, 2017]. Dlatego też BDNF wydaje się doskonałym kandydatem molekularnym pośredniczącym w przekazywaniu skutków stresu na strukturę kolców dendrytycznych stanowiąc potencjalny

---

marker skutecznych odpowiedzi antydepresyjnych [Fernandes i wsp., 2015; Peng i wsp., 2018; Polyakova i wsp., 2015; Rana i wsp., 2021]. Co ważne, BDNF w mózgu jest substratem MMP-9 [Kuzniewska i wsp., 2013; Lee i wsp., 2001; Mizoguchi i wsp., 2011], co wydaje się szczególnie istotne w kontekście prezentowanych badań. Yoshida i wsp. (2012) zbadali również związek poziomu BDNF i MMP-9 w surowicy krwi pacjentów z depresją i wykazali, że poziom BDNF był znacznie niższy u osób chorych w porównaniu do osób zdrowych, podczas gdy poziom MMP-9 i proBDNF w surowicy nie różniły się. Co ciekawe, autorzy ci odnotowali dodatnią korelację między nasileniem depresji a poziomem MMP-9 w surowicy. Według autorów wspomnianej publikacji zwiększona ekspresja MMP-9 jest odpowiedzią kompensacyjną na redukcję BDNF u pacjentów z depresją. Co więcej badania *in vitro* wykazały bezpośredni związek między wzrostem ekspresji BDNF a kontrolą aktywności MMP-9 w neuronach szczurów [Kuzniewska i wsp., 2013]. Zatem, zarówno ekspresja BDNF, jak i aktywność MMP-9, modulowane przez aktywność synaptyczną wydają się być krytycznym elementem szlaków sygnalizacyjnych, ważnych dla plastyczności synaptycznej neuronów, zarówno tej fizjologicznej, jak i patologicznej.

Wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wpisują się w jeden z głównych nurtów rozumienia współzależności stresu, plastyczności mózgu i różnych obrazów klinicznych zaburzeń depresyjnych, jakim jest rozróżnienie między stanem allostazy a przeciążeniem allostatycznym [Goldstein i McEwen, 2002; McEwen, 2010]. Allostaza odnosi się do dynamicznej zmiany stanu fizjologicznego mającego na celu wsparcie organizmu przewyciężającego niekorzystne zmiany środowiskowe. Stresujące bodźce wymagają adaptacji organizmu, którą zawiaduje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Zjawisko allostazy jest przejściowe i odwracalne umożliwiając organizmowi ponowne osiągnięcie homeostazy. W tym kontekście plastyczność kolców dendrytycznych po stresie może odzwierciedlać taką reorganizację i adaptację, a nie jak się często przyjmuje - formę „uszkodzenia” [McEwen, 2010]. Jednakże wartym podkreślenia jest fakt, że kiedy stresor utrzymuje się długotrwale, zmiany allostatyczne mogą zacząć powodować „zużycie” organizmu prowadząc do przeciążenia allostatycznego, co stanowi podstawę teorii, w jaki sposób przewlekły stres może szkodzić zdrowiu prowadząc między innymi do rozwoju depresji. Jednakże doświadczone określenie, czy szkodliwy wpływ stresu na zdrowie psychiczne jest związany przyczynowo z patologiczną plastycznością strukturalną kolców dendrytycznych jest bardzo trudne i wymaga interdyscyplinarnych badań podłużnych i rozwoju nowych technologii przyżyciowego obrazowania umożliwiającego badanie dynamiki dużych populacji kolców dendrytycznych w czasie. Badania własne oraz dostępna literatura sugerują, że zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw transformacji kolców niedojrzałych w formy bardziej stabilne może być kluczowe, zarówno w leczeniu, jak i zapobieganiu rozwojowi chorób neuropsychiatrycznych [Bączyńska i wsp., 2021;

---

Beroun i wsp., 2019; Bijata i wsp., 2022a; Forrest i wsp., 2018; Krzystyniak i wsp., 2019; Lima Caldeira i wsp., 2019; Zhang i wsp., 2018].

Nowe narzędzia biofizyczne, takie jak fotoaktywowalne białko Rac1 ukierunkowane na aktywną synapsę (AS-PaRac1), umożliwiają kontrolę synaps wzdłuż wybranych segmentów dendrytycznych [Hayashi-Takagi i wsp., 2015]. Co ciekawe, metoda ta została ostatnio zastosowana do selektywnej eliminacji nowo powstałych kolców dendrytycznych a tym samym cofnięcia efektu antydepresyjnego ketaminy [Moda-Sava i wsp., 2019] ukazując tym samym potencjał nowych technologii, które wkrótce mogą umożliwić modulowanie struktury kolców dendrytycznych na dużą skalę [McEwen, 2017].

Innym podejściem w celu lepszego zrozumienia funkcjonalnego znaczenia zmian strukturalnych kolców dendrytycznych w stresie jest badanie zmian strukturalnych następstw stresu, a nie samej ekspozycji na stres. W rzeczywistości, tylko u około 15% osób narażonych na traumatyczne przeżycia rozwija się pełny obraz kliniczny depresji [Alisic i wsp., 2014]. Liczne badania podkreślają znaczenie indywidualnych różnic w behawioralnych i molekularnych reakcjach na stres. Ważnym aspektem jest między innymi rezerwa neuronalna określająca poziom stresu, do którego organizm jest w stanie się przystosować [Bagot i wsp., 2016; Etkin i wsp., 2004; Neves i wsp., 2019; Widman i wsp., 2019]. Takie indywidualne różnice mogą wynikać między innymi z podłoża genetycznego [Hovatta i wsp., 2005], rodzaju matczynej opieki w okresie dojrzewania [Millstein i Holmes, 2007], czy zmian epigenetycznych [McEwen, 2017]. Częste uśrednianie wyników w modelach chorób neuropsychiatrycznych (bez rozróżniania osobników na podtypy behawioralne) sprawia, że niektóre zmiany strukturalne mogą zostać zamaskowane i niezauważone. Zmiany te mogą być również specyficzne dla płci, czego dowodzą wyniki Gruene i wsp. (2016). Biorąc pod uwagę te odkrycia, eksperymenty uwzględniające subpopulacje behawioralne (ANH i RES) mogą zapewnić krytyczny wgląd w formułowane wnioski.

Szczególnie ważnym wydaje się kompleksowa charakterystyka behawioralna i molekularna różnych subpopulacji poddanych chronicznemu stresowi. W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby doniesień naukowych związanych z badaniem podłoża molekularnego różnych fenotypów behawioralnych rozwiniętych w wyniku tej samej procedury stresowania [Anacker i wsp., 2016; Bączyńska i wsp., 2022; Gururajan i wsp., 2019]. Szczególny nacisk położony jest na badanie rezyliencji, przez co badania te stale rozwijają się i obecnie stają przed wyzwaniem wyłonienia spójnego obrazu i syntezy wyników otrzymanych z różnych technik obrazowania, modeli badawczych czy badanych obszarów mózgu. Chociaż prawdopodobnie niemożliwym jest „cofnięcie zegara” i odwrócenie zmian patologicznych wywołanych chronicznym stresem, to zrozumienie

---

mechanizmów molekularnych regulujących te zjawiska może wspomóc wiedzę o sposobach uzyskania rezyliencji i powrotu do zdrowia.

Koncepcja nabycia rezyliencji, w wyniku wzmocnienia mechanizmów molekularnych oporności na stres, zapobiegająca tym samym rozwojowi choroby lub umożliwiająca powrót do zdrowia, cieszy się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem naukowców w kontekście leczenia zaburzeń depresyjnych [Brachman i wsp., 2016; Hodes i wsp., 2014; Lambert i wsp., 2016; Liu i wsp., 2018; Wang i wsp., 2020]. Liczne badania, w tym badania własne [Basile i wsp., 2020; Bączyńska i wsp., 2022; Franklin i wsp., 2012; Ryan i Ryznar, 2022; Stainton i wsp., 2019] opisują mechanizm rezyliencji jako dynamicznie wykształcone zjawisko, co potwierdzają między innymi wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy, dotyczące plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych.

Interesującą koncepcją wydają się także profilaktyczne interwencje farmakologiczne przez zastosowanie np. subanestetycznych dawek ketaminy przed chronicznym stresem [Brachman i wsp., 2016; Krzystyniak i wsp., 2019; McGowan i wsp., 2017; Parise i wsp., 2021]. W przeprowadzonych wcześniej badaniach z wykorzystaniem prezentowanego modelu CUS wykazano, że ketamina promuje rozwój fenotypu RES oraz przyspiesza powrót do zdrowia zwierząt podatnych na anhedonię. Co więcej, zwierzęta leczone ketaminą cechowały zmiany w gęstości i kształcie kolców dendrytycznych w obszarach mózgu związanych z depresją w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano sól fizjologiczną [Krzystyniak i wsp., 2019]. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze odkrycia oraz dostarczają dalszych dowodów na temat związku pomiędzy efektem antydepresyjnym a znaczeniem rearanzacji połączeń synaptycznych w mózgu.

Niemniej jednak, zdecydowanie więcej wiadomo na temat wpływu antydepresantów na plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych po ekspozycji na chroniczny stres, aczkolwiek wyniki te z racji stosowanych różnych leków i ich dawek oraz protokołów chronicznego stresu są trudne do unifikacji. Na przykład, fluoksetyna przywraca fizjologiczne parametry behawioralne oraz długość dendrytów jedynie w hipokampie, ale nie w korze przedczołowej, podczas gdy inny typ leku antydepresyjnego – imipramina, przywraca pierwotne rozgałęzienie drzewka dendrytycznego w obu tych regionach [Bessa i wsp., 2009]. Z kolei inne porównanie fluoksetyny i imipraminy sugeruje, że podawanie fluoksetyny po ekspozycji na stres prowadzi do atrofii komórek nerwowych w DG, podczas gdy szczury otrzymujące imipraminę wykazują hipertrofię w DG w porównaniu do zwierząt kontrolnych [Alves i wsp., 2017]. Z kolei inne nietypowe substancje wywołujące efekty antydepresyjne, jak np. psilocyбина i ketamina, przywracają wywołane stresem zmiany w zachowaniu i w strukturze kolców dendrytycznych w korze przedczołowej [Moda-Sava

---

i wsp., 2019; Shao i wsp., 2021]. Odkrycia te ukazują złożony związek między różnymi rodzajami farmakoterapii oraz ich wpływem na zmiany strukturalne w obrębie różnych obszarów mózgu.

Podsumowując, poznanie mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw zmian behawioralnych i strukturalnych podczas chronicznego stresu wydaje się kluczowe dla zrozumienia jak funkcjonuje mózg. Niniejsza rozprawa doktorska ukazuje jeden z wielu szlaków sygnałowych w hipokampie, zaangażowanych w rozwój zachowań typu depresyjnego jako potencjalny molekularny punkt uchwytu przyszłych farmakoterapii. Przeprowadzone badania umożliwiły potwierdzenie stawianych hipotez o roli 5-HT<sub>7</sub>R w rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy oraz w patologicznej plastyczności kolców dendrytycznych. Jednakże, jak starałam się wykazać w niniejszej dyskusji, zarówno patogeneza depresji, jak i zjawisko rezyliencji wymagają współzależności wielu czynników, od indywidualnych predyspozycji do interakcji wielu szlaków sygnałowych między sieciami neuronalnymi różnych obszarów mózgu. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej przyczyniają się do zrozumienia jak funkcjonuje mózg w warunkach stresu a także wskazują kierunki przyszłych badań interdyscyplinarnych umożliwiających rozwój nowych, skutecznych terapii antydepresyjnych, w których potencjalnym molekularnym punktem uchwytu mógłby być 5-HT<sub>7</sub>R lub szlak sygnałowy od niego zależny.

---

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczące roli 5-HT<sub>7</sub>R w rozwoju zachowań typu depresyjnego u myszy wskazują, iż:

- aktywacja szlaku sygnałowego zależnego od 5-HT<sub>7</sub>R, w którym pośredniczy MMP-9, może być zaangażowana w rozwój zachowań typu depresyjnego u myszy;
- wdrożenie procedury CUS u dorosłych myszy prowadzi do rozwoju zachowań anhedonicznych i rezyliencyjnych;
- aktywacja szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 w hipokampie myszy związana jest z fenotypem anhedonicznym;
- brak aktywacji szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 w hipokampie po ekspozycji na chroniczny stres może być związany z wykształceniem zachowania rezyliencyjnego;
- wzrost aktywności MMP-9 w hipokampie może stanowić uniwersalne zjawisko, współistniejące z rozwojem zachowań depresyjnych;
- aktywacja szlaku sygnałowego 5-HT<sub>7</sub>R/MMP-9/CDC42 może być kluczowa do wywołania zmian strukturalnych w kolcach dendrytycznych;
- zachowanie anhedoniczne myszy związane jest patologiczną plastycznością strukturalną kolców dendrytycznych w regionie CA1 hipokampa, podczas gdy zachowanie rezyliencyjne cechuje kompensacja strukturalna w tym regionie;
- ekspresja 5-HT<sub>7</sub>R w regionie CA1 hipokampa odgrywa istotną rolę w regulowaniu behawioralnej odpowiedzi na chroniczny stres.

Otrzymane wyniki potwierdzają przyjęte hipotezy badawcze stwierdzające, że:

- aktywacja receptora 5-HT<sub>7</sub>R u myszy prowadzi do rozwoju zachowania typu depresyjnego;
- występowanie fenotypu depresyjnego związane jest ze zmianami strukturalnymi kolców dendrytycznych.

---

## 7. OPUBLIKOWANE PRACE NAUKOWE

Prace naukowe zawierające wyniki własne, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, zostały podkreślone.

1. Bijata, M., **Bączyńska, E.**, Włodarczyk, J., (2022). Chronic unpredictable stress protocol for modelling anhedonic and resilient behaviour in C57BL/6J mice. *STAR Protocols*, 3 (3), 101659. DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101659
2. Pochwat, B., Misztak, P., Masternak, J., **Bączyńska, E.**, Bijata, K., Roszkowska, M., Bijata, M., Włodarczyk, J., Szafarz, M., Wyska, E., Muszyńska, B., Krakowska, A., Opoka, W., Nowak, G., Szewczyk, B., (2022). Combined hyperforin and lanicemine treatment instead of ketamine or imipramine restores behavioral deficits induced by chronic restraint stress and dietary zinc restriction in mice. *Front. Pharmacol*, 13:933364. DOI: 10.3389/fphar.2022.933364
3. Bijata, M., **Bączyńska, E.**, Müller, F.E., Bijata, K., Masternak, J., Krzystyniak, A., Szewczyk, B., Siwiec, M., Antoniuk, S., Roszkowska, M., Figiel, I., Magnowska, M., Olszyński, K.H., Wardak, A.D., Hogendorf, A., Ruszczycki, B., Gorinski, N., Labus, J., Stępień, T., Tarka, S., Bojarski, A.J., Tokarski, K., Filipkowski, R.K., Ponimaskin, E., Włodarczyk, J., (2022). Activation of the 5-HT7 receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Reports*, 38 (11), 110532. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110532
4. Figiel, I., **Bączyńska, E.**, Wójtowicz, T., Magnowska, M., Buszka, A., Bijata, M., Włodarczyk, J., (2022). The cell adhesion protein dystroglycan affects the structural remodeling of dendritic spines. *Scientific reports* 12 (1), 1-16. DOI: 10.1038/s41598-022-06462-7
5. Das, N.\*, **Baczyńska, E.\***, Bijata, M., Ruszczycki, B., Zeug, A., Plewczynski, D., Saha, P.K., Ponimaskin, E., Włodarczyk, J., Basu S., (2021). 3dSpAn: An interactive software for 3D segmentation and analysis of dendritic spines. *Neuroinformatics*. DOI: 10.1007/s12021-022-09589-0
6. Strackeljan, L., **Baczyńska, E.**, Cangalaya, C., Baidoe-Ansah, D., Włodarczyk, J., Kaushik, R., Dityatev, A., (2021). Microglia depletion-induced remodeling of extracellular matrix and excitatory synapses in the hippocampus of adult mice. *Cells*, 10 (8), 1862. DOI: 10.3390/cells10081862
7. **Bączyńska, E.**, Pels, K.K., Basu, S., Włodarczyk, J., Ruszczycki, B., (2021). Quantification of dendritic spines remodeling under physiological stimuli and in pathological conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (8), 4053. DOI: 10.3390/ijms22084053



- 
8. Krzystyniak, A.\*, **Baczynska, E.\***, Magnowska, M.\*, Antoniuk, S., Roszkowska, M., Zareba-Koziol, M., Das, N., Basu, S., Pikula, M., Włodarczyk, J., (2019). Prophylactic Ketamine Treatment Promotes Resilience to Chronic Stress and Accelerates Recovery: Correlation with Changes in Synaptic Plasticity in the CA3 Subregion of the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, 8;20 (7). DOI: 10.3390/ijms20071726
  9. Kundys-Siedlecka, M., **Baczynska, E.**, Jönsson-Niedziółka, M., (2019). Electrochemical Detection of Dopamine and Serotonin in the Presence of Interferences in a Rotating Droplet System. *Analytical Chemistry*, 91 (16):10908-10913. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02967
  10. Basu, S., Saha, P.K., Roszkowska, M., Magnowska, M., **Baczynska, E.**, Das, N., Plewczyński, D., Włodarczyk, J., (2018). Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. *Scientific Reports*, 23;8 (1):3545. DOI: 10.1038/s41598-018-21753-8
  11. Podrazka, M., **Bączynska, E.**, Kundys, M., Jeleń, P., Witkowska, Nery E., (2017). Electronic Tongue – A Tool for All Tastes?. *Biosensors*, 8 (1): 3. DOI: 10.3390/bios8010003
  12. Basu, S., Plewczyński, S., Saha, S., Roszkowska, M., Magnowska, M., **Baczynska, E.**, Włodarczyk, J., (2016). 2dSpAn: semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. *Bioinformatics*, 32: 2490-2498. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw172

\* autorzy równorzędni

#### INNE PRACE NAUKOWE OPUBLIKOWANE W CZASOPISMACH NIEZNAJDUJĄCYCH SIĘ W BAZIE JOURNAL CITATION REPORTS (JRC)

1. **Baczynska, E.**, Zareba-Koziol, M., Ruszczycki, B., Krzystyniak, A., Wojtowicz, T., Bijata, K., Pochwat, B., Magnowska, M., Roszkowska, M., Figiel, I., Masternak, J., Dzwonek, J., Worch, R., Olszyński, K.H., Wardak, A.D., Szymczak, P., Radwańska, K., Jahołkowski, P., Hogendorf, A., Filipkowski, R.K., Szewczyk, B., Bijata, M., Włodarczyk, J., The molecular fingerprint of stress resilience. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2022.05.19.492644
2. **Baczyńska, E.**, Krzystyniak, A., Zareba-Koziol, M., Figiel, I., Włodarczyk, J., Wójtowicz, T., (2020). Nowoczesne techniki wykorzystywane do badań eksperymentalnych zaburzonej plastyczności neuronalnej w depresji. *KOSMOS-Problemy Nauk Biologicznych*, Tom 69 Nr 1. DOI: 10.36921/kos.2020\_2637
3. Basu, S., Saha, P.K., **Baczynska, E.**, Roszkowska, M., Magnowska, M., Das, N., Guha, I., Włodarczyk, J., (2018). Segmentation and assessment of structural plasticity of hippocampal dendritic spines from 3D confocal light microscopy. *Proceedings of SPIE*, Vol. 10578, 105780E. DOI: 10.1117/12.2292924

---

## 8. LITERATURA

1. Ahnert-Hilger, G., Höltje, M., Große, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., Just, I. (2004). Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *Journal of Neurochemistry*, 90 (1), 9–18. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02475.x
2. Alaiyed, S., McCann, M., Mahajan, G., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Kellar, K. J., Wu, J. Y., Conant, K. (2020). Venlafaxine Stimulates an MMP-9-Dependent Increase in Excitatory/Inhibitory Balance in a Stress Model of Depression. *Journal of Neuroscience*, 40 (22), 4418–4431. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2387-19.2020
3. Albanesi, J. P., Barylko, B., DeMartino, G. N., Jameson, D. M. (2020). Palmitoylated Proteins in Dendritic Spine Remodeling. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 22. DOI: 10.3389/fnsyn.2020.00022
4. Alfarez, D. N., Joëls, M., Krugers, H. J. (2003). Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. *The European Journal of Neuroscience*, 17 (9), 1928–1934. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02622.x
5. Alisic, E., Zalta, A. K., van Wesel, F., Larsen, S. E., Hafstad, G. S., Hassanpour, K., Smid, G. E. (2014). Rates of post-traumatic stress disorder in trauma-exposed children and adolescents: Meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 204, 335–340. DOI: 10.1192/bjp.bp.113.131227
6. Altar, C. A. (1999). Neurotrophins and depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (2), 59–62. DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01309-7
7. Alves, N. D., Correia, J. S., Patrício, P., Mateus-Pinheiro, A., Machado-Santos, A. R., Loureiro-Campos, E., Morais, M., Bessa, J. M., Sousa, N., Pinto, L. (2017). Adult hippocampal neuroplasticity triggers susceptibility to recurrent depression. *Translational Psychiatry*, 7 (3), e1058. DOI: 10.1038/tp.2017.29
8. Anacker, C., Scholz, J., O'Donnell, K. J., Allemang-Grand, R., Diorio, J., Bagot, R. C., Nestler, E. J., Hen, R., Lerch, J. P., Meaney, M. J. (2016). Neuroanatomic Differences Associated With Stress Susceptibility and Resilience. *Biological Psychiatry*, 79 (10), 840–849. DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.08.009
9. Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., Włodarczyk, J. (2019). Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 99, 101–116. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.002

- 
10. Arellano, J., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: Correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1): 131–143. DOI: 10.3389/neuro.01.1.1.010.2007
  11. Arenaza-Urquijo, E. M., Vemuri, P. (2018). Resistance vs resilience to Alzheimer disease. *Neurology*, 90 (15), 695–703. DOI: 10.1212/WNL.0000000000005303
  12. Ashokan, A., Lim, J. W. H., Hang, N., Mitra, R. (2018). Complex housing causes a robust increase in dendritic complexity and spine density of medial prefrontal cortical neurons. *Scientific Reports*, 8, 7308. DOI: 10.1038/s41598-018-25399-4
  13. Bagot, R. C., Cates, H. M., Purushothaman, I., Lorsch, Z. S., Walker, D. M., Wang, J., Huang, X., Schlüter, O. M., Maze, I., Peña, C. J., Heller, E. A., Issler, O., Wang, M., Song, W.-M., Stein, J. L., Liu, X., Doyle, M. A., Scobie, K. N., Sun, H. S., Neve, R. L., Geschwind, D., Dong, Y., Shen, L., Zhang, B., Nestler, E. J. (2016). Circuit-wide Transcriptional Profiling Reveals Brain Region-Specific Gene Networks Regulating Depression Susceptibility. *Neuron*, 90 (5), 969–983. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.04.015
  14. Bangasser, D. A., Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: Circuits and mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 22 (11), 674–684. DOI: 10.1038/s41583-021-00513-0
  15. Baquero, M., Martín, N. (2015). Depressive symptoms in neurodegenerative diseases. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 3 (8), 682–693. DOI: 10.12998/wjcc.v3.i8.682
  16. Baramova, E. N., Bajou, K., Remacle, A., L’Hoir, C., Krell, H. W., Weidle, U. H., Noel, A., Foidart, J. M. (1997). Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters*, 405 (2), 157–162. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00175-0
  17. Bard, J. A., Zgombick, J., Adham, N., Vaysse, P., Branchek, T. A., Weinshank, R. L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (31), 23422–23426.
  18. Basile, F., Capaccia, C., Zampini, D., Biagetti, T., Diverio, S., Guelfi, G. (2020). Omics Insights into Animal Resilience and Stress Factors. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11 (1), 47. DOI: 10.3390/ani11010047
  19. Basu, S., Plewczynski, D., Saha, S., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Wlodarczyk, J. (2016). 2dSpAn: Semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32 (16), 2490–2498. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw172

- 
20. Basu, S., Saha, P. K., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Das, N., Plewczynski, D., Włodarczyk, J. (2018). Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. *Scientific Reports*, 8 (1), 3545. DOI: 10.1038/s41598-018-21753-8
21. Bączynska, E., Pels, K. K., Basu, S., Włodarczyk, J., Ruszczycki, B. (2021). Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (8), 4053. DOI: 10.3390/ijms22084053
22. Bączynska, E., Zaręba-Kozioł, M., Ruszczycki, B., Krzystyniak, A., Wójtowicz, T., Bijata, K., Pochwat, B., Magnowska, M., Roszkowska, M., Figiel, I., Masternak, J., Dzwonek, J., Worch, R., Olszyński, K. H., Wardak, A. D., Szymczak, P., Radwańska, K., Jahołkowski, P., Hogendorf, A., Filipkowski, R.K., Szewczyk, B., Bijata, M., Włodarczyk, J. (2022). The molecular fingerprint of stress resilience. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2022.05.19.492644
23. Belmaker, R. H., Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *The New England Journal of Medicine*, 358 (1), 55–68. DOI: 10.1056/NEJMra073096
24. Bennur, S., Shankaranarayana Rao, B. S., Pawlak, R., Strickland, S., McEwen, B. S., Chattarji, S. (2007). Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience*, 144 (1), 8–16. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.075
25. Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355–366. DOI:10.1146/annurev.med.60.042307.110802
26. Beroun, A., Mitra, S., Michaluk, P., Pijet, B., Stefaniuk, M., Kaczmarek, L. (2019). MMPs in learning and memory and neuropsychiatric disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (16), 3207–3228. DOI: 10.1007/s00018-019-03180-8
27. Bessa, J. M., Ferreira, D., Melo, I., Marques, F., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., Almeida, O. F. X., Sousa, N. (2009). The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Molecular Psychiatry*, 14 (8), 764–773, 739. DOI: 10.1038/mp.2008.119
28. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313 (5793), 1642–1645. DOI: 10.1126/science.1127344
29. Betzig, E., Trautman, J. K. (1992). Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit. *Science*, 257 (5067), 189–195. DOI: 10.1126/science.257.5067.189
30. Beurel, E., Toups, M., Nemeroff, C. B. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*, 107 (2), 234–256. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.06.002
-

- 
31. Beyeler, A. (2019). Do antidepressants restore lost synapses? *Science*, 364 (6436), 129–130.  
DOI: 10.1126/science.aax0719
32. Bhagwagar, Z., Cowen, P. J., Goodwin, G. M., Harmer, C. J. (2004). Normalization of enhanced fear recognition by acute SSRI treatment in subjects with a previous history of depression. *The American Journal of Psychiatry*, 161(1), 166–168. DOI: 10.1176/appi.ajp.161.1.166
33. Bijata, M., Bączyńska, E., Müller, F. E., Bijata, K., Masternak, J., Krzystyniak, A., Szewczyk, B., Siwiec, M., Antoniuk, S., Roszkowska, M., Figiel, I., Magnowska, M., Olszyński, K. H., Wardak, A. D., Hogendorf, A., Ruszczycki, B., Gorinski, N., Labus, J., Stępień, T., Tarka, S., Bojarski, A.J., Tokarski, K., Filipkowski, R.K., Ponimaskin, E., Włodarczyk, J. (2022). Activation of the 5-HT7 receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Reports*, 38 (11), 110532.  
DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110532
34. Bijata, M., Bączyńska, E., Włodarczyk, J. (2022). A chronic unpredictable stress protocol to model anhedonic and resilient behaviors in C57BL/6J mice. *STAR Protocols*, 3 (3), 101659.  
DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101659
35. Bijata, M., Labus, J., Guseva, D., Stawarski, M., Butzlaff, M., Dzwonek, J., Schneeberg, J., Böhm, K., Michaluk, P., Rusakov, D. A., Dityatev, A., Wilczyński, G., Włodarczyk, J., Ponimaskin, E. (2017). Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix. *Cell Reports*, 19 (9), 1767–1782.  
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.05.023
36. Bijata, M., Włodarczyk, J., Figiel, I. (2015). Dystroglycan controls dendritic morphogenesis of hippocampal neurons in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 199.  
DOI: 10.3389/fncel.2015.00199
37. Blanchard, R. J., Hebert, M., Sakai, R. R., McKittrick, C., Henrie, A., Yudko, E., McEwen, B. S., Blanchard, D. C. (1998). Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive Behavior*, 24 (4), 307–321.  
DOI: 10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<307::AID-AB6>3.0.CO;2-F
38. Blattner, K. M., Canney, D. J., Pippin, D. A., Blass, B. E. (2019). Pharmacology and Therapeutic Potential of the 5-HT7 Receptor. *ACS Chemical Neuroscience*, 10 (1), 89–119.  
DOI: 10.1021/acchemneuro.8b00283
39. Bliss, T. V., Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232 (2), 331–356. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273
-

- 
40. Bobińska, K., Szemraj, J., Czarny, P., Gałęcki, P. (2016). Expression and Activity of Metalloproteinases in Depression. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 1334–1341. DOI: 10.12659/msm.895978
41. Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tschertter, A., Bernardi, G., Surmeier, D. J., Pisani, A. (2007). Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptors: Implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32 (8), 1840–1854. DOI: 10.1038/sj.npp.1301294
42. Bourne, J., Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17 (3), 381–386. DOI: 10.1016/j.conb.2007.04.009
43. Bourne, J. N., Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 47–67. DOI: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646
44. Bouvier, M., Moffett, S., Loisel, T. P., Mouillac, B., Hebert, T., Chidiac, P. (1995). Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: A dynamic modification with functional consequences. *Biochemical Society Transactions*, 23 (1), 116–120. DOI: 10.1042/bst0230116
45. Brachman, R. A., McGowan, J. C., Perusini, J. N., Lim, S. C., Pham, T. H., Faye, C., Gardier, A. M., Mendez-David, I., David, D. J., Hen, R., Denny, C. A. (2016). Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, 79 (9), 776–786. DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.04.022
46. Breviario, S., Senserrich, J., Florensa-Zanuy, E., Garro-Martinez, E., Diaz, A., Castro, E., Pazos, A., Pilar-Cuellar, F. (2022). Brain matrix metalloproteinase-9 activity is altered in the corticosterone mouse model of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*, 120, 110624. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2022.110624
47. Brites, D., Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 476. DOI: 10.3389/fncel.2015.00476
48. Brzdak, P., Wójcicka, O., Zareba-Kozioł, M., Minge, D., Henneberger, C., Włodarczyk, J., Mozrzymas, J. W., Wójtowicz, T. (2019). Synaptic Potentiation at Basal and Apical Dendrites of Hippocampal Pyramidal Neurons Involves Activation of a Distinct Set of Extracellular and Intracellular Molecular Cues. *Cerebral Cortex*, 29 (1): 283-304. DOI: 10.1093/cercor/bhx324
-

- 
49. Bueno-Fernandez, C., Perez-Rando, M., Alcaide, J., Coviello, S., Sandi, C., Castillo-Gómez, E., Nacher, J. (2021). Long term effects of peripubertal stress on excitatory and inhibitory circuits in the prefrontal cortex of male and female mice. *Neurobiology of Stress*, 14, 100322. DOI: 10.1016/j.ynstr.2021.100322
50. Bueno-Notivol, J., Gracia-García, P., Olaya, B., Lasheras, I., López-Antón, R., Santabárbara, J. (2021). Prevalence of depression during the COVID-19 outbreak: A meta-analysis of community-based studies. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 21 (1), 100196. DOI: 10.1016/j.ijchp.2020.07.007
51. Cairncross, K. D., Cox, B., Kerwin, R., Forster, C., Wren, A. F. (1978). Behavioural changes induced by olfactory bulb ablation and intrabulbar injection of 5,6-DHT: Susceptibility to psychotropic drugs [proceedings]. *British Journal of Pharmacology*, 62 (3), 400P-401P.
52. Castrén, E., Monteggia, L. M. (2021). Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Depression and Antidepressant Action. *Biological Psychiatry*, 90 (2), 128–136. DOI: 10.1016/j.biopsych.2021.05.008
53. Cerqueira, J. J., Almeida, O. F. X., Sousa, N. (2008). The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain, Behavior, and Immunity*, 22 (5), 630–638. DOI: 10.1016/j.bbi.2008.01.005
54. Chaaya, C., Devi Thambi, V., Sabuncu, Ö., Abedi, R., Osman Ahmed Osman, A., Uwishema, O., Onyeaka, H. (2022). Ukraine – Russia crisis and its impacts on the mental health of Ukrainian young people during the COVID-19 pandemic. *Annals of Medicine and Surgery*, 79, 104033. DOI: 10.1016/j.amsu.2022.104033
55. Champagne, D. L., Bagot, R. C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M. J., de Kloet, E. R., Joëls, M., Krugers, H. (2008). Maternal care and hippocampal plasticity: Evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28 (23), 6037–6045. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0526-08.2008
56. Chan, C. B., Ye, K. (2017). Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions. *Journal of Neuroscience Research*, 95 (1–2), 328–335. DOI: 10.1002/jnr.23863
57. Chapin, E. M., Andrade, R. (2001). A 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. I. Pharmacological characterization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297 (1), 395–402.
58. Cheng, J., Zhou, X., Miller, E., Witt, R. M., Zhu, J., Sabatini, B. L., Wong, S. T. C. (2007). A Novel Computational Approach for Automatic Dendrite Spines Detection in Two-Photon Laser Scan Microscopy. *Journal of neuroscience methods*, 165 (1), 122–134. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.020
-

- 
59. Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, 161–193. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2019.01.005
60. Cifariello, A., Pompili, A., Gasbarri, A. (2008). 5-HT7 receptors in the modulation of cognitive processes. *Behavioural Brain Research*, 195 (1), 171–179. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.12.012
61. Ciranna, L., Catania, M. V. (2014). 5-HT7 receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: Physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 250. DOI: 10.3389/fncel.2014.00250
62. Colyn, L., Venzala, E., Marco, S., Perez-Otaño, I., Tordera, R. M. (2019). Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. *Behavioural Brain Research*, 373, 112079. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112079
63. Conrad, C. D., Ortiz, J. B., Judd, J. M. (2017). Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. *Physiology Behavior*, 178, 66–81. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.11.017
64. Cook, S. C., Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurobiology*, 60 (2), 236–248. DOI: 10.1002/neu.20025
65. Costa, J. F., Dines, M., Lamprecht, R. (2020). The Role of Rac GTPase in Dendritic Spine Morphogenesis and Memory. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 12. DOI: 10.3389/fnsyn.2020.00012
66. Couch, Y., Anthony, D. C., Dolgov, O., Revischin, A., Festoff, B., Santos, A. I., Steinbusch, H. W., Strekalova, T. (2013). Microglial activation, increased TNF and SERT expression in the prefrontal cortex define stress-altered behaviour in mice susceptible to anhedonia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, 136–146. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.12.017
67. Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*, 64, 293–310. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.04.004
68. D’Agostino, A., English, C. D., Rey, J. A. (2015). Vortioxetine (brintellix): A new serotonergic antidepressant. *P T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40 (1), 36–40.
69. Dahlin, E., Andersson, M., Thorén, A., Hanse, E., Seth, H. (2019). Effects of physical exercise and stress on hippocampal CA1 and dentate gyrus synaptic transmission and long-term potentiation in adolescent and adult Wistar rats. *Neuroscience*, 408, 22–30. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.03.046
-



- 
70. Dahlström, A., Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20 (7), 398–399. DOI: 10.1007/BF02147990
71. Das, N., Baczynska, E., Bijata, M., Ruszczycki, B., Zeug, A., Plewczynski, D., Saha, P. K., Ponimaskin, E., Wlodarczyk, J., Basu, S. (2021). 3dSpAn: An interactive software for 3D segmentation and analysis of dendritic spines. *Neuroinformatics*. DOI: 10.1007/s12021-021-09549-0
72. Davydov, D. M., Stewart, R., Ritchie, K., Chaudieu, I. (2010). Resilience and mental health. *Clinical Psychology Review*, 30 (5), 479–495. DOI: 10.1016/j.cpr.2010.03.003
73. Degasperis, A., Birtwistle, M. R., Volinsky, N., Rauch, J., Kolch, W., Kholodenko, B. N. (2014). Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One*, 9 (1), e87293. DOI: 10.1371/journal.pone.0087293
74. Dityatev, A., Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 21 (2): 353-9. DOI: 10.1038/nrn2898
75. Dogrul, A., Seyrek, M. (2006). Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *British Journal of Pharmacology*, 149 (5), 498–505. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706854
76. Domenici, E., Willé, D. R., Tozzi, F., Prokopenko, I., Miller, S., McKeown, A., Brittain, C., Rujescu, D., Giegling, I., Turck, C. W., Holsboer, F., Bullmore, E. T., Middleton, L., Merlo-Pich, E., Alexander, R. C., Muglia, P. (2010). Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One*, 5 (2), e9166. DOI: 10.1371/journal.pone.0009166
77. Duman, C. H. (2010). Models of depression. *Vitamins and Hormones*, 82, 1–21. DOI: 10.1016/S0083-6729(10)82001-1
78. Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature Medicine*, 22 (3), 238–249. DOI: 10.1038/nm.4050
79. Duncan, M. J., Congleton, M. R. (2010). Neural mechanisms mediating circadian phase resetting by activation of 5-HT7 receptors in the dorsal raphe: Roles of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Brain research*, 1366, 110–119. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.09.103
80. Dutton, A. C., Massoura, A. N., Dover, T. J., Andrews, N. A., Barnes, N. M. (2008). Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT5A receptor. *Neurochemistry International*, 52 (3), 419–425. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.07.020
81. Dziejzicka-Wasylewska, M., Solich, J., Korlatowicz, A., Faron-Górecka, A. (2021). What Do the Animal Studies of Stress Resilience Teach Us? *Cells*, 10 (7), 1630. DOI: 10.3390/cells10071630
-

- 
82. Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J., McEwen, B. S. (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (1), 39–47. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2011.04.015
83. El Khamlichi, C., Reverchon, F., Hervouet-Coste, N., Robin, E., Chopin, N., Deau, E., Madouri, F., Guimpied, C., Colas, C., Menuet, A., Inoue, A., Bojarski, A. J., Guillaumet, G., Suzenet, F., Reiter, E., Morisset-Lopez, S. (2022). Serodolin, a  $\beta$ -arrestin-biased ligand of 5-HT<sub>7</sub> receptor, attenuates pain-related behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119 (21), e2118847119. DOI: 10.1073/pnas.2118847119
84. Errico, M., Crozier, R. A., Plummer, M. R., Cowen, D. S. (2001). 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 102 (2), 361–367. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00460-7
85. Etkin, A., Klemenhagen, K. C., Dudman, J. T., Rogan, M. T., Hen, R., Kandel, E. R., Hirsch, J. (2004). Individual differences in trait anxiety predict the response of the basolateral amygdala to unconsciously processed fearful faces. *Neuron*, 44 (6), 1043–1055. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.12.006
86. Faye, C., McGowan, J. C., Denny, C. A., David, D. J. (2018). Neurobiological Mechanisms of Stress Resilience and Implications for the Aged Population. *Current Neuropharmacology*, 16 (3), 234–270. DOI: 10.2174/1570159X15666170818095105
87. Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 53 (1), 1–24.
88. Fernandes, B. S., Molendijk, M. L., Köhler, C. A., Soares, J. C., Leite, C. M. G. S., Machado-Vieira, R., Ribeiro, T. L., Silva, J. C., Sales, P. M. G., Quevedo, J., Oertel-Knöchel, V., Vieta, E., González-Pinto, A., Berk, M., Carvalho, A. F. (2015). Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: A meta-analysis of 52 studies. *BMC Medicine*, 13 (1), 289. DOI: 10.1186/s12916-015-0529-7
89. Fiala, J. C., Spacek, J., Harris, K. M. (2002). Dendritic Spine Pathology: Cause or Consequence of Neurological Disorders? *Brain Research Reviews*, 39 (1), 29–54. DOI: 10.1016/S0165-0173(02)00158-3
90. Figiel, I., Bączyńska, E., Wójtowicz, T., Magnowska, M., Buszka, A., Bijata, M., Włodarczyk, J. (2022). The cell adhesion protein dystroglycan affects the structural remodeling of dendritic spines. *Scientific Reports*, 12 (1), 2506. DOI: 10.1038/s41598-022-06462-7
-

- 
91. Figiel, I., Kruk, P. K., Zaręba-Kozioł, M., Rybak, P., Bijata, M., Włodarczyk, J., Dzwonek, J. (2021). MMP-9 Signaling Pathways That Engage Rho GTPases in Brain Plasticity. *Cells*, 10 (1), 166. DOI: 10.3390/cells10010166
92. Filatova, E. V., Shadrina, M. I., Slominsky, P. A. (2021). Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. *Cells*, 10 (6), 1283. DOI: 10.3390/cells10061283
93. Forrest, M. P., Parnell, E., Penzes, P. (2018). Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19 (4), 215–234. DOI: 10.1038/nrn.2018.16
94. Franklin, T. B., Saab, B. J., Mansuy, I. M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron*, 75 (5), 747–761. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.08.016
95. Freedman, N. J., Lefkowitz, R. J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Progress in Hormone Research*, 51, 319–351; discussion 352-353.
96. Friedman, A. K., Juarez, B., Ku, S. M., Zhang, H., Calizo, R. C., Walsh, J. J., Chaudhury, D., Zhang, S., Hawkins, A., Dietz, D. M., Murrough, J. W., Ribadeneira, M., Wong, E. H., Neve, R. L., Han, M.-H. (2016). KCNQ channel openers reverse depressive symptoms via an active resilience mechanism. *Nature Communications*, 7, 11671. DOI: 10.1038/ncomms11671
97. Frotscher, M., Studer, D., Graber, W., Chai, X., Nestel, S., Zhao, S. (2014). Fine structure of synapses on dendritic spines. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 94. DOI: 10.3389/fnana.2014.00094
98. Galea, L. A., McEwen, B. S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R. L., Dhabhar, F. S. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*, 81 (3), 689–697. DOI: 10.1016/s0306-4522(97)00233-9
99. Galts, C. P. C., Bettio, L. E. B., Jewett, D. C., Yang, C. C., Brocardo, P. S., Rodrigues, A. L. S., Thacker, J. S., Gil-Mohapel, J. (2019). Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 102, 56–84. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.04.002
100. Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J. R., Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27 (48), 13117–13129. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3322-07.2007
101. Garvin, P., Nilsson, L., Carstensen, J., Jonasson, L., Kristenson, M. (2009). Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are independently associated with psychosocial factors in a middle-aged normal population. *Psychosomatic Medicine*, 71 (3), 292–300. DOI: 10.1097/PSY.0b013e3181960e7f
102. Gasbarri, A., Pompili, A. (2014). Serotonergic 5-HT7 receptors and cognition. *Reviews in the Neurosciences*, 25 (3), 311–323. DOI: 10.1515/revneuro-2013-0066
-

- 
103. Gaspar, R., Soares-Cunha, C., Domingues, A. V., Coimbra, B., Baptista, F. I., Pinto, L., Ambrósio, A. F., Rodrigues, A. J., Gomes, C. A. (2021). Resilience to stress and sex-specific remodeling of microglia and neuronal morphology in a rat model of anxiety and anhedonia. *Neurobiology of Stress*, 14, 100302. DOI: 10.1016/j.ynstr.2021.100302
104. Gehret, A. U., Hinkle, P. M. (2010). Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *The Biochemical Journal*, 428 (2), 235–245. DOI: 10.1042/BJ20100139
105. George, S. R., O’Dowd, B. F., Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1 (10), 808–820. DOI: 10.1038/nrd913
106. Gill, C. H., Soffin, E. M., Hagan, J. J., Davies, C. H. (2002). 5-HT<sub>7</sub> receptors modulate synchronized network activity in rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 42 (1), 82–92. DOI: 10.1016/s0028-3908(01)00149-6
107. Goldstein, D. S., McEwen, B. (2002). Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*, 5 (1), 55–58. DOI: 10.1080/102538902900012345
108. Goldwater, D. S., Pavlides, C., Hunter, R. G., Bloss, E. B., Hof, P. R., McEwen, B. S., Morrison, J. H. (2009). Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. *Neuroscience*, 164 (2), 798–808. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.053
109. Gorinski, N., Bijata, M., Prasad, S., Wirth, A., Abdel Galil, D., Zeug, A., Bazovkina, D., Kondaurova, E., Kulikova, E., Ilchibaeva, T., Zareba-Kozioł, M., Papaleo, F., Scheggia, D., Kochlamazashvili, G., Dityatev, A., Smyth, I., Krzystyniak, A., Włodarczyk, J., Richter, D. W., Strekalova, T., Sigrist, S., Bang, C., Hobub, L., Fiedler, J., Thum, T., Naumenko, V. S., Pandey, G., Ponimaskin, E. (2019). Attenuated palmitoylation of serotonin receptor 5-HT<sub>1A</sub> affects receptor function and contributes to depression-like behaviors. *Nature Communications*, 10 (1), 3924. DOI: 10.1038/s41467-019-11876-5
110. Gorinski, N., Ponimaskin, E. (2013). Palmitoylation of serotonin receptors. *Biochemical Society Transactions*, 41 (1), 89–94. DOI: 10.1042/BST20120235
111. Govindarajan, A., Rao, B. S. S., Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S., Chattarji, S. (2006). Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (35), 13208–13213. DOI: 10.1073/pnas.0605180103

- 
112. Gruene, T., Flick, K., Rendall, S., Cho, J. H., Gray, J., Shansky, R. (2016). Activity-dependent structural plasticity after aversive experiences in amygdala and auditory cortex pyramidal neurons. *Neuroscience*, 328, 157–164. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.045
113. Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812–816. DOI: 10.1038/nature01276
114. Gururajan, A., van de Wouwab, M., Boehme, M., Becker, T., O'Connor, R., Bastiaanssen T. F. S., Moloney, G. M., Lyte, J. M., Silva, A. P. V., Merckx, B., Dinan, T. G., Cryan, F. C. (2019) Resilience to chronic stress is associated with specific neurobiological, neuroendocrine and immune responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80: 583-594. DOI: 10.1016/j.bbi.2019.05.004
115. Guscott, M., Bristow, L. J., Hadingham, K., Rosahl, T. W., Beer, M. S., Stanton, J. A., Bromidge, F., Owens, A. P., Huscroft, I., Myers, J., Rupniak, N. M., Patel, S., Whiting, P. J., Hutson, P. H., Fone, K. C., Biello, S. M., Kulagowski, J. J., McAllister, G. (2005). Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology*, 48 (4), 492–502. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.11.015
116. Guseva, D., Wirth, A., Ponimaskin, E. (2014). Cellular mechanisms of the 5-HT7 receptor-mediated signaling. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 306. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00306
117. Guthrie, C. R., Murray, A. T., Franklin, A. A., Hamblin, M. W. (2005). Differential agonist-mediated internalization of the human 5-hydroxytryptamine 7 receptor isoforms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313 (3), 1003–1010. DOI: 10.1124/jpet.104.081919
118. Han, D. Y., Jeong, H. J., Lee, M. Y. (2015). Bladder Hyperactivity Induced by Chronic Variable Stress in Rats. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms*, 7 (1), 56–61. DOI: 10.1111/luts.12048
119. Harris, A. Z., Atsak, P., Bretton, Z. H., Holt, E. S., Alam, R., Morton, M. P., Abbas, A. I., Leonardo, E. D., Bolkan, S. S., Hen, R., Gordon, J. A. (2018). A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. *Neuropsychopharmacology*, 43(6), 1276–1283. DOI: 10.1038/npp.2017.259
120. Harris, K. M., Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (5), a005587. DOI: 10.1101/cshperspect.a005587
121. Hasin, D. S., Goodwin, R. D., Stinson, F. S., Grant, B. F. (2005). Epidemiology of Major Depressive Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Archives of General Psychiatry*, 62 (10), 1097–1106. DOI: 10.1001/archpsyc.62.10.1097
-

- 
122. Hasler, G. (2010). Pathophysiology of depression: Do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry*, 9 (3), 155–161. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2010.tb00298.x
123. Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y., Loshbaugh, A. L., Kuhlman, B., Hahn, K. M., Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature*, 525(7569), 333–338. DOI: 10.1038/nature15257
124. Hedlund, P. B. (2009). The 5-HT<sub>7</sub> receptor and disorders of the nervous system: An overview. *Psychopharmacology*, 206 (3), 345–354. DOI: 10.1007/s00213-009-1626-0
125. Hedlund, P. B., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S. J., Sutcliffe, J. G. (2005). 5-HT<sub>7</sub> receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. *Biological Psychiatry*, 58 (10), 831–837. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.05.012
126. Heidmann, D. E., Szot, P., Kohen, R., Hamblin, M. W. (1998). Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology*, 37 (12), 1621–1632. DOI: 10.1016/s0028-3908(98)00070-7
127. Heitzman, J. (2020). Impact of COVID-19 pandemic on mental health. *Psychiatria Polska*, 54 (2), 187–198. DOI: 10.12740/PP/120373
128. Hell, S. W., Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19 (11), 780–782. DOI: 10.1364/OL.19.000780
129. Helzer, J. E., Robins, L. N., McEvoy, L. (1987). Post-traumatic stress disorder in the general population. Findings of the epidemiologic catchment area survey. *The New England Journal of Medicine*, 317 (26), 1630–1634. DOI: 10.1056/NEJM198712243172604
130. Henckens, M. J. A. G., van der Marel, K., van der Toorn, A., Pillai, A. G., Fernández, G., Dijkhuizen, R. M., Joëls, M. (2015). Stress-induced alterations in large-scale functional networks of the rodent brain. *NeuroImage*, 105, 312–322. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2014.10.037
131. Highland, J. N., Zanos, P., Georgiou, P., Gould, T. D. (2019). Group II metabotropic glutamate receptor blockade promotes stress resilience in mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44 (10), 1788–1796. DOI: 10.1038/s41386-019-0380-1
132. Hinwood, M., Morandini, J., Day, T. A., Walker, F. R. (2012). Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 22 (6), 1442–1454. DOI: 10.1093/cercor/bhr229
133. Hlushchenko, I., Koskinen, M., Hotulainen, P. (2016). Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton*, 73 (9), 435–441. DOI: 10.1002/cm.21280

- 
134. Ho, W.-C., Zhang, J. (2018). Evolutionary adaptations to new environments generally reverse plastic phenotypic changes. *Nature Communications*, 9, 350. DOI: 10.1038/s41467-017-02724-5
135. Hodes, G. E., Pfau, M. L., Leboeuf, M., Golden, S. A., Christoffel, D. J., Bregman, D., Rebusi, N., Heshmati, M., Aleyasin, H., Warren, B. L., Lebonaté, B., Horn, S., Lapidus, K. A., Stelzhammer, V., Wong, E. H. F., Bahn, S., Krishnan, V., Bolaños-Guzman, C. A., Murrrough, J. W., Merad, M., Russo, S. J. (2014). Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (45), 16136–16141. DOI: 10.1073/pnas.1415191111
136. Holmes, S. E., Scheinost, D., Finnema, S. J., Naganawa, M., Davis, M. T., DellaGioia, N., Nabulsi, N., Matuskey, D., Angarita, G. A., Pietrzak, R. H., Duman, R. S., Sanacora, G., Krystal, J. H., Carson, R. E., Esterlis, I. (2019). Lower synaptic density is associated with depression severity and network alterations. *Nature Communications*, 10 (1), 1529. DOI: 10.1038/s41467-019-09562-7
137. Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45 (2), 279–291. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.01.003
138. Holtmaat, A., Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10 (9), 647–658. DOI: 10.1038/nrn2699
139. Horwitz, A. V., Wakefield, J. C., Lorenzo-Luaces, L. (2017). History of depression. W *The Oxford handbook of mood disorders*. Oxford University Press.
140. Hovatta, I., Tennant, R. S., Helton, R., Marr, R. A., Singer, O., Redwine, J. M., Ellison, J. A., Schadt, E. E., Verma, I. M., Lockhart D. J., Barlow, C. (2005). Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature*, 438, 662–666. DOI: 10.1038/nature04250
141. Hoyer, D., Hannon, J. P., Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 71 (4), 533–554. DOI: 10.1016/s0091-3057(01)00746-8
142. Huang, B., Babcock, H., Zhuang, X. (2010). Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells. *Cell*, 143 (7), 1047–1058. DOI: 10.1016/j.cell.2010.12.002
143. Isingrini, E., Perret, L., Rainer, Q., Amilhon, B., Guma, E., Tanti, A., Martin, G., Robinson, J., Moquin, L., Marti, F., Mechawar, N., Williams, S., Gratton, A., Giros, B. (2016). Resilience to chronic
-

- 
- stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nature Neuroscience*, 19 (4), 560–563. DOI: 10.1038/nn.4245
144. Ji, B., Skup, M. (2021). Roles of palmitoylation in structural long-term synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 14 (1), 8. DOI: 10.1186/s13041-020-00717-y
145. Jia, R., Ayling, K., Chalder, T., Massey, A., Broadbent, E., Coupland, C., Vedhara, K. (2020). Mental health in the UK during the COVID-19 pandemic: Cross-sectional analyses from a community cohort study. *BMJ Open*, 10 (9), e040620. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-040620
146. Johnson-Farley, N. N., Kertesy, S. B., Dubyak, G. R., Cowen, D. S. (2005). Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT<sub>2A</sub> receptors and Gs-coupled 5-HT<sub>7A</sub> receptors in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 92 (1), 72–82. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02832.x
147. Jönsson, S., Lundberg, A. K., Jonasson, L. (2014). Overexpression of MMP-9 and its inhibitors in blood mononuclear cells after myocardial infarction—Is it associated with depressive symptomatology? *PloS One*, 9 (8), e105572. DOI: 10.1371/journal.pone.0105572
148. Jontes, J. D., Smith, S. J. (2000). Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron*, 27 (1), 11–14. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)00003-9
149. Jungblut, D., Vlachos, A., Schuldt, G., Zahn, N., Deller, T., Wittum, G. (2012). SpineLab: Tool for three-dimensional reconstruction of neuronal cell morphology. *Journal of Biomedical Optics*, 17 (7), 076007. DOI: 10.1117/1.JBO.17.7.076007
150. Kane, C., Tomotake, M., Hamatani, S., Chiba, S., Kameoka, N., Watanabe, S., Nakataki, M., Numata, S., Ohmori, T. (2019). Clinical factors influencing resilience in patients with anorexia nervosa. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15, 391–395. DOI: 10.2147/NDT.S190725
151. Katz, R. J., Roth, K. A., Carroll, B. J. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5 (2), 247–251. DOI: 10.1016/0149-7634(81)90005-1
152. Kayser, M. S., Nolt, M. J., Dalva, M. B. (2008). EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron*, 59 (1), 56–69. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.05.007
153. Kessler, R. C. (2007). The global burden of anxiety and mood disorders: Putting ESEMeD findings into perspective. *The Journal of clinical psychiatry*, 68, 10–19.
154. Kim, H., Yi, J. H., Choi, K., Hong, S., Shin, K. S., Kang, S. J. (2014). Regional differences in acute corticosterone-induced dendritic remodeling in the rat brain and their behavioral consequences. *BMC Neuroscience*, 15, 65. DOI: 10.1186/1471-2202-15-65
155. Klar, T. A., Hell, S. W. (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 24(14), 954–956. DOI: 10.1364/OL.24.000954
-



- 
156. Knapska, E., Kaczmarek, L. (2016). Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) in Learning and Memory. *Novel Mechanisms of Memory* (161–181). Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-24364-1\_9
157. Kobe, F., Guseva, D., Jensen, T. P., Wirth, A., Renner, U., Hess, D., Müller, M., Medrihan, L., Zhang, W., Zhang, M., Braun, K., Westerholz, S., Herzog, A., Radyushkin, K., El-Kordi, A., Ehrenreich, H., Richter, D. W., Rusakov, D. A., Ponimaskin, E. (2012). 5-HT<sub>7</sub>R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *The Journal of Neuroscience*, 32 (9), 2915–2930. DOI: 10.1523/jneurosci.2765-11.2012
158. Kobe, F., Renner, U., Woehler, A., Wlodarczyk, J., Papusheva, E., Bao, G., Zeug, A., Richter, D. W., Neher, E., Ponimaskin, E. (2008). Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1783 (8), 1503–1516. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.02.021
159. Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge University Press.
160. Kraus, C., Kadriu, B., Lanzenberger, R., Zarate, C. A., Kasper, S. (2019). Prognosis and improved outcomes in major depression: A review. *Translational Psychiatry*, 9 (1), 127. DOI: 10.1038/s41398-019-0460-3
161. Kreis, P., Barnier, J.-V. (2009). PAK signalling in neuronal physiology. *Cellular Signalling*, 21 (3), 384–393. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.11.001
162. Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., Lee, F. S., Tamminga, C. A., Cooper, D. C., Gershenfeld, H. K., Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131 (2), 391–404. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.018
163. Krobert, K. A., Andressen, K. W., Levy, F. O. (2006). Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptor. *European Journal of Pharmacology*, 532 (1–2), 1–10. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.11.039
164. Krobert, K. A., Bach, T., Syversveen, T., Kvingedal, A., Levy, F. (2001). The cloned human 5-HT<sub>7</sub> receptor splice variants: A comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363 (6), 620–632. DOI: 10.1007/s002100000369
165. Krugers, H. J., Lucassen, P. J., Karst, H., Joëls, M. (2010). Chronic Stress Effects on Hippocampal Structure and Synaptic Function: Relevance for Depression and Normalization by Anti-Glucocorticoid Treatment. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2, 24. DOI: 10.3389/fnsyn.2010.00024
-

- 
166. Krupnick, J. G., Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38, 289–319. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.289
167. Krzystyniak, A., Baczynska, E., Magnowska, M., Antoniuk, S., Roszkowska, M., Zareba-Koziol, M., Das, N., Basu, S., Pikula, M., Wlodarczyk, J. (2019). Prophylactic Ketamine Treatment Promotes Resilience to Chronic Stress and Accelerates Recovery: Correlation with Changes in Synaptic Plasticity in the CA3 Subregion of the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (7), E1726. DOI: 10.3390/ijms20071726
168. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., Kalita, K. (2013). Brain-derived neurotrophic factor induces matrix metalloproteinase 9 expression in neurons via the serum response factor/c-Fos pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33 (11), 2149–2162. DOI: 10.1128/MCB.00008-13
169. Kvachnina, E., Dumuis, A., Wlodarczyk, J., Renner, U., Cochet, M., Richter, D. W., Ponimaskin, E. (2009). Constitutive Gs-mediated, but not G12-mediated, activity of the 5-hydroxytryptamine 5-HT7(a) receptor is modulated by the palmitoylation of its C-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793 (11), 1646–1655. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.008
170. Kvachnina, E., Liu, G., Dityatev, A., Renner, U., Dumuis, A., Richter, D. W., Dityateva, G., Schachner, M., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Ponimaskin, E. G. (2005). 5-HT7 Receptor Is Coupled to G $\alpha$  Subunits of Heterotrimeric G12-Protein to Regulate Gene Transcription and Neuronal Morphology. *The Journal of Neuroscience*, 25 (34), 7821–7830. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005
171. Labus, J., Röhrs, K.-F., Ackmann, J., Varbanov, H., Müller, F. E., Jia, S., Jahreis, K., Vollbrecht, A.-L., Butzlaff, M., Schill, Y., Guseva, D., Böhm, K., Kaushik, R., Bijata, M., Marin, P., Chaumont-Dubel, S., Zeug, A., Dityatev, A., Ponimaskin, E. (2021). Amelioration of Tau pathology and memory deficits by targeting 5-HT7 receptor. *Progress in Neurobiology*, 197, 101900. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101900
172. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
173. Laine, M. A., Shansky, R. M. (2022). Rodent models of stress and dendritic plasticity – Implications for psychopathology. *Neurobiology of Stress*, 17, 100438. DOI: 10.1016/j.ynstr.2022.100438
174. Lambert, K. G., Buckelew, S. K., Staffiso-Sandoz, G., Gaffga, S., Carpenter, W., Fisher, J., Kinsley, C. H. (1998). Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal
-

- 
- neurons in male rats. *Physiology Behavior*, 65 (1), 43–49. DOI: 10.1016/s0031-9384(98)00114-0
175. Lambert, K., Hyer, M., Bardi, M., Rzucidlo, A., Scott, S., Terhune-Cotter, B., Hazelgrove, A., Silva, I., Kinsley, C. (2016). Natural-enriched environments lead to enhanced environmental engagement and altered neurobiological resilience. *Neuroscience*, 330, 386–394. DOI: /10.1016/j.neuroscience.2016.05.037
176. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., Hempstead, B. L. (2001). Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science*, 294 (5548), 1945–1948. DOI: 10.1126/science.1065057
177. Leopoldo, M., Lacivita, E., Berardi, F., Perrone, R., Hedlund, P. B. (2011). Serotonin 5-HT7 receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacology therapeutics*, 129 (2), 120–148. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.013
178. Lesch, K.-P., Waider, J. (2012). Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*, 76 (1), 175–191. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.09.013
179. Li, H., Sheng, Z., Khan, S., Zhang, R., Liu, Y., Zhang, Y., Yong, V. W., Xue, M. (2022). Matrix Metalloproteinase-9 as an Important Contributor to the Pathophysiology of Depression. *Frontiers in Neurology*, 13. DOI: 10.3389/fneur.2022.861843
180. Lima Caldeira, G., Peça, J., Carvalho, A. L. (2019). New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 62–70. DOI: 10.1016/j.conb.2019.01.004
181. Lin, S. L., Johnson-Farley, N. N., Lubinsky, D. R., Cowen, D. S. (2003). Coupling of neuronal 5-HT7 receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *Journal of Neurochemistry*, 87 (5), 1076–1085. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02076.x
182. Liston, C., Miller, M. M., Goldwater, D. S., Radley, J. J., Rocher, A. B., Hof, P. R., Morrison, J. H., McEwen, B. S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26 (30), 7870–7874. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1184-06.2006
183. Liu, H., Irving, H. R., Coupar, I. M. (2001). Expression patterns of 5-HT7 receptor isoforms in the rat digestive tract. *Life Sciences*, 69(21), 2467–2475. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)01318-2
-

- 
184. Liu, H., Zhang, C., Ji, Y., Yang, L. (2018). Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance? *Frontiers in Human Neuroscience*, 12, 326. DOI: 10.3389/fnhum.2018.00326
185. Liu, J., Jordan, L. M. (2005). Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Journal of Neurophysiology*, 94 (2), 1392–1404. DOI: 10.1152/jn.00136.2005
186. Liu, L., Dai, L., Xu, D., Wang, Y., Bai, L., Chen, X., Li, M., Yang, S., Tang, Y. (2022). Astrocyte secretes IL-6 to modulate PSD-95 palmitoylation in basolateral amygdala and depression-like behaviors induced by peripheral nerve injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 104, 139–154. DOI: 10.1016/j.bbi.2022.05.014
187. Liu, L., Xu, X.-B., Qu, Z.-Y., Zhao, L.-P., Zhang, C.-S., Li, Z.-J., Lyu, T.-L., Wang, X.-F., Jing, X.-H., Li, B. (2021). Determining 5HT<sub>7</sub>R's Involvement in Modifying the Antihyperalgesic Effects of Electroacupuncture on Rats With Recurrent Migraine. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 668616. DOI: 10.3389/fnins.2021.668616
188. Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., Chen, H., Zhu, D.-Y., Zhou, Q.-G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, 13 (7), 1686–1698. DOI: 10.1038/s41596-018-0011-z
189. Lovenberg, T. W., Baron, B. M., de Lecea, L., Miller, J. D., Prosser, R. A., Rea, M. A., Foye, P. E., Racke, M., Slone, A. L., Siegel, B. W. (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*, 11 (3), 449–458. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90149-1
190. Luczynski, P., Moquin, L., Gratton, A. (2015). Chronic stress alters the dendritic morphology of callosal neurons and the acute glutamate stress response in the rat medial prefrontal cortex. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 18 (6), 654–667. DOI: 10.3109/10253890.2015.1073256
191. Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1 (3), 173–180. DOI: 10.1038/35044547
192. Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84 (1), 87–136. DOI: 10.1152/physrev.00014.2003
193. MacQueen, G., Frodl, T. (2011). The hippocampus in major depression: Evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? *Molecular Psychiatry*, 16 (3), 252–264. DOI: 10.1038/mp.2010.80

- 
194. Magariños, A. M., Li, C. J., Gal Toth, J., Bath, K. G., Jing, D., Lee, F. S., McEwen, B. S. (2011). Effect of brain-derived neurotrophic factor haploinsufficiency on stress-induced remodeling of hippocampal neurons. *Hippocampus*, 21 (3), 253–264. DOI: 10.1002/hipo.20744
195. Magnowska, M., Gorkiewicz, T., Suska, A., Wawrzyniak, M., Rutkowska-Wlodarczyk, I., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J. (2016). Transient ECM protease activity promotes synaptic plasticity. *Scientific Reports*, 6, 27757. DOI: 10.1038/srep27757
196. Malenka, R. C. (2003). The long-term potential of LTP. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4 (11), 923–926. DOI: 10.1038/nrn1258
197. Malhi, G. S., Mann, J. J. (2018). Depression. *Lancet (London, England)*, 392 (10161), 2299–2312. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31948-2
198. Mancuso, J. J., Cheng, J., Yin, Z., Gilliam, J. C., Xia, X., Li, X., Wong, S. T. C. (2014). Integration of multiscale dendritic spine structure and function data into systems biology models. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 130. DOI: 10.3389/fnana.2014.00130
199. Mao, Y., Xu, Y., Yuan, X. (2022). Validity of chronic restraint stress for modeling anhedonic-like behavior in rodents: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of International Medical Research*, 50 (2), 03000605221075816. DOI: 10.1177/03000605221075816
200. Marsden, W. N. (2013). Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 43: 168-84. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.12.012
201. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4 (11), 1086–1092. DOI: 10.1038/nn736
202. Maul, S., Giegling, I., Fabbri, C., Corponi, F., Serretti, A., Rujescu, D. (2020). Genetics of resilience: Implications from genome-wide association studies and candidate genes of the stress response system in posttraumatic stress disorder and depression. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics*, 183 (2), 77–94. DOI: 10.1002/ajmg.b.32763
203. Mazza, M. G., De Lorenzo, R., Conte, C., Poletti, S., Vai, B., Bollettini, I., Melloni, E. M. T., Furlan, R., Ciceri, F., Rovere-Querini, P., Benedetti, F. (2020). Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 89, 594–600. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.07.037
204. McCorvy, J. D., Roth, B. L. (2015). Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacology Therapeutics*, 150, 129–142. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.009
-

- 
205. McEwen, B. S. (2010). Stress, sex and neural adaptation to a changing environment: Mechanisms of neuronal remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1204, E38–E59. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x
206. McEwen, B. S. (2017). Allostasis and the Epigenetics of Brain and Body Health Over the Life Course: The Brain on Stress. *JAMA Psychiatry*, 74 (6), 551–552. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2017.0270
207. McEwen, B. S., Gray, J. D., Nasca, C. (2014). Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. *Neurobiology of Stress*, 1, 1–11. DOI: 10.1016/j.ynstr.2014.09.001
208. McGowan, J. C., LaGamma, C. T., Lim, S. C., Tsitsiklis, M., Neria, Y., Brachman, R. A., Denny, C. A. (2017). Prophylactic Ketamine Attenuates Learned Fear. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42 (8), 1577–1589. DOI: 10.1038/npp.2017.19
209. McLaughlin, K. J., Baran, S. E., Conrad, C. D. (2009). Chronic stress- and sex-specific neuromorphological and functional changes in limbic structures. *Molecular Neurobiology*, 40 (2), 166–182. DOI: 10.1007/s12035-009-8079-7
210. McLean, C. P., Asnaani, A., Litz, B. T., Hofmann, S. G. (2011). Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *Journal of Psychiatric Research*, 45 (8), 1027–1035. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2011.03.006
211. Ménard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E., Russo, S. J. (2017). Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology*, 42 (1), 62–80. DOI: 10.1038/npp.2016.90
212. Millan, M. J., Marin, P., Bockaert, J., Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: Recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29 (9), 454–464. DOI: 10.1016/j.tips.2008.06.007
213. Millstein, R. A., Holmes, A. (2007). Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31 (1), 3–17. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.05.003
214. Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B. S., Vyas, A., Chattarji, S. (2005). Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (26), 9371–9376. DOI: 10.1073/pnas.0504011102
215. Miyagi, T., Oishi, N., Kobayashi, K., Ueno, T., Yoshimura, S., Murai, T., Fujiwara, H. (2020). Psychological resilience is correlated with dynamic changes in functional connectivity within
-

- 
- the default mode network during a cognitive task. *Scientific Reports*, 10 (1), 17760. DOI: 10.1038/s41598-020-74283-7
216. Mizoguchi, H., Nakade, J., Tachibana, M., Ibi, D., Someya, E., Koike, H., Kamei, H., Nabeshima, T., Itohara, S., Takuma, K., Sawada, M., Sato, J., Yamada, K. (2011). Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Kindled Seizure Development in Pentylentetrazole-Treated Mice by Converting Pro-BDNF to Mature BDNF in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 31 (36), 12963–12971. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3118-11.2011
217. Mizuno, Y., Wartelsteiner, F., Frajo-Apor, B. (2016). Resilience research in schizophrenia: A review of recent developments. *Current opinion in psychiatry*. (3): 218-23. DOI: 10.1097/YCO.0000000000000248
218. Moda-Sava, R. N., Murdock, M. H., Parekh, P. K., Fetcho, R. N., Huang, B. S., Huynh, T. N., Witztum, J., Shaver, D. C., Rosenthal, D. L., Alway, E. J., Lopez, K., Meng, Y., Nellissen, L., Grosenick, L., Milner, T. A., Deisseroth, K., Bito, H., Kasai, H., Liston, C. (2019). Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*, 364 (6436): eaat8078. DOI: 10.1126/science.aat8078
219. Moncrieff, J., Cooper, R. E., Stockmann, T., Amendola, S., Hengartner, M. P., Horowitz, M. A. (2022). The serotonin theory of depression: A systematic umbrella review of the evidence. *Molecular Psychiatry*, 1–14. DOI: 10.1038/s41380-022-01661-0
220. Mumby, S. M. (1997). Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 9 (2), 148–154. DOI: 10.1016/s0955-0674(97)80056-7
221. Murakoshi, H., Wang, H., Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472 (7341), 100–104. DOI: 10.1038/nature09823
222. Nakahata, Y., Yasuda, R. (2018). Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10, 29. DOI: 10.3389/fnsyn.2018.00029
223. Nakayama, A. Y., Harms, M. B., Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20 (14), 5329–5338.
224. Neves, L. T., Neves, P. F. R., Paz, L. V., Zancan, M., Milanesi, B. B., Lazzari, G. Z., da Silva, R. B., de Oliveira, M. M. B. P., Venturin, G. T., Greggio, S., da Costa, J. C., Rasia-Filho, A. A., Mestriner, R. G., Xavier, L. L. (2019). Increases in dendritic spine density in BLA without metabolic changes in a rodent model of PTSD. *Brain Structure and Function*, 224 (8), 2857–2870. DOI: 10.1007/s00429-019-01943-4
-

- 
225. Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E.-E., Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of Neurobiology*, 64 (1), 58–74. DOI: 10.1002/neu.20153
226. Ng, L. H. L., Huang, Y., Han, L., Chang, R. C.-C., Chan, Y. S., Lai, C. S. W. (2018). Ketamine and selective activation of parvalbumin interneurons inhibit stress-induced dendritic spine elimination. *Translational Psychiatry*, 8 (1), 1–15. DOI: 10.1038/s41398-018-0321-5
227. Nikiforuk, A. (2015). Targeting the Serotonin 5-HT<sub>7</sub> Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date. *CNS Drugs*, 29 (4), 265–275. DOI: 10.1007/s40263-015-0236-0
228. Norum, J. H., Hart, K., Levy, F. O. (2003). Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT<sub>4</sub>(b) and 5-HT<sub>7</sub>(a). *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (5), 3098–3104. DOI: 10.1074/jbc.M206237200
229. Numakawa, T., Richards, M., Nakajima, S., Adachi, N., Furuta, M., Odaka, H., Kunugi, H. (2014). The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Comorbid Depression: Possible Linkage with Steroid Hormones, Cytokines, and Nutrition. *Frontiers in Psychiatry*, 5, 136. DOI: 10.3389/fpsy.2014.00136
230. Okabe, S. (2020). Recent advances in computational methods for measurement of dendritic spines imaged by light microscopy. *Microscopy (Oxford, England)*, 69 (4), 196–213. DOI: 10.1093/jmicro/dfaa016
231. Okine, T., Shepard, R., Lemanski, E., Coutellier, L. (2020). Sex Differences in the Sustained Effects of Ketamine on Resilience to Chronic Stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 581360. DOI: 10.3389/fnbeh.2020.581360
232. Okubo, R., Hasegawa, T., Fukuyama, K., Shiroyama, T., Okada, M. (2021). Current Limitations and Candidate Potential of 5-HT<sub>7</sub> Receptor Antagonism in Psychiatric Pharmacotherapy. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 623684. DOI: 10.3389/fpsy.2021.623684
233. Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, 2–18. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.10.031
234. Ortiz, J. B., Conrad, C. D. (2018). The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49, 114–123. DOI: 10.1016/j.yfrne.2018.02.005
235. Overmier, J. B., Seligman, M. E. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63 (1), 28–33. DOI: 10.1037/h0024166
236. Ovtsharoff, W., Segal, M., Goldin, M., Helmeke, C., Kreher, U., Greenberger, V., Herzog, A., Michaelis, B., Braun, K. (2008). Electron microscopic 3D-reconstruction of dendritic spines
-



- 
- in cultured hippocampal neurons undergoing synaptic plasticity. *Developmental Neurobiology*, 68 (7), 870–876. DOI: 10.1002/dneu.20627
237. Papoucheva, E., Dumuis, A., Sebben, M., Richter, D. W., Ponimaskin, E. G. (2004). The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (5), 3280–3291. DOI: 10.1074/jbc.M308177200
238. Parise, E. M., Parise, L. F., Sial, O. K., Cardona-Acosta, A. M., Gyles, T. M., Juarez, B., Chaudhury, D., Han, M.-H., Nestler, E. J., Bolaños-Guzmán, C. A. (2021). The Resilient Phenotype Induced by Prophylactic Ketamine Exposure During Adolescence Is Mediated by the Ventral Tegmental Area–Nucleus Accumbens Pathway. *Biological Psychiatry*, 90 (7), 482–493. DOI: 10.1016/j.biopsych.2021.05.002
239. Parsons, S., Kruijt, A.-W., Fox, E. (2016). A Cognitive Model of Psychological Resilience. *Journal of Experimental Psychopathology*, 7 (3), 296–310. DOI: 10.5127/jep.053415
240. Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 377–401. DOI: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144216
241. Patel, D., Anilkumar, S., Chattarji, S., Buwalda, B. (2018). Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 347, 314–324. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.03.034
242. Pawlak, R., Rao, B. S. S., Melchor, J. P., Chattarji, S., McEwen, B., Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (50), 18201–18206. DOI: 10.1073/pnas.0509232102
243. Paxinos, G., Franklin, K. B. J., (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact. Third edition. Amsterdam. *Elsevier Science Publishing Co. Inc.*
244. Pchitskaya, E., Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 31. DOI: 10.3389/fnsyn.2020.00031
245. Peña, C. J., Nestler, E. J., Bagot, R. C. (2019). Environmental Programming of Susceptibility and Resilience to Stress in Adulthood in Male Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 40. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00040
246. Peng, S., Li, W., Lv, L., Zhang, Z., Zhan, X. (2018). BDNF as a biomarker in diagnosis and evaluation of treatment for schizophrenia and depression. *Discovery Medicine*, 26 (143), 127–136.
-

- 
247. Pereira, A. C., Carvalho, M. C., Padovan, C. M. (2019). Both serotonergic and noradrenergic systems modulate the development of tolerance to chronic stress in rats with lesions of the serotonergic neurons of the median raphe nucleus. *Behavioural Brain Research*, 357–358, 39–47. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.06.037
248. Perić, D., Svob Strac, D. (2007). The role of 5-HT(7) receptors in the control of seizures. *Brain Research*, 1141, 48–55. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.01.019
249. Planchez, B., Surget, A., Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: Drawbacks and challenges. *Journal of Neural Transmission*, 126 (11), 1383–1408. DOI: 10.1007/s00702-019-02084-y
250. Polyakova, M., Stuke, K., Schuemberg, K., Mueller, K., Schoenknecht, P., Schroeter, M. L. (2015). BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic quantitative meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 174, 432–440. DOI: 10.1016/j.jad.2014.11.044
251. Ponimaskin, E., Dumuis, A., Gaven, F., Barthet, G., Heine, M., Glebov, K., Richter, D., Oppermann, M. (2005). Palmitoylation of the 5-Hydroxytryptamine<sub>4a</sub> Receptor Regulates Receptor Phosphorylation, Desensitization, and -Arrestin-Mediated Endocytosis. *Molecular pharmacology*, 67, 1434–1443. DOI: 10.1124/mol.104.008748
252. Ponimaskin, E. G., Heine, M., Joubert, L., Sebben, M., Bickmeyer, U., Richter, D. W., Dumuis, A. (2002). The 5-hydroxytryptamine(4a) receptor is palmitoylated at two different sites, and acylation is critically involved in regulation of receptor constitutive activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (4), 2534–2546. DOI: 10.1074/jbc.M106529200
253. Ponimaskin, E., Voyno-Yasenetskaya, T., Richter, D. W., Schachner, M., Dityatev, A. (2007). Morphogenic signaling in neurons via neurotransmitter receptors and small GTPases. *Molecular Neurobiology*, 35 (3), 278–287. DOI: 10.1007/s12035-007-0023-0
254. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266 (5604), 730–732. DOI: 10.1038/266730a0
255. Price, R. B., Duman, R. (2020). Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: An integrative model. *Molecular Psychiatry*, 25 (3), 530–543. DOI: 10.1038/s41380-019-0615-x
256. Puścian, A., Winiarski, M., Łęski, S., Charzewski, Ł., Nikolaev, T., Borowska, J., Dzik, J. M., Bijata, M., Lipp, H.-P., Dziembowska, M., Knapska, E. (2021). Chronic fluoxetine treatment impairs motivation and reward learning by affecting neuronal plasticity in the central amygdala. *British Journal of Pharmacology*, 178 (3), 672–688. DOI: 10.1111/bph.15319
-

- 
257. Qiao, H., Li, M.-X., Xu, C., Chen, H.-B., An, S.-C., Ma, X.-M. (2016). Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plasticity*, 8056370. DOI: 10.1155/2016/8056370
258. Radley, J. J., Rocher, A. B., Janssen, W. G. M., Hof, P. R., McEwen, B. S., Morrison, J. H. (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Experimental Neurology*, 196 (1), 199–203. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.07.008
259. Radley, J. J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G. M., Liston, C., Hof, P. R., McEwen, B. S., Morrison, J. H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 16 (3), 313–320. DOI: 10.1093/cercor/bhi104
260. Rakesh, G., Morey, R. A., Zannas, A. S., Malik, Z., Marx, C. E., Clausen, A. N., Kritzer, M. D., Szabo, S. T. (2019). Resilience as a translational endpoint in the treatment of PTSD. *Molecular Psychiatry*, 24 (9), 1268–1283. DOI: 10.1038/s41380-019-0383-7
261. Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: An evaluation of the evidence. *Nature Reviews Neuroscience*, 3 (1), 65–71. DOI: 10.1038/nrn700
262. Rana, T., Behl, T., Sehgal, A., Srivastava, P., Bungau, S. (2021). Unfolding the Role of BDNF as a Biomarker for Treatment of Depression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71 (10), 2008–2021. DOI: 10.1007/s12031-020-01754-x
263. Raport World Health Organization (2017). Depression and Other Common Mental Disorders. Mental Health Innovation Network. Pozyskano z <https://www.mhinnovation.net/resources/who-report-depression-and-other-common-mental-disorders> [data dostępu 6.09.2022].
264. Reinhard, S. M., Razak, K., Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: Role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 280. DOI: 10.3389/fncel.2015.00280
265. Renaud, S. (1959). Improved restraint-technique for producing stress and cardiac necrosis in rats. *Journal of Applied Physiology*, 14, 868–869. DOI: 10.1152/jappl.1959.14.5.868
266. Riad, A., Drobov, A., Krobot, M., Antalova, N., Alkasaby, M. A., Perina, A., Koscik, M. (2022). Mental Health Burden of the Russian–Ukrainian War 2022 (RUW-22): Anxiety and Depression Levels among Young Adults in Central Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19 (14), 8418. DOI: 10.3390/ijerph19148418
267. Richter-Levin, G., Sandi, C. (2021). Title: “Labels Matter: Is it stress or is it Trauma?”. *Translational Psychiatry*, 11, 385. DOI: 10.1038/s41398-021-01514-4

- 
268. Roo, M. D., Klauser, P., Muller, D. (2008). LTP Promotes a Selective Long-Term Stabilization and Clustering of Dendritic Spines. *PLoS Biology*, 6 (9), e219. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060219
269. Roozendaal, B., McEwen, B. S., Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10 (6), 423–433. DOI: 10.1038/nrn2651
270. Ross, E. M. (1995). Protein Modification: Palmitoylation in G-protein signaling pathways. *Current Biology*, 5 (2), 107–109. DOI: 10.1016/S0960-9822(95)00026-1
271. Roth, B. L., Craigo, S. C., Choudhary, M. S., Uler, A., Monsma, F. J., Shen, Y., Meltzer, H. Y., Sibley, D. R. (1994). Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268 (3), 1403–1410.
272. Ruat, M., Traffort, E., Leurs, R., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Arrang, J. M., Schwartz, J. C. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (18), 8547–8551. DOI: 10.1073/pnas.90.18.8547
273. Rust, M. J., Bates, M., Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3 (10), 793–796. DOI: 10.1038/nmeth929
274. Ruszczycki, B., Bijata, M., Walczak, A., Wilczynski, G., Włodarczyk, J. (2014). Contemporary Problems in Quantitative Image Analysis in Structural Neuronal Plasticity. *Advanced Computational Approaches to Biomedical Engineering*. DOI: 10.1007/978-3-642-41539-5\_7
275. Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G. M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., Włodarczyk, J. (2012). Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics*, 13 (1), 213. DOI: 10.1186/1471-2105-13-213
276. Ryan, M., Ryznar, R. (2022). The Molecular Basis of Resilience: A Narrative Review. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 856998. DOI: 10.3389/fpsy.2022.856998
277. Rybakowski, J. K. (2009). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) – A Mediating Enzyme in Cardiovascular Disease, Cancer, and Neuropsychiatric Disorders. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2009, 904836. DOI: 10.1155/2009/904836
278. Rybakowski, J. K., Remlinger-Molenda, A., Czech-Kucharska, A., Wojcicka, M., Michalak, M., Losy, J. (2013). Increased serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) levels in young patients during bipolar depression. *Journal of Affective Disorders*, 146 (2), 286–289. DOI: 10.1016/j.jad.2012.07.019
-

- 
279. Ryu, H.-H., Kim, T., Kim, J.-W., Kang, M., Park, P., Kim, Y. G., Kim, H., Ha, J., Choi, J. E., Lee, J., Lim, C.-S., Kim, C.-H., Kim, S. J., Silva, A. J., Kaang, B.-K., Lee, Y.-S. (2019). Excitatory neuron-specific SHP2-ERK signaling network regulates synaptic plasticity and memory. *Science signaling*, 12 (571), eaau5755. DOI: 10.1126/scisignal.aau5755
280. Scheltens, P. (1999). Early diagnosis of dementia: Neuroimaging. *Journal of Neurology*, 246 (1), 16–20. DOI: 10.1007/s004150050300
281. Schill, Y., Bijata, M., Kopach, O., Cherkas, V., Abdel-Galil, D., Böhm, K., Schwab, M. H., Matsuda, M., Compan, V., Basu, S., Bijata, K., Wlodarczyk, J., Bard, L., Cole, N., Dityatev, A., Zeug, A., Rusakov, D. A., Ponimaskin, E. (2020). Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor boosts functional maturation of dendritic spines via RhoA-dependent control of F-actin. *Communications Biology*, 3, 76. DOI: 10.1038/s42003-020-0791-x
282. Schmitt, A., Malchow, B., Hasan, A., Falkai, P. (2014). The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 19. DOI: 10.3389/fnins.2014.00019
283. Schoeffter, P., Ullmer, C., Bobirnac, I., Gabbiani, G., Lübbert, H. (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> receptors in human vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 117 (6), 993–994. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb16687.x
284. Schoenfeld, T. J., McCausland, H. C., Morris, H. D., Padmanaban, V., Cameron, H. A. (2017). Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biological Psychiatry*, 82 (12), 914–923. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.05.013
285. Schwamborn, J. C., Puschel, A. W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience*, 7 (9), 923–929. DOI: 10.1038/nn1295
286. Scott, E. K., Reuter, J. E., Luo, L. (2003). Small GTPase Cdc42 Is Required for Multiple Aspects of Dendritic Morphogenesis. *Journal of Neuroscience*, 23 (8), 3118–3123. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03118.2003
287. Shadrina, M., Bondarenko, E. A., Slominsky, P. A. (2018). Genetics Factors in Major Depression Disease. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 334. DOI: 10.3389/fpsy.2018.00334
288. Shao, L.-X., Liao, C., Gregg, I., Davoudian, P. A., Savalia, N. K., Delagarza, K., Kwan, A. C. (2021). Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex in vivo. *Neuron*, 109 (16), 2535-2544.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.06.008
289. Sheng, M., Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3 (12), a005678. DOI: 10.1101/cshperspect.a005678
-

- 
290. Simpson, G. J. (2006). The diffraction barrier broken. *Nature*, 440 (7086), 879–880. DOI: 10.1038/440879a
291. Siwiec, M., Kusek, M., Sowa, J. E., Tokarski, K., Hess, G. (2020). 5-HT7 receptors increase the excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons by inhibiting the A-type potassium current. *Neuropharmacology*, 177, 108248. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108248
292. Slattery, D. A., Cryan, J. F. (2017). Modelling depression in animals: At the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology*, 234 (9–10), 1451–1465. DOI: 10.1007/s00213-017-4552-6
293. Smirnov, M. S., Garrett, T. R., Yasuda, R. (2018). An open-source tool for analysis and automatic identification of dendritic spines using machine learning. *PLOS ONE*, 13 (7), e0199589. DOI: 10.1371/journal.pone.0199589
294. Solas, M., Van Dam, D., Janssens, J., Ocariz, U., Vermeiren, Y., De Deyn, P. P., Ramirez, M. J. (2021). 5-HT7 receptors in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 150, 105185. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105185
295. Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F., Paula-Barbosa, M. M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97 (2), 253–266. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00050-6
296. Speranza, L., Chambery, A., Di Domenico, M., Crispino, M., Severino, V., Volpicelli, F., Leopoldo, M., Bellenchi, G. C., di Porzio, U., Perrone-Capano, C. (2013). The serotonin receptor 7 promotes neurite outgrowth via ERK and Cdk5 signaling pathways. *Neuropharmacology*, 67, 155–167. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.10.026
297. Stainton, A., Chisholm, K., Kaiser, N., Rosen, M., Upthegrove, R., Ruhrmann, S., Wood, S. J. (2019). Resilience as a multimodal dynamic process. *Early Intervention in Psychiatry*, 13 (4), 725–732. DOI: 10.1111/eip.12726
298. Stawarski, M., Stefaniuk, M., Wlodarczyk, J. (2014). Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 68. DOI: 10.3389/fnana.2014.00068
299. Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6 (4), 557–618. DOI: 10.1016/0306-4522(81)90146-9
300. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85 (3), 367–370. DOI: 10.1007/BF00428203
-

- 
301. Stiedl, O., Pappa, E., Konradsson-Geuken, Å., Ögren, S. O. (2015). The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 162. DOI: 10.3389/fphar.2015.00162
302. Strackeljan, L., Baczynska, E., Cangalaya, C., Baidoe-Ansah, D., Wlodarczyk, J., Kaushik, R., Dityatev, A. (2021). Microglia Depletion-Induced Remodeling of Extracellular Matrix and Excitatory Synapses in the Hippocampus of Adult Mice. *Cells*, 10 (8), 1862. DOI: 10.3390/cells10081862
303. Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F. A., Gass, P. (2004). Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29 (11), 2007–2017. DOI: 10.1038/sj.npp.1300532
304. Strekalova, T., Steinbusch, H. W. M. (2010). Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*, 34 (2), 348–361. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.12.014
305. Stroth, N., Svenningsson, P. (2015). S100B interacts with the serotonin 5-HT7 receptor to regulate a depressive-like behavior. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25 (12), 2372–2380. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2015.10.003
306. Swanger, S. A., Yao, X., Gross, C., Bassell, G. J. (2011). Automated 4D analysis of dendritic spine morphology: Applications to stimulus-induced spine remodeling and pharmacological rescue in a disease model. *Molecular Brain*, 4 (1), 38. DOI: 10.1186/1756-6606-4-38
307. Szepesi, Z., Bijata, M., Ruszczycki, B., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J. (2013). Matrix metalloproteinases regulate the formation of dendritic spine head protrusions during chemically induced long-term potentiation. *PloS One*, 8 (5), e63314. DOI: 10.1371/journal.pone.0063314
308. Tafet, G. E., Nemeroff, C. B. (2016). The Links Between Stress and Depression: Psychoneuroendocrinological, Genetic, and Environmental Interactions. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 28 (2), 77–88. DOI: 10.1176/appi.neuropsych.15030053
309. Takeda, H., Tsuji, M., Ikoshi, H., Yamada, T., Masuya, J., Iimori, M., Matsumiya, T. (2005). Effects of a 5-HT7 receptor antagonist DR4004 on the exploratory behavior in a novel environment and on brain monoamine dynamics in mice. *European Journal of Pharmacology*, 518 (1), 30–39. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.06.012

- 
310. Tamashiro, K. L., Sakai, R. R., Shively, C. A., Karatsoreos, I. N., Reagan, L. P. (2011). Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress*, 14 (5), 468–474. DOI: 10.3109/10253890.2011.606341
311. Tashiro, A., Minden, A., Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: Antagonistic roles of Rac and Rho. *Cerebral Cortex*, 10 (10), 927–938. DOI: 10.1093/cercor/10.10.927
312. Tashiro, A., Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: Evidence for two forms of spine motility. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 26 (3), 429–440. DOI: 10.1016/j.mcn.2004.04.001
313. Tokarski, K., Kusek, M., Hess, G. (2011). 5-HT7 receptors modulate GABAergic transmission in rat hippocampal CA1 area. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 62 (5), 535–540.
314. Tokarski, K., Zahorodna, A., Bobula, B., Hess, G. (2003). 5-HT7 receptors increase the excitability of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Research*, 993 (1–2), 230–234. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.09.015
315. Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17 (5), 678–685. DOI: 10.1038/nn.3682
316. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9), 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350
317. Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420 (6917), 788–794. DOI: /10.1038/nature01273
318. Treccani, G., Ardalan, M., Chen, F., Musazzi, L., Popoli, M., Wegener, G., Nyengaard, J. R., Müller, H. K. (2019). S-Ketamine Reverses Hippocampal Dendritic Spine Deficits in Flinders Sensitive Line Rats Within 1 h of Administration. *Molecular Neurobiology*, 56 (11), 7368–7379. DOI: 10.1007/s12035-019-1613-3
319. Trifu, S. C., Trifu, A. C., Aluș, E., Tătaru, M. A., Costea, R. V. (2020). Brain changes in depression. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 61 (2), 361–370. DOI: 10.47162/RJME.61.2.06
-



- 
320. Tuladhar, B. R., Ge, L., Naylor, R. J. (2003). 5-HT<sub>7</sub> receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology*, 138 (7), 1210–1214. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705184
321. Vafadari, B., Salamian, A., Kaczmarek, L. (2016). MMP-9 in translation: From molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *Journal of Neurochemistry*, 139 (S2), 91–114. DOI: 10.1111/jnc.13415
322. Van Aelst, L., D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Development*, 11 (18), 2295–2322. DOI: 10.1101/gad.11.18.2295
323. van der Kooij, M. A., Fantin, M., Rejmak, E., Grosse, J., Zanoletti, O., Fournier, C., Ganguly, K., Kalita, K., Kaczmarek, L., Sandi, C. (2014). Role for MMP-9 in stress-induced downregulation of nectin-3 in hippocampal CA1 and associated behavioural alterations. *Nature Communications*, 5, 4995. DOI: 10.1038/ncomms5995
324. Volpicelli, F., Speranza, L., di Porzio, U., Crispino, M., Perrone-Capano, C. (2014). The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 318. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00318
325. Vyas, A., Bernal, S., Chattarji, S. (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Research*, 965 (1–2), 290–294. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)04162-8
326. Vyas, A., Jadhav, S., Chattarji, S. (2006). Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, 143 (2), 387–393. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.08.003
327. Vyas, A., Pillai, A. G., Chattarji, S. (2004). Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128 (4), 667–673. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.013
328. Wang, J., Zhao, D., Tiano, S., Esteban-Fernández, A., Yuan, B., Smith, C., Brathwaite, J., Jlayer, Z., Wu, Q., Simon, J. E., Trageser, K. J., Pasinetti, G. M. (2020). Prophylactic effect of flavanol rich preparation metabolites in promoting resilience to a mouse model of social stress. *Translational Psychiatry*, 10 (1), 183. DOI: 10.1038/s41398-020-0859-x
329. Wang, Q., Timberlake, M. A., Prall, K., Dwivedi, Y. (2017). The Recent Progress in Animal Models of Depression. *Progress in neuro-psychopharmacology biological psychiatry*, 77, 99–109. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.008
330. Wearne, S. L., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Rocher, A. B., Henderson, S. C., Hof, P. R. (2005). New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural

- 
- morphology on multiple scales. *Neuroscience*, 136 (3), 661–680.  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.053
331. Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Stachowicz, K. (2006). Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. *European Journal of Pharmacology*, 553 (1–3), 185–190.  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.09.064
332. Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Stachowicz, K., Tatarczyńska, E. (2006). Effect of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology*, 51 (3), 578–586. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.04.017
333. Wesołowska, A., Tatarczyńska, E., Nikiforuk, A., Chojnacka-Wójcik, E. (2007). Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology*, 555 (1), 43–47.  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.10.001
334. Widman, A. J., Cohen, J. L., McCoy, C. R., Unroe, K. A., Glover, M. E., Khan, A. U., Bredemann, T., McMahon, L. L., Clinton, S. M. (2019). Rats bred for high anxiety exhibit distinct fear-related coping behavior, hippocampal physiology, and synaptic plasticity-related gene expression. *Hippocampus*, 29 (10), 939–956. DOI: 10.1002/hipo.23092
335. Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134 (4), 319–329.  
DOI: 10.1007/s002130050456
336. Willner, P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6, 78–93. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002
337. Woehler, A., Wlodarczyk, J., Ponimaskin, E. G. (2009). Specific oligomerization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the plasma membrane. *Glycoconjugate Journal*, 26 (6), 749–756.  
DOI: 10.1007/s10719-008-9187-8
338. Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., Wu, J. Y., Xiong, W. C., Rao, Y. (2001). Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*, 107 (2), 209–221. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00530-x
339. Woolfrey, K. M., Srivastava, D. P. (2016). Control of Dendritic Spine Morphological and Functional Plasticity by Small GTPases. *Neural Plasticity*, 2016, 3025948. DOI: 10.1155/2016/3025948
340. Woolley, D. W., Shaw, E. (1954). A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40, 228–231. DOI: 10.1073/pnas.40.4.228
-

- 
341. Wu, G., Feder, A., Cohen, H., Kim, J. J., Calderon, S., Charney, D. S., Mathé, A. A. (2013). Understanding resilience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 10. DOI: 10.3389/fnbeh.2013.00010
342. Xiao, X., Djuricic, M., Hoogi, A., Sapp, R. W., Shatz, C. J., Rubin, D. L. (2018). Automated dendritic spine detection using convolutional neural networks on maximum intensity projected microscopic volumes. *Journal of Neuroscience Methods*, 309, 25–34. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2018.08.019
343. Xu, J., Ma, H., Liu, Y. (2017). Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Current Protocols in Cytometry*, 81, 12.46.1-12.46.27. DOI: 10.1002/cpcy.23
344. Xu, J., Wang, H., Won, S. J., Basu, J., Kapfhamer, D., Swanson, R. A. (2016). Microglial activation induced by the alarmin S100B is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Glia*, 64 (11), 1869–1878. DOI: 10.1002/glia.23026
345. Yang, G., Pan, F., Gan, W.-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462 (7275), 920–924. DOI: 10.1038/nature08577
346. Yang, T., Nie, Z., Shu, H., Kuang, Y., Chen, X., Cheng, J., Yu, S., Liu, H. (2020). The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14: 82. DOI: 10.3389/fncel.2020.00082
347. Yang, Z., Liu, X., Yin, Y., Sun, S., Deng, X. (2012). Involvement of 5-HT<sub>7</sub> receptors in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, 685 (1–3), 52–58. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.04.011
348. Yasuda, R., Murakoshi, H. (2011). The mechanisms underlying the spatial spreading of signaling activity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21 (2), 313–321. DOI: 10.1016/j.conb.2011.02.008
349. Yi, E.-S., Oh, S., Lee, J., Leem, Y.-H. (2017). Chronic stress-induced dendritic reorganization and abundance of synaptosomal PKA-dependent CP-AMPA receptor in the basolateral amygdala in a mouse model of depression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486 (3), 671–678. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.093
350. Yoshida, T., Ishikawa, M., Niitsu, T., Nakazato, M., Watanabe, H., Shiraishi, T., Shiina, A., Hashimoto, T., Kanahara, N., Hasegawa, T., Enohara, M., Kimura, A., Iyo, M., Hashimoto, K. (2012). Decreased Serum Levels of Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), but Not Its Precursor proBDNF, in Patients with Major Depressive Disorder. *PLoS ONE*, 7 (8), e42676. DOI: 10.1371/journal.pone.0042676
351. Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, 5 (1), 24–34. DOI: 10.1038/nrn1300
-

- 
352. Zareba-Kozioł, M., Bartkowiak-Kaczmarek, A., Figiel, I., Krzystyniak, A., Wojtowicz, T., Bijata, M., Włodarczyk, J. (2019). Stress-induced Changes in the S-palmitoylation and S-nitrosylation of Synaptic Proteins, *Molecular Cellular Proteomics*, 18 (10), 1916–1938. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001581
353. Zareba-Kozioł, M., Figiel, I., Bartkowiak-Kaczmarek, A., Włodarczyk, J. (2018). Insights Into Protein S-Palmitoylation in Synaptic Plasticity and Neurological Disorders: Potential and Limitations of Methods for Detection and Analysis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 175. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00175
354. Zhang, F.-F., Peng, W., Sweeney, J. A., Jia, Z.-Y., Gong, Q.-Y. (2018). Brain structure alterations in depression: Psychoradiological evidence. *CNS Neuroscience Therapeutics*, 24 (11), 94–1003. DOI: 10.1111/cns.12835
355. Zhang, Q., Hu, D. X., He, F., Li, C. Y., Qi, G. J., Cai, H. W., Li, T. X., Ming, J., Zhang, P., Chen, X. Q., Tian, B. (2019). Locus coeruleus-CA1 projections are involved in chronic depressive stress-induced hippocampal vulnerability to transient global ischaemia. *Nature Communications*, 10 (1), 2942. DOI: 10.1038/s41467-019-10795-9
356. Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., Svoboda, K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*, 61 (2), 247–258. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.054
357. Ziv, N. E., Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17(1), 91–102. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80283-4
358. Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., Gan, W.-B. (2005). Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron*, 46 (2), 181–189. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.001

---

## 9. PROGRAMY DO ANALIZY STRUKTURY KOLCÓW DENDRYTYCZNYCH

### **2dSpAn:**

Basu, S., Plewczynski, D., Saha, S., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Wlodarczyk, J. (2016). 2dSpAn: Semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. *Bioinformatics* (Oxford, England), 32 (16), 2490–2498. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw172

### **3dSpAn:**

Basu S., Saha P.K., Roszkowska M., Magnowska M., Baczynska E., Das N., Plewczynski D., Wlodarczyk J., Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines, *Scientific Reports*, 23; 8(1):3545, (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-21753-8

**Imaris Filament Tracer:** Pozyskano z <https://www.oxinst.com/learning/view/article/imaris-filament-tracer-to-detect-and-analyse-neuron-morphology-and-blood-vessels> [data dostępu 6.09.2022].

**MetaMorph Software:** Pozyskano z <https://www.moleculardevices.com/products/cellular-imaging-systems/acquisition-and-analysis-software/metamorph-microscopy> [data dostępu 6.09.2022].

### **NeuronIQ Software:**

Cheng, J., Zhou, X., Miller, E., Witt, R. M., Zhu, J., Sabatini, B. L., Wong, S. T. C. (2007). A Novel Computational Approach for Automatic Dendrite Spines Detection in Two-Photon Laser Scan Microscopy. *Journal of neuroscience methods*, 165 (1), 122–134. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.020

**NeuroLucida® - MBF Bioscience:** Pozyskano z <https://www.mbfbioscience.com/products/neuroLucida> [data dostępu 6.09.2022].

### **NeuronStudio:**

Wearne, S. L., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Rocher, A. B., Henderson, S. C., Hof, P. R. (2005). New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience*, 136 (3), 661–680. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.053

### **SpineLab:**

Jungblut, D., Vlachos, A., Schuldt, G., Zahn, N., Deller, T., Wittum, G. (2012). SpineLab: Tool for three-dimensional reconstruction of neuronal cell morphology. *Journal of Biomedical Optics*, 17 (7), 076007. DOI: 10.1117/1.JBO.17.7.076007