



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

mgr Agata Korlatowicz-Pasieka

**Molekularna charakterystyka uzdeczki u szczurów o
fenotypie depresji lekoopornej oraz wpływ psylocybiny na
zmiany neurobiologiczne w jądrze bocznym**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakologii
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

dr hab. Agata Faron-Górecka, prof. IF PAN

Kraków, 2025

*Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor **dr hab. Agacie Faron-Góreckiej, prof. IF PAN**, za nieocenione wsparcie, życzliwość oraz dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem.*

Dziękuję za opiekę naukową i merytoryczną podczas realizacji rozprawy doktorskiej, za pomoc w rozwijaniu umiejętności badawczych oraz za inspirację i motywację do podejmowania kolejnych naukowych wyzwań.

*Chciałabym również serdecznie podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam okazję współpracować, a w szczególności: **prof. dr hab. Marcie Dziedzickiej-Wasylewskiej, dr Joannie Solich, dr Magdalenie Kolasie, mgr Paulinie Pabian, mgr Katarzynie Latosze** oraz **mgr Karolinie Dobranowskiej** za stworzenie wspaniałej atmosfery pracy, pełnej życzliwości i wzajemnego wsparcia. Dziękuję za inspirujące dyskusje naukowe i nieocenioną pomoc w realizacji doświadczeń.*

*Składam podziękowania **dr hab. Annie Błasiak, prof. UJ**, za nawiązanie współpracy, która umożliwiła realizację badań elektrofizjologicznych oraz **mgr Patrykowi Sambakowi** za ich przeprowadzenie.*

*Dziękuję **prof. dr hab. Mariuszowi Pappowi** za udostępnienie wyników badań przeprowadzonych przez Zespół Zakładu Farmakologii, które znacząco wzbogaciły dyskusję niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Najszczerze podziękowania kieruję do mojej **Rodziny** i **Przyjaciół**, którzy nieustannie mnie wspierali, dodawali otuchy w trudnych momentach oraz niejednokrotnie służyli swoją pomocą i radą. Ich obecność, zrozumienie i życzliwość były dla mnie nieocenionym źródłem siły i motywacji przez cały czas pracy nad rozprawą doktorską.*

*Szczególne podziękowania składam mojemu **Mężowi**, który swoją cierpliwością, troską i wsparciem towarzyszył mi w całej drodze przygotowywania tej rozprawy, nieustannie wierząc w moje możliwości.*

Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z Działalności Statutowej Pracowni Farmakologii Biochemicznej.

Spis treści

1. Wykaz najważniejszych skrótów	3
2. Streszczenie.....	5
3. Abstract	6
4. Wstęp	7
4.1. Depresja	7
4.2. Depresja lekooporna	9
4.3. Szczury Wistar Kyoto.....	11
4.4. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp behawioralny	11
4.5. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp fizjologiczny	13
4.6. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp molekularny	14
4.7. Szczury Wistar Kyoto – odpowiedź na leczenie	15
4.8. Szczury Wistar Kyoto – model depresji lekoopornej	17
4.9. Jądra uzdeczki.....	18
4.10. Psylocybina.....	22
5. Hipoteza i cel pracy.....	27
6. Materiały i metody	28
6.1. Odczynniki chemiczne	28
6.2. Zwierzęta	28
6.3. Podanie psylocybiny	28
6.4. Przygotowanie tkanki	29
6.5. Izolacja miRNA z MHb i LHb	29
6.6. Macierze TaqMan miRNA z MHb i LHb	29
6.7. Izolacja mRNA z mPFC, MHb, LHb, DR i VTA	31
6.8. Macierze TaqMan mRNA z MHb i LHb.....	31
6.9. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy	33
6.10. Barwienie immunofluorescencyjne – KCC2 i 5-HT7	34
6.11. Barwienie immunofluorescencyjne – GIRK4	35
6.12. Elektrofizjologia <i>whole-cell patch clamp</i>	36
6.13. Barwienie immunofluorescencyjne po rejestracji <i>patch clamp</i>	37
6.14. Analiza statystyczna	37
7. Wyniki.....	39
7.1. Ekspresja mikroRNA w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto	40

7.2. Ekspresja genów w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto.....	44
7.3. Poziom białka receptora serotoninowego 5-HT7 i kanału chlorkowo-potasowego KCC2 w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto .	49
7.4. Ekspresja genów w bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	51
7.5. Poziom białka GIRK4 kodowanego przez gen <i>Kcnj5</i> w bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	55
7.6. Ekspresja genu <i>Kcnj5</i> w środkowym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	57
7.7. Ekspresja <i>Gabbr2</i> w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	60
7.8. Ekspresja <i>Ppp2ca</i> w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	62
7.9. Ekspresja <i>Grin2a</i> w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny	64
7.10. Badania elektrofizjologiczne przepływu prądu dokomórkowego przez kanały GIRK w komórkach bocznego jądra uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny.....	66
7.11. Ekspresja genu wczesnej odpowiedzi komórkowej – <i>c-Fos</i> w uzdeczce, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny	68
7.12. Ekspresja genów będących markerami plastyczności synaptycznej – <i>Arc</i> i <i>Psd95</i> w uzdeczce, grzbietowym jądrze szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny	69
8. Dyskusja.....	72
9. Podsumowanie	97
10. Ograniczenia badawcze.....	99
11. Opublikowane prace naukowe	101
12. Literatura.....	103

1. Wykaz najważniejszych skrótów

5-HT_{2a} – receptor serotoninowy 2a

5-HT₇ – receptor serotoninowy 7

BDI – Inwentarz Depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*)

BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

CMS – przewlekły łagodny stres (ang. *Chronic Mild Stress*)

D₂ – receptor dopaminowy 2

DBS – głęboka stymulacja mózgu (ang. *Deep Brain Stimulation*)

DR – jądro grzbietowe szwu (ang. *Dorsal Raphe Nucleus*)

ECT – terapia elektrowstrząsowa (ang. *Electroconvulsive Therapy*)

EPM – test podniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *Elevated Plus Maze*)

fMRI – funkcjonalne obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *functional Magnetic Resonance Imaging*)

FST – test wymuszonego pływania (ang. *Forced Swim Test*)

Hb – uzdeczka (ang. *Habenula*)

HDRS – Skala Oceny Depresji Hamiltona (ang. *Hamilton Depression Rating Scale*)

HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*)

HPT – oś podwzgórze-przysadka-tarczyca (ang. *Hypothalamus-Pituitary-Thyroid*)

IEG – gen wczesnej odpowiedzi (ang. *Immediate Early Gene*)

IPN – jądro międzykonarowe (ang. *Interpeduncular Nucleus*)

LHb – boczne jądro uzdeczki (ang. *Lateral Habenular Nucleus*)

MADRS – Skala Oceny Depresji Montgomery-Åsberg (ang. *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*)

MAOI – inhibitory monoaminooksydazy (ang. *Monoamine Oxidase Inhibitors*)

MHb – środkowe jądro uzdeczki (ang. *Medial Habenular Nucleus*)

mPFC – środkowa kora przedczołowa (ang. *medial Prefrontal Cortex*)

MnR – jądro środkowe szwu (ang. *Median Raphe Nucleus*)

MST – terapia rezonansem magnetycznym (ang. *Magnetic Seizure Therapy*)

mTOR – kinaza ssaczego celu rapamycyny (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*)

MWM – test labiryntu wodnego Morrisa (ang. *Morris Water Maze*)

NDS – normalna surowica ośła (ang. *Normal Donkey Serum*)

NMDA – receptor N-Metylo-D-Asparaginowy (ang. *N-Methyl-D-Aspartate*)

NOR – test rozpoznawania nowego obiektu (ang. *Novel Object Recognition*)

NSFT – test spożywania pokarmu w nowym otoczeniu (ang. *Novelty Suppressed Feeding Test*)

OFT – test otwartego pola (ang. *Open Field Test*)

PFC – kora przedczołowa (ang. *Prefrontal Cortex*)

PTSD – zespół stresu pourazowego (ang. *Post-Traumatic Stress Disorder*)

RAADs – grupa szybko działających leków przeciwdepresyjnych (ang. *Rapid Acting Antidepressants*)

RMTg – grzbietowo-przyśrodkowe jądro nakrywki (ang. *Rostromedial Tegmental Nucleus*)

RT-qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*)

SHR – szczep szczura ze spontanicznie wysokim ciśnieniem tętniczym (ang. *Spontaneously Hypertensive Rat*)

SIT – test interakcji socjalnych (ang. *Social Interaction Test*)

SN – substancja czarna (ang. *Substantia Nigra*)

SNRI – inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*)

SPT – test preferencji sacharozy (ang. *Sucrose Preference Test*)

SSRI – selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*)

Sstr2 – receptor somatostatyny 2

Sstr4 – receptor somatostatyny 4

ST – test pielęgnacyjny (ang. *Splash Test, ST*)

STAI – Inwentarz Stanu i Cechy Lęku (ang. *State-Trait Anxiety Inventory*)

TBS – stymulacja impulsem theta (ang. *Theta-Burst Stimulation*)

TCA – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (ang. *Tricyclic Antidepressants*)

TMS – przezczaszkowa stymulacja magnetyczna (ang. *Transcranial Magnetic Stimulation*)

TRD – depresja lekooporna (ang. *Treatment-Resistant Depression*)

TrkB – kinaza receptora tropomiozyny B (ang. *Tropomyosin receptor kinase B*)

VNS – stymulacja nerwu błędnego (ang. *Vagus Nerve Stimulation*)

VTA – brzuszne pole nakrywki (ang. *Ventral Tegmental Area*)

WIS – szczury Wistar Han

WKY – szczury Wistar Kyoto

2. Streszczenie

Leczenie zaburzeń psychicznych pozostaje jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny, głównie ze względu na ograniczone zrozumienie ich molekularnych podstaw oraz mechanizmów patofizjologicznych. Szczególnie poważnym problemem klinicznym jest depresja lekooporna, która dotyka około jednej trzeciej pacjentów z rozpoznaną depresją i charakteryzuje się brakiem odpowiedzi na standardowe terapie przeciwdepresyjne. Coraz więcej danych wskazuje, że dysfunkcja uzdeczki może odgrywać kluczową rolę w patogenezie zaburzeń nastroju.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było molekularne scharakteryzowanie różnic w obrębie jąder uzdeczki pomiędzy zdrowymi szczurami a zwierzętami o fenotypie depresji lekoopornej – szczurami szczepu Wistar Kyoto. W kontekście poszukiwania nowych strategii terapeutycznych oceniono również wpływ psylocybiny – substancji o udokumentowanym potencjale przeciwdepresyjnym – na funkcjonowanie bocznego jądra uzdeczki.

Wykorzystując metody biochemiczne i molekularne, zidentyfikowano istotne różnice w ekspresji miRNA, mRNA oraz białek. Szczególną uwagę zwrócono na kanał potasowy GIRK4, kodowany przez gen *Kcnj5*, który wyłonił się jako potencjalny molekularny cel działania psylocybiny. Badania elektrofizjologiczne wykazały, że podanie psylocybiny modulowało prądy dkomórkowe w bocznym jądrze uzdeczki, sugerując mechanizm jej działania oparty na przywracaniu równowagi pobudzenia i hamowania w tej strukturze.

Uzyskane wyniki dostarczają nowych danych na temat molekularnych i funkcjonalnych zaburzeń w obrębie uzdeczki u zwierząt o fenotypie depresji lekoopornej oraz wskazują na psylocybinę jako potencjalny modulator aktywności neuronów bocznego jądra uzdeczki poprzez regulację kanału GIRK4. Wyniki te mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami lekooporności oraz rozwoju innowacyjnych terapii przeciwdepresyjnych.

3. Abstract

The treatment of mental disorders remains one of the most significant challenges in contemporary medicine, mainly due to the limited understanding of their molecular bases and underlying pathophysiological mechanisms. A particularly critical clinical issue is treatment-resistant depression, which affects approximately one-third of patients diagnosed with depression and is characterized by a lack of response to standard antidepressant therapies. Growing evidence implicates habenular dysfunction as a key contributor to the pathogenesis of mood disorders.

The present doctoral dissertation aimed to molecularly characterize differences within the habenular nuclei between healthy rats and animals with a treatment-resistant depression phenotype – the Wistar Kyoto strain. In the search for novel therapeutic strategies, the effects of psilocybin – a compound with documented antidepressant potential – on the function of the lateral habenula were also investigated.

Using a combination of biochemical and molecular approaches, significant alterations in miRNA, mRNA, and proteins expression were identified. Special attention was given to the GIRK4 potassium channel, encoded by the *Kcnj5* gene, which emerged as a potential molecular target of psilocybin. Electrophysiological analyses demonstrated that psilocybin administration modulated inwardly currents in the lateral habenula, suggesting a mechanism of action involving the restoration of excitation-inhibition balance within this structure.

These findings provide novel insights into the molecular and functional disturbances of the habenula in animals with a treatment-resistant depression phenotype and highlight psilocybin as a potential modulator of lateral habenula neuronal activity through regulation of the GIRK4 channel. Collectively, the results provide a basis for future research aimed at elucidating the mechanisms underlying treatment resistance and developing innovative antidepressant therapies.

4. Wstęp

Depresja stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, charakteryzuje się złożonym obrazem klinicznym oraz wysoką częstością występowania. Choroba ta objawia się przewlekłym obniżeniem nastroju, utratą zdolności odczuwania przyjemności (anhedonią), a także zaburzeniami somatycznymi i poznawczymi, które znacząco obniżają jakość życia pacjentów. Pomimo rozwoju metod terapeutycznych, około jedna trzecia chorych nie uzyskuje poprawy po zastosowaniu standardowego leczenia, co prowadzi do rozpoznania depresji odpornej na leczenie (ang. *Treatment-Resistant Depression*, TRD). W związku z tym istnieje pilna potrzeba opracowania nowych strategii terapeutycznych opartych na najnowszych odkryciach neurobiologicznych.

Jednym z kluczowych obszarów badań nad neurobiologią depresji jest uzdeczka (ang. *Habenula*, Hb), niewielka struktura mózgu, odgrywająca istotną rolę w regulacji emocji, motywacji i przetwarzania bodźców awersyjnych. Boczne jądro uzdeczki (ang. *Lateral Habenular Nucleus*, LHb) poprzez projekcje do brzuszego pola nakrywki (ang. *Ventral Tegmental Area*, VTA) i jądra grzbietowego szwu (ang. *Dorsal Raphe Nucleus*, DR) reguluje aktywność układów dopaminergicznego i serotonergicznego, kluczowych dla patofizjologii depresji. Nadmierna aktywacja LHb prowadząca do hamowania aktywności tych układów została uznana za istotny mechanizm patofizjologiczny depresji i potencjalny cel terapeutyczny.

Wśród nowoczesnych metod leczenia TRD coraz większe zainteresowanie budzą substancje psychodeliczne, takie jak psylocybina, wykazujące obiecujące działanie przeciwdepresyjne w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Badania na modelach zwierzęcych wskazują, że psylocybina nie tylko normalizuje zachowania depresyjne, ale także wywołuje zmiany w plastyczności synaptycznej, co otwiera nowe perspektywy terapeutyczne w leczeniu TRD.

4.1. Depresja

Depresja to poważna choroba psychiczna, z którą zmagają się coraz więcej osób na całym świecie, niezależnie od płci i wieku. Choroba ta objawia się długotrwałym obniżeniem nastroju, ciągłym uczuciem smutku, brakiem odczuwania przyjemności oraz utratą zainteresowania aktywnościami, które wcześniej sprawiały radość. Może również powodować symptomy fizyczne, takie jak zaburzenia snu, utratę apetytu, zmęczenie i problemy z koncentracją. Objawy

te mogą być przewlekłe i wyniszczające, prowadząc do poważnego pogorszenia codziennego życia. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) z 2023 roku, depresja dotyka około 280 mln osób na całym świecie. Choroba ta jest diagnozowana o połowę częściej u kobiet niż u mężczyzn. Ze względu na wysoką zachorowalność, depresja jest najczęstszą przyczyną niezdolności do pracy na całym świecie, generując tym samym znaczące koszty społeczne i ekonomiczne (who.int, 2023). Depresja jest chorobą silnie powiązaną ze stresem. Doświadczenie stresujących wydarzeń życiowych stanowi istotny czynnik ryzyka wystąpienia epizodów depresyjnych. Wpływ stresu na rozwój depresji jest dodatkowo potęgowany przez predyspozycje genetyczne, które zwiększają indywidualną podatność na jego negatywne skutki (Caspi i wsp., 2010). U pacjentów cierpiących na depresję obserwuje się zaburzenie regulacji głównego układu odpowiedzialnego za reakcję na stres, czyli osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*, HPA), w tym osłabienie procesów ujemnego sprzężenia zwrotnego, czego skutkiem jest przewlekłe podwyższony poziom kortyzolu we krwi (Dean i Keshavan, 2017).

Szacuje się, że częstość występowania depresji w populacji ogólnej w ciągu życia wynosi od 13 do 15%. W leczeniu depresji początkowo stosuje się farmakoterapię, psychoterapię lub połączenie obu tych metod leczenia (Oliveira-Maia i wsp., 2023). Klasyczne leki przeciwdepresyjne odgrywają kluczową rolę w terapii depresji, oferując różnorodne mechanizmy działania i cele molekularne. Wśród nich wyróżnia się kilka głównych grup farmakologicznych: trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (ang. *Tricyclic Antidepressants*, TCA), selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*, SSRI), inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*, SNRI) oraz inhibitory monoaminooksydazy (ang. *Monoamine Oxidase Inhibitors*, MAOI). Jednak pełny efekt terapeutyczny pojawia się dopiero po około dwóch do czterech tygodniach codziennego ich przyjmowania (Chen i wsp., 2023). Tak długi czas oczekiwania na poprawę objawów znacząco przedłuża okres cierpienia pacjentów i zwiększa ryzyko samobójstw (Ramaker i Dulawa, 2017). Co więcej, znaczna część pacjentów nie uzyskuje satysfakcjonującej odpowiedzi na pierwsze próby leczenia farmakologicznego. Ocenia się, że klasyczna farmakoterapia okazuje się całkowicie nieskuteczna u około jednej trzeciej pacjentów, prowadząc do rozpoznania TRD. Wystąpienie TRD wiąże się ze znaczącym pogorszeniem funkcjonowania fizycznego i psychicznego pacjentów, a znaczna część chorych z TRD pozostaje na długoterminowych zwolnieniach lekarskich lub traci zatrudnienie. Ponadto wskaźnik hospitalizacji w tej grupie jest dwukrotnie

wyższy niż w przypadku pacjentów reagujących na leczenie (Oliveira-Maia i wsp., 2023). Jednym z głównych wyzwań w leczeniu TRD jest ograniczona wiedza na temat patologicznych mechanizmów mózgowych odpowiedzialnych za lekooporność. Nadal nie do końca poznano także mechanizmy działania nowoczesnych terapii, takich jak głęboka stymulacja mózgu (ang. *Deep Brain Stimulation*, DBS) czy podania ketaminy (Schwartz i wsp., 2016). Coraz więcej danych wskazuje na istotny związek pomiędzy genetycznie uwarunkowaną podatnością na stres a zwiększonym ryzykiem TRD, co potwierdzono zarówno w badaniach na gryzoniach oraz naczelnych. Aby lepiej zrozumieć fizjologiczne podstawy TRD oraz opracować skuteczniejsze strategie terapeutyczne, niezbędne jest prowadzenie badań na odpowiednich modelach zwierzęcych. Modele te pozwalają na precyzyjną analizę neurobiologicznych mechanizmów depresji oraz na testowanie nowych metod leczenia (Willner i Belzung., 2015).

4.2. Depresja lekooporna

TRD jest definiowana jako stan, w którym pacjent nie osiąga znaczącej poprawy klinicznej pomimo zastosowania odpowiednich dawek co najmniej dwóch różnych leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu farmakologicznym przez odpowiedni okres czasu. Warunkiem koniecznym jest stosowanie leków o różnych profilach działania, aby wykluczyć specyficzną oporność na pojedynczą grupę farmakologiczną (Kolasa i Faron-Górecka, 2023). Ponadto istotne jest utrzymanie leczenia przez odpowiedni czas, gdyż pełen efekt terapeutyczny klasycznych leków przeciwdepresyjnych może wystąpić dopiero po 6–8 tygodniach regularnego stosowania. Chociaż długotrwała remisja stanowi główny cel leczenia depresji, prawdopodobieństwo jej osiągnięcia po niepowodzeniu dwóch kolejnych prób terapeutycznych znacząco maleje, a ryzyko nawrotów oraz pogorszenia funkcjonowania społecznego i psychologicznego rośnie (Oliveira-Maia i wsp., 2023). Wraz ze wzrostem liczby nieudanych prób leczenia obniża się także szansa na osiągnięcie stabilnej remisji. Pacjenci z TRD często wykazują wyższe wskaźniki nawrotów choroby, obniżony poziom funkcjonowania społecznego oraz zwiększoną śmiertelność (Oliveira-Maia i wsp., 2023). Opracowywanie nowych strategii terapeutycznych TRD postępuje powoli, a obecnie stosowana farmakoterapia obejmuje wszystkie klasyczne leki przeciwdepresyjne zatwierdzone do stosowania w leczeniu depresji, w tym SSRI, SNRI, TCA, MAOI oraz inne leki przeciwdepresyjne, takie jak tianeptyna, agomelatyna i agoniści receptora α_2 . Oprócz tego niektóre leki, które nie są zatwierdzone do stosowania jako monoterapia i nie działają bezpośrednio przeciwdepresyjnie, takie jak lit, hormon tarczycy oraz niektóre atypowe leki przeciwpsychotyczne, na przykład kwetiapina, mogą być stosowane jako uzupełnienie terapii przeciwdepresyjnej. Strategie

leczenia farmakologicznego TRD można podzielić na trzy główne kategorie: przełączanie (zmiana jednego leku przeciwdepresyjnego na inny), terapia skojarzona (dodanie innego nowego leku przeciwdepresyjnego do aktualnie stosowanego) oraz terapia wspomagająca/dodatkowa (stosowanie leku, niebędącego lekiem przeciwdepresyjnym, oprócz aktualnie przyjmowanego leku przeciwdepresyjnego) (Heerlein i wsp., 2021). Obecnie w Europie jedynym zatwierdzonym leczeniem farmakologicznym TRD jest esketamina (Spravato®), antagonistą receptora N-Metylo-D-Asparaginowego (ang. *N-Methyl-D-Aspartate*, NMDA), który jest podawany w postaci aerozolu do nosa w połączeniu z SSRI/SNRI (EMA, 2022). W USA, oprócz esketaminy (Spravato®), zatwierdzono również połączenie olanzapiny i chlorowodoru fluoksetyny (Symbyax®) (FDA, 2022).

W leczeniu TRD istotne znaczenie ma zastosowanie różnorodnych metod terapeutycznych. Pomimo tego, że tradycyjne podejścia, takie jak farmakoterapia i psychoterapia często stanowią pierwszy krok w walce z chorobą, istnieją także inne bardziej zaawansowane metody terapeutyczne, które mogą przynieść ulgę pacjentom nieodpowiadającym na leczenie. Należą do nich terapia somatyczna oraz metody stymulacji mózgu, które zostały zbadane i wykorzystywane w leczeniu TRD. Nie są metodami pierwszego rzutu, lecz znajdują zastosowanie w przypadkach, gdy wielokrotne próby farmakoterapii i/lub psychoterapii okazały się nieskuteczne. Metody terapii stymulacji mózgu obejmują: terapię elektrowstrząsową (ang. *Electroconvulsive Therapy*, ECT), przezczaszkową stymulację magnetyczną (ang. *Transcranial Magnetic Stimulation*, TMS), stymulację impulsem theta (ang. *Theta-Burst Stimulation*, TBS), terapię rezonansem magnetycznym (ang. *Magnetic Seizure Therapy*, MST), stymulację nerwu błędnego (ang. *Vagus Nerve Stimulation*, VNS) oraz DBS. Te zaawansowane metody oferują nowe możliwości dla pacjentów, u których tradycyjne leczenie farmakologiczne nie przyniosło oczekiwanych rezultatów, dostarczając alternatywnych rozwiązań w walce z ciężką, oporną na leczenie depresją (Voineskos i wsp., 2020).

Molekularne podłoże TRD nie jest znane. Na rozwój TRD może wpływać wiele różnych czynników, które są indywidualne dla każdego pacjenta. Osoby z depresją różnią się pod względem neurobiologicznym, genetycznym, epigenetycznym i neurochemicznym, co może wpływać na różne odpowiedzi na zastosowane leki przeciwdepresyjne (Kolasa i Faron-Górecka, 2023). Biologiczne czynniki związane z TRD obejmują między innymi: aktywację układu odpornościowego, zaburzenia osi HPA, dysfunkcje w obwodach neuroanatomicznych (szczególnie sieć trybu domyślnego), nieprawidłową aktywność neuronalną czy dysfunkcje w

neuroprzekąźnictwie. Pod względem klinicznym i psychospołecznym TRD pojawia się, gdy pacjent ma częste i nawracające epizody depresyjne, co przyczynia się do wydłużenia czasu trwania choroby, nie przeszedł pełnej remisji choroby, ma współwystępujące choroby psychiczne, wykazuje cechy choroby dwubiegunowej oraz przeszedł wiele stresujących wydarzeń życiowych i traum. Wśród genetycznych czynników łączonych z TRD są polimorfizmy w regionie promotora transportera dla serotoniny 5-HTT (ang. *Serotonin-Transporter-Linked Promoter Region*, 5-HTTLPR) oraz polimorfizmy w genie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) i w genie kodującym receptor dla BDNF (ang. *Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor 2*, NTRK2). Dysfunkcje osobowościowe, takie jak wysoki poziom neurotyczności, niski poziom otwartości oraz brak interakcji socjalnych, także związane są z wystąpieniem TRD (Murphy i wsp., 2017).

4.3. Szczury Wistar Kyoto

Modelowanie zaburzeń psychicznych na zwierzętach dostarcza nieocenionych informacji na temat fizjologii układów narządów oraz mechanizmów leżących u podstaw chorób neuropsychiatrycznych. Pomimo wyzwań związanych z odtworzeniem złożonych objawów klinicznych u zwierząt, odpowiednio dobrane modele pozwalają na dostarczenie cennych informacji o specyficznych aspektach behawioralnych i biologicznych tych chorób, w tym depresji (Monteggia i wsp., 2018). Szczególnie ważnym modelem zwierzęcym wykorzystywanym w badaniach nad TRD są szczury Wistar Kyoto (WKY).

Szczep WKY został wyprowadzony w latach 70. ubiegłego wieku w Szkole Medycznej w Kioto w Japonii z tego samego szczepu Wistar co szczep szczura ze spontanicznie wysokim ciśnieniem tętniczym (ang. *Spontaneously Hypertensive Rat*, SHR), aby stanowić kontrolę normotensyjną (Okamoto i Aoki, 1963). Z czasem okazało się, że szczury WKY wykazują liczne cechy fenotypowe przypominające objawy depresji i zaburzeń lękowych, co doprowadziło do ich szerokiego zastosowania w badaniach nad mechanizmami depresji oraz oporności na leczenie (Willner i wsp., 2019; Papp i wsp., 2019).

4.4. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp behawioralny

Fenotyp behawioralny szczurów WKY obejmuje szereg charakterystycznych zachowań odpowiadających objawom depresyjnym obserwowanym u ludzi (Huang i wsp., 2022; Petković i Chaudhury, 2022). W teście otwartego pola (ang. *Open Field Test*, OFT) szczury WKY

wykazują zmniejszoną aktywność lokomotoryczną oraz preferencję do przebywania w pobliżu ścian areny, co interpretuje się jako zwiększony poziom lęku i brak skłonności do eksploracji (Farinha-Ferreira i wsp., 2024). W teście podniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *Elevated Plus Maze*, EPM) obserwuje się skrócenie czasu przebywania w otwartych ramionach, co potwierdza nasilone zachowania lękowe (Farinha-Ferreira i wsp., 2024; Willner i wsp., 2019). Również w teście spożywania pokarmu w nowym otoczeniu (ang. *Novelty Suppressed Feeding Test*, NSFT) szczury WKY wykazują wydłużony czas do rozpoczęcia jedzenia w nowym środowisku, wskazując na zwiększoną reakcję lękową (Farinha-Ferreira i wsp., 2024). Szczury WKY prezentują także deficyty w zachowaniach społecznych, spędzając mniej czasu na interakcjach z nowymi osobnikami w teście interakcji socjalnych (ang. *Social Interaction Test*, SIT) (Kolasa i wsp., 2024; Farinha-Ferreira i wsp., 2024). Spadek funkcji poznawczych został wykazany w teście rozpoznawania nowego obiektu (ang. *Novel Object Recognition*, NOR), w którym szczury WKY wykazują obniżone zainteresowanie nowymi przedmiotami (Kolasa i wsp., 2024; Willner i wsp., 2019). W teście labiryntu wodnego Morrisa (ang. *Morris Water Maze*, MWM) stwierdzono trudności w uczeniu się lokalizacji ukrytej platformy, co świadczy o upośledzeniu pamięci przestrzennej (She i wsp., 2015). Symptomy anhedonii zostały ocenione w teście pielęgnacyjnym (ang. *Splash Test*, ST), w którym szczury WKY wykazują opóźnioną motywację do pielęgnacji sierści po aplikacji słodkiego roztworu (Farinha-Ferreira i wsp., 2024). Co ciekawe, w krótkiej procedurze testu preferencji sacharozy (ang. *Sucrose Preference Test*, SPT) nie zaobserwowano istotnych różnic w spożyciu sacharozy między szczurami WKY a Wistar (Farinha-Ferreira i wsp., 2024). W teście wymuszonego pływania (ang. *Forced Swim Test*, FST) szczury WKY wykazują wydłużony czas bezruchu oraz zmniejszony czas wspinania się i pływania, co jest interpretowane jako behawioralna bezradność (Kolasa i wsp., 2024; Farinha-Ferreira i wsp., 2024). Szczury WKY charakteryzują się szeregiem specyficznych cech behawioralnych, które czynią je cennym modelem w badaniach nad depresją.

Ponieważ stres jest podstawowym czynnikiem rozwoju depresji, większość ważnych modeli zwierzęcych opiera się na narażeniu zwierząt na sytuacje stresowe. Najczęściej stosowany model polega na narażeniu gryzoni na protokół przewlekłego łagodnego stresu (ang. *Chronic Mild Stress*, CMS), który obejmuje kilka tygodni narażenia na czynniki stresowe takie jak tymczasowe ograniczenie dostępu do wody i/lub pożywienia, modyfikację cyklu światło/ciemność, czy zmoczoną ściółkę (Willner, 2016). Szczury WKY poddane 8-tygodniowej procedurze CMS spędzają mniej czasu w otwartym ramieniu w teście EPM,

wykazują mniejsze zainteresowanie nowym obiektem w teście NOR oraz wykazują zmniejszoną preferencję dla sacharozy w teście SPT w porównaniu ze szczurami WKY niestresowanymi. Zastosowanie procedury CMS pogłębia obserwowany fenotyp szczurów WKY i potwierdza występowanie zaburzeń lękowych, upośledzenie funkcji poznawczych oraz anhedonię u tych zwierząt (Willner i wsp., 2019; Papp i wsp., 2019).

4.5. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp fizjologiczny

Fenotyp fizjologiczny odnosi się do obserwowanych cech organizmu, które wynikają z interakcji jego genotypu ze środowiskiem i dotyczą funkcji biologicznych oraz procesów fizjologicznych. Jednym z aspektów są reakcje hormonalne, w tym odpowiedź hormonalna na stres, czyli regulacja osi HPA oraz osi podwzgórze-przysadka-tarczyca (ang. *Hypothalamus-Pituitary-Thyroid*, HPT) (Redei i wsp., 2023). Szczury WKY wykazują podwyższony podstawowy poziom hormonu adrenokortykotropowego (ang. *Adrenocorticotropin Hormone*, ACTH) i kortykosteronu (ang. *Corticosterone*, CORT) w osoczu w nocy, czyli w czasie największej aktywności (Solberg i wsp., 2001). U pacjentów cierpiących na depresję również obserwuje się znacznie wyższy poziom kortyzolu po przebudzeniu w porównaniu do zdrowych osób (Vreeburg i wsp., 2009). W odpowiedzi na ostry stres szczury WKY wykazują większy wzrost i dłużej utrzymujący się podwyższony poziom ACTH i CORT w osoczu w porównaniu do szczurów kontrolnych (Rittenhouse i wsp., 2002). Dodatkowo szczury WKY mają największe nadnercza w porównaniu do szczurów Wistar, Sprague-Dawley i SHR (Nam i wsp., 2014), co jest spójne ze znacząco zwiększoną objętością nadnerczy u osób z depresją (Rubin i wsp., 1995). Podwyższone podstawowe poziomy ACTH i CORT oraz zwiększona masa nadnerczy są cechami stanu przewlekłego stresu oraz nieustannej aktywacji osi HPA (Redei i wsp., 2023).

Szczury WKY mają podwyższony podstawowy poziom hormonu tyreotropowego (ang. *Thyroid-Stimulating Hormone*, TSH) i trijodotyroniny (ang. *Triiodothyronine*, T3) w osoczu w porównaniu ze szczurami Wistar. Świadczy to o zmniejszonej wrażliwości na hormony tarczycy u szczurów WKY, co jest zgodne z doniesieniami o zaburzeniach regulacji osi HPT u pacjentów z TRD (Redei i wsp., 2001; Solberg i wsp., 2001). Zaobserwowane u szczurów WKY zmiany na poziomie fizjologicznym mogą wpływać na obserwowany behawioralny fenotyp biernego radzenia sobie ze stresem i nadreaktywności na stres (Redei i wsp., 2023).

4.6. Szczury Wistar Kyoto – fenotyp molekularny

Fenotyp molekularny odnosi się do zestawu właściwości i cech organizmu na poziomie molekularnym i obejmuje m.in.: ekspresję genów, profil białkowy czy zmiany epigenetyczne. Szczury WKY wykazują nieprawidłowości w układach monoaminowych, a dokładniej wykazują niższe poziomy serotoniny, dopaminy i noradrenaliny w porównaniu do szczurów kontrolnych (De La Garza i Mahoney, 2004; Aleksandrova i wsp., 2019). Szczury WKY wykazują różnice w funkcjonowaniu układu serotonergicznego. DR będące centrum serotonergicznym charakteryzuje się znacznie niższą pobudliwością neuronów, zmniejszoną aktywnością neuronów serotoninowych (Bruzos-Cidon i wsp., 2014; Lemos i wsp., 2010) oraz obniżonym poziomem serotoniny (nawet o 30% w porównaniu do szczurów Wistar) (Yamada i wsp., 2013). Ponadto DR szczurów WKY cechuje obniżona ekspresja receptora 5-HT1a oraz hydroksylazy tryptofanu 2 (ang. *Tryptophan Hydroxylase 2*, TPH2), kluczowego enzymu zaangażowanego w produkcję serotoniny (Lemos i wsp., 2010). Zmiany w funkcjonowaniu układu dopaminergicznego również zaobserwowano u szczurów WKY. Wykazano obniżony poziom dopaminy w korze przedczołowej (ang. *Prefrontal Cortex*, PFC) oraz podwyższony poziom w jądrze półleżącym (De La Garza i Mahoney, 2004). Zaobserwowano zmniejszoną dostępność receptorów dopaminowych D1 w skorupie jądra ogoniastego i jądrze półleżącym, w przeciwieństwie do substancji czarnej (ang. *Substantia Nigra*, SN), gdzie dostępność była większa u szczurów WKY w porównaniu ze szczurami Wistar (Novick i wsp., 2008). Zwiększoną dostępność receptorów dopaminowych D2 wykazano w jądrze półleżącym (skorupie) i brzusznej części nakrywki, natomiast zmniejszoną dostępność w jądrze półleżącym (rdzeniu), skorupie jądra ogoniastego, podwzgórzu (Yaroslavsky i wsp., 2006) oraz w PFC (Korlatowicz i wsp., 2023) u szczurów WKY. Wykazano również obniżony poziom transportera dla dopaminy (ang. *Dopamine Transporter*, DAT) w jądrze półleżącym i ciele migdałowatym, a także w VTA i SN stanowiących centra dopaminergiczne. Wzrost poziomu zaobserwowano w hipokampie i podwzgórzu, natomiast brak zmian w skorupie jądra ogoniastego (Jiao i wsp., 2003). Różnice wykazano również w układzie noradrenergicznym. Szczury WKY charakteryzuje obniżony poziom noradrenaliny w miejscu sinawym (ang. *Locus Coeruleus*, LC) będącym centrum adrenergicznym oraz zwiększona aktywność neuronów noradrenergicznych (Bruzos-Cidon i wsp., 2014). Nieprawidłowości w funkcjonowaniu układów monoamin mogą powodować, że szczury WKY nie są w stanie odpowiednio zainicjować ani regulować reakcji na stres, co predysponuje je do przyjmowania strategii biernego radzenia sobie ze stresem (Aleksandrova i wsp., 2019).

Funkcjonowanie układu glutaminianergicznego i GABA-ergicznego jest także zmienione u szczurów WKY. Wykazano podwyższony poziom glutaminianu w PFC i hipokampie oraz podwyższony poziom kwasu gamma-aminomasłowego (ang. *Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA) w jądrze półleżącym (Jastrzębska i wsp., 2015). Zaobserwowano zmniejszoną dostępność receptorów NMDA w przedniej korze obręczy, jądrze ogoniastym, jądrze półleżącym, regionie CA1 hipokampa oraz w części siateczkowatej SN u szczurów WKY w porównaniu ze szczurami Wistar. Z kolei zwiększoną dostępność receptora GABA_A stwierdzono w ciele migdałowatym, jądrze ogoniastym, zakręcie zębatym, polach CA2 i CA3 hipokampa, szarej części okołowodociągowej i części siateczkowatej SN u szczurów WKY w porównaniu ze szczurami Wistar (Lei i wsp., 2009). Wykazano obniżony poziom podjednostek receptora NMDA: GluN1, GluN2A, GluN2B, obniżony poziom podjednostki GluA1 receptora AMPA oraz białka gęstości synaptycznej (ang. *Postsynaptic Density Protein 95*, PSD95) w PFC. Ponadto, obniżony poziom glutaminianergicznych receptorów metabotropowych mGluR1 oraz mGluR5 zaobserwowano w PFC i Hip szczurów WKY (Millard i wsp., 2021)

Zgodnie z sugerowaną rolą czynników neurotroficznych w depresji i odpowiedzi na leki przeciwdepresyjne, odnotowano obniżony podstawowy poziom BDNF w surowicy u szczurów WKY w porównaniu do szczurów Wistar (Kyeremanteng i wsp., 2012). Co ważne, szczury WKY wykazują również niższy poziom BDNF w tkance hipokampa i PFC w porównaniu do grup kontrolnych (Vinod i wsp., 2012), co wiąże się również ze znacznym zmniejszeniem objętości hipokampa i kory mózgowej u tego szczepu (Cominski i wsp., 2014).

4.7. Szczury Wistar Kyoto – odpowiedź na leczenie

Stosowanie różnych terapii przeciwdepresyjnych w modelach zwierzęcych dostarcza istotnych informacji na temat potencjalnej skuteczności w leczeniu depresji oraz mechanizmów działania odpowiedzialnych za obserwowany efekt. Ze względu na swoje unikalne cechy behawioralne, molekularne i fizjologiczne, szczury WKY stanowią odpowiedni model do badania reakcji na różne formy leczenia przeciwdepresyjnego, szczególnie leczenia TRD. Wykorzystanie tego modelu pozwala na ocenę skuteczności różnych terapii przeciwdepresyjnych oraz ich podłoża molekularnego (Aleksandrova i wsp., 2019).

Jednorazowe podanie imipraminy (TCA) lub dezipraminy (TCA, SNRI), jak również 8-OH-DPAT (8-hydroksy-2-(di-n-propyloamino)tetralina) będącego agonistą receptora 5-HT_{1a} nie wpływa na poprawę fenotypu depresyjnego szczurów WKY w teście FST (Lahmame i wsp., 1997; Lahmame i Armario, 1996). Dopiero zastosowanie wysokiej dawki dezipraminy

(25 mg/kg) (Lahmame i Armario, 1996), chroniczne podawanie dezipraminy (Tejani-Butt i wsp., 2003) lub chroniczne podawanie imipraminy skutkuje zmniejszeniem czasu bezruchu w teście FST (Nagasawa i wsp., 2015; Lahmame i wsp., 1997). Podobnie, chroniczne podawanie nomifenzyny, inhibitora wychwytu zwrotnego noradrenaliny i dopaminy, wykazuje działanie u szczurów WKY (Tejani-Butt i wsp., 2003). Z kolei chroniczne podawanie fluoksetyny lub paroksetyny, należących do grupy SSRI nie wykazuje działania przeciwdepresyjnego u szczurów WKY w teście FST (Tejani-Butt i wsp., 2003; Griebel i wsp., 1999).

Jednorazowe podanie ketaminy szczurom WKY w dawkach 1, 3 oraz 5 mg/kg wykazuje szybkie działanie przeciwdepresyjne, widoczne już po 30 minutach w teście FST. Efekt ten utrzymuje się do 24 godzin po podaniu przy dawce 5 mg/kg. Ketamina (5 mg/kg) powoduje tymczasowe obniżenie aktywności lokomotorycznej szczurów WKY, obserwowane 30 minut po podaniu. Jednak po 24 godzinach różnice w aktywności lokomotorycznej nie są już zauważalne (McDonnell i wsp., 2021).

Natychmiastowy efekt przeciwdepresyjny zaobserwowano u szczurów WKY po zastosowaniu DBS w obrębie LHb. Po 15 minutach od stymulacji odnotowano wzrost preferencji sacharozy w teście SPT, skrócenie czasu bezruchu w teście FST, zwiększenie aktywności lokomotorycznej oraz wzrost czasu spędzanego w obszarze centralnym w teście OFT. DBS w obrębie LHb znacząco łagodzi objawy depresyjne u szczurów WKY w ciągu kilku minut po stymulacji LHb (Li i wsp., 2023).

Zastosowanie ECT u szczurów WKY również przyczyniło się do odwrócenia fenotypu depresyjnego. Już po jednokrotnym poddaniu szczurów ECT za pomocą elektrod umieszczanych na uszach odnotowano znaczące skrócenie czasu bezruchu w teście FST. Efekt ten utrzymał się po 5-dniowej codziennej ECT (Kyeremanteng i wsp., 2014).

Szczury WKY poddane procedurze CMS wykazują oporność na konwencjonalne leki przeciwdepresyjne. Przeprowadzone badania wskazują, że chroniczne podawanie trzech leków o różnych profilach farmakologicznych: imipraminy (TCA), citalopramu (SSRI) i wenlafaksyny (SNRI) nie przyczynia się do poprawy objawów depresyjnych, które oceniono w trzech testach behawioralnych: EPM, NOR i SPT. Skuteczne okazało się dopiero połączenie leczenia farmakologicznego z DBS (dwie dwugodzinne sesje) w obrębie brzuszno-przyśrodkowej korze przedczołowej (ang. *ventro-medial Prefrontal Cortex*, vm-PFC). Wyjątek stanowiło połączenie podawania imipraminy z DBS, które nie zwiększyło spożycia sacharozy w teście SPT. Poprawę zaobserwowano także po 8-dniowym, codziennym podawaniu ketaminy

(10 mg/kg) w teście SPT, dwukrotnym podaniu ketaminy w teście EPM i trzykrotnym podaniu ketaminy w teście NOR (Willner i wsp., 2019).

Szczury WKY nie reagują na jednokrotne podanie klasycznych leków przeciwdepresyjnych, analogicznie do pacjentów chorujących na depresję. Ich słaba reakcja na długotrwałe leczenie przeciwdepresyjne, a nawet brak odpowiedzi w przypadku leków z grupy SSRI potwierdza, że szczury WKY stanowią dobry model do badania oporności na leki przeciwdepresyjne. Ponadto, szczury WKY reagują na nowoczesne, szybko działające terapie przeciwdepresyjne, takie jak podanie ketaminy, terapia ECT i DBS, które również okazały się skuteczne w leczeniu osób cierpiących na TRD (Aleksandrova i wsp., 2019).

4.8. Szczury Wistar Kyoto – model depresji lekoopornej

Pomimo złożoności TRD i licznych czynników, które mogą na nie wpływać, badania nad tym zaburzeniem są niezwykle ważne. Wydaje się, że model zwierzęcy TRD daje możliwość zbadania nie tylko mechanizmów leżących u podstaw opornej na leczenie depresji, ale także nowych potencjalnych terapii (Kolasa i Faron-Górecka, 2023; Willner i wsp., 2019).

Dobry model zwierzęcy można opisać z perspektywy kilku kluczowych aspektów:

- podobieństwa – odnosi się do podobieństwa czynników wywołujących chorobę i objawów u ludzi. Poprawność naśladowcza (ang. *face validity*) oznacza, że model zwierzęcy wykazuje zewnętrzne objawy i reakcje podobne do tych obserwowanych u ludzi cierpiących na daną chorobę;
- przewidywalności – odnosi się do odpowiedzi i podobieństwa odpowiedzi na standardowe leczenie kliniczne. Poprawność prognostyczna (ang. *predictive validity*) wskazuje, że model zwierzęcy wykazuje reakcje na leczenie podobne do tych obserwowanych u ludzi, co umożliwia przewidywanie skuteczności terapii w populacji ludzkiej;
- mechanizmu – odnosi się do podobieństwa fizjologicznych lub psychologicznych mechanizmów choroby. Poprawność konstrukcyjna (ang. *construct validity*) sugeruje, że model zwierzęcy odzwierciedla wewnętrzne mechanizmy i procesy chorobowe, które są odpowiedzialne za rozwój i przebieg choroby u ludzi.

Pomimo złożoności zjawiska TRD, zwierzęcy model – szczury WKY – wydaje się spełniać powyższe kryteria. Szczury WKY wykazują podobieństwo zarówno czynników wywołujących

chorobę, jak i symptomów obserwowanych u ludzi. Stres, będący jednym z głównych czynników rozwoju depresji u ludzi, pogłębia fenotyp depresyjny szczurów WKY w procedurze CMS. Można również zaobserwować wystąpienie anhedonii, która jest charakterystycznym objawem depresji u ludzi. Ponadto, szczury WKY wykazują brak odpowiedzi na podawane leki przeciwdepresyjne, co jest zgodne z obserwacjami u około 30% chorych na depresję, którzy nie reagują na standardowe leczenie. To spełnia kryterium przewidywalności reakcji oraz podobieństwa odpowiedzi na standardowe leczenie kliniczne. Ostatnie kryterium dotyczy podobieństwa fizjologicznych lub psychologicznych mechanizmów choroby. U szczurów WKY obserwuje się m.in. rozregulowanie osi HPA oraz obniżony poziom monoamin, co również jest charakterystyczne dla osób cierpiących na depresję. Dzięki temu model szczurów WKY może być użyteczny w badaniach nad mechanizmami depresji oraz w poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych (Kolasa i Faron-Górecka, 2023; Willner i wsp., 2019).

4.9. Jądra uzdeczki

Jądra Hb są neuroanatomiczną strukturą regulującą obwody mózgowe, które są krytyczne dla wielu stanów behawioralnych związanych z motywacją i podejmowaniem decyzji. Znajdujące się w międzymózgowiu (ang. *diencephalon*), będące częścią nadwzgorza (ang. *epithalamus*) i graniczące ze ścianą trzeciej komory mózgu, Hb jest wysoce konserwowanym obszarem mózgu kręgowców, występującym u wielu gatunków, takich jak ryby, płazy, gady, gryzonie, naczelnie i ludzie (Groos i Helmchen, 2024). Hb dzieli się na dwa podregiony: środkowe jądro uzdeczki (ang. *Medial Habenular Nucleus*, MHb) i LHb. Bazując na morfologicznych i genetycznych wzorcach ekspresji zarówno MHb, jak i LHb można podzielić na kilka podjąder, natomiast funkcjonalne implikacje poszczególnych podjąder nie są jeszcze wyjaśnione (Aizawa i wsp., 2012).

Pomimo tworzenia jednej struktury w mózgu, jądra Hb są anatomicznie i funkcjonalnie oddzielne, każde z unikalnymi wzorcami połączeń. LHb jest jednym z niewielu obszarów w mózgu wysyłających bezpośrednie i pośrednie projekcje zarówno do centrum dopaminergicznego, jak i serotonergicznego. Natomiast MHb wysyła projekcje głównie do jądra międzikonarowego (ang. *Interpeduncular Nucleus*, IPN) i odbiera sygnały z przegrody (ang. *Septum*) (Sylwestrak i wsp., 2022). Mniej wiadomo o funkcji obwodów MHb w kontrolowaniu zachowań, natomiast neurony MHb odgrywają kluczową rolę w regulacji wzmocnienia nikotynowego, preferencji nowości i zachowań związanych z lękiem/strachem.

Łącznie MHb i LHb stanowią dwa w dużej mierze niezależne podsystemy, z których oba w istotny sposób przyczyniają się do regulacji różnych stanów behawioralnych (Hashikawa i wsp., 2020).

LHb silnie unerwia DR i jądro środkowe szwu (ang. *Median Raphe Nucleus*, MnR), regulując układ serotoninergiczny i fenotypy behawioralne związane z depresją, a także VTA wpływając na aktywność neuronów dopaminergicznych i regulując zachowania apetytywne i awersyjne (Groos i Helmchen, 2024). Ponadto pośrednia kontrola ośrodków serotoninergicznego i dopaminergicznego w mózgu jest wywierana za pomocą projekcji do neuronów GABAergicznym w grzbietowo-przyśrodkowym jądrze nakrywki (ang. *Rostromedial Tegmental Nucleus*, RMTg), nazywanym również jako ogon-VTA. Neurony RMTg zwiększają swoją aktywność w odpowiedzi na różne bodźce awersyjne, a zmniejszają aktywność w odpowiedzi na nagrody i sygnały wskazujące na nagrody. W związku z tym biorą udział zarówno w pasywnych reakcjach na nieprzyjemne sytuacje, jak i w unikaniu miejsc, które kojarzą się z czymś nieprzyjemnym (Stamatakis i Stuber, 2012). LHb wywiera silną kontrolę hamującą nad VTA i SN nie tylko poprzez pośrednie projekcje RMTg, ale bezpośrednio celuje w neurony GABAergiczne w VTA. Projekcje bezpośrednie i pośrednie pochodzą z dwóch różnych subpopulacji LHb: bezpośrednie wejścia do VTA pojawiają się z przyśrodkowej części LHb, podczas gdy neurony projektujące do RMTg znajdują się głównie w bocznej części LHb. Neurony dopaminergiczne odbierające bezpośrednie projekcje znajdują się głównie w przyśrodkowej części VTA i projektują do środkowej kory przedczołowej (ang. *medial Prefrontal Cortex*, mPFC) (Omelchenko i wsp., 2009). Nie tylko VTA, ale także DR otrzymuje bezpośrednie i pośrednie sygnały z odrębnych części przyśrodkowych i bocznych LHb. Podczas gdy neurony LHb z części przyśrodkowej wysyłają projekcje bezpośrednio do DR, neurony z części bocznej unerwiają RMTg i pośrednio hamują aktywność DR i MnR, obniżając poziom serotoniny (Weissbourd i wsp., 2014).

Aktywność LHb jest regulowana przez synaptyczne sygnały wejściowe. LHb otrzymuje hamujące, pobudzające i mieszane projekcje z przodomózgowia z jąder zlokalizowanych w podwzgórzu oraz z jąder podstawnych. Głównym źródłem sygnałów do LHb jest podwzgórze, głównie podwzgórze boczne (ang. *Lateral Hypothalamus*, LH), podwzgórze przyśrodkowe (ang. *Medial Hypothalamus*, MH) i boczna część przedwzrokowa (ang. *Lateral Preoptic Area*, LPO). Oddzielne projekcje pobudzające i hamujące pochodzą z LH i LPO, podczas gdy projekcje zdolne do współwzmacniania glutaminianu/GABA pochodzą z MH (Lazardis i wsp., 2019). W przypadku projekcji z jąder podstawy, oddzielne sygnały glutaminianergiczne i

GABAergiczne wychodzą z brzusznej gałki bladej (ang. *Ventral Pallidum*, VP), a projekcje współuwalniające glutaminian/GABA pochodzą z jądra wewnątrzkonarowego (ang. *Entopeduncular Nucleus*, EP) (Groos i Helmchen, 2024). Silne projekcje do LHb pochodzą z mPFC, w szczególności z przedniej części zakrętu obręczy (ang. *Anterior Cingulate Cortex*, ACC), a także dodatkowe rozproszone projekcje z kory wyspowej (ang. *Insular Cortex*) (Kim i Lee, 2012). Mniej zbadane sygnały wejściowe do LHb pochodzą z jąder pasma diagonalnego (ang. *Diagonal Band Nuclei*, DBN) oraz przegrody bocznej i przyśrodkowej (ang. *Lateral/Medial Septum* LS/MS), a także ze wzgórza wzrokowego (ang. *Visual Thalamus*) (Huang i wsp., 2019).

LHb stanowi wysoce plastyczny ośrodek anatomiczny i funkcjonalny, przetwarzający informacje z różnych sygnałów wejściowych z przodomózgowia i wysyłający przetworzone informacje dalej do różnych typów komórek w ośrodkach neuromodulacyjnych śródmózgowia i tyłomózgowia (Groos i Helmchen, 2024). Jedną z najlepiej zbadanych funkcji LHb jest rola w kodowaniu bodźców awersyjnych, które mogą być potencjalnie szkodliwe. Neurony LHb wykazują silną aktywację w odpowiedzi na różne bodźce awersyjne, takie jak wstrząsy elektryczne stóp, podmuch powietrza skierowany w oko, promieniowanie cieplne skierowane na tylną łapę, dźwięk białego szumu, unieruchomienie fizyczne, atak agresora czy porażka społeczna. Badania pokazują, że LHb reaguje na szeroki zakres negatywnych bodźców, co sugeruje kluczową rolę w przetwarzaniu informacji o potencjalnym zagrożeniu i wpływie na zachowania obronne (Sylwestrak i wsp., 2022).

Znaczenie jąder Hb w depresji postuluje się na podstawie ich nadmiernej aktywacji zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych. Aktywacja tej struktury jest związana z negatywnymi emocjami i zachowaniami, które są charakterystyczne dla depresji, takimi jak anhedonia czy bezradność. W depresji neurony pobudzające LHb wykazują nadaktywność, co prowadzi do zwiększonego pobudzenia głównie neuronów hamujących w RMTg. Skutkuje to zahamowaniem neuronów dopaminergicznych w VTA oraz serotoninergetycznych w DR, co w efekcie prowadzi do ogólnego zmniejszenia sygnalizacji w obwodzie nagrody oraz zachwiania równowagi emocjonalnej i psychicznej (Webster i wsp., 2021). Zmniejszenie pobudliwości neuronów LHb stanowi cel terapeutyczny w leczeniu depresji. DBS ukierunkowany na LHb powoduje zmniejszenie pobudliwości neuronów, co prowadzi do poprawy równowagi neurochemicznej i zmniejszenia objawów depresyjnych. Badania wskazują, że DBS w regionie LHb prowadzi do zwiększenia wydzielania dopaminy, noradrenaliny i serotoniny w hipokampie – obszarze odpowiedzialnym za przetwarzanie emocji i pamięci. Co ciekawe,

zmiany te obserwuje się nie tylko w mózgu, ale także w krwi, co sugeruje systemowy wpływ tej interwencji (Dandekar i wsp., 2018). Zarówno uszkodzenie LHb, jak i zastosowanie DBS wykazały skuteczność w łagodzeniu objawów przypominających depresję w modelach zwierzęcych (Meng i wsp., 2011). Dodatkowo, wyniki badań klinicznych na pacjentach opornych na tradycyjne leczenie przeciwdepresyjne pokazują, że DBS ukierunkowany na LHb może stanowić skuteczną opcję terapeutyczną. Pacjenci, którzy nie reagowali na inne formy leczenia, wykazali poprawę w zakresie nastroju, funkcjonowania społecznego i jakości życia po zastosowaniu tej interwencji (Wang i wsp., 2024; Yang i wsp., 2018; Sartorius i wsp., 2010). Modulacja aktywności synaptycznej neuronów LHb za pomocą interwencji farmakologicznych również wykazuje działanie przeciwdepresyjne. W szczególności blokada receptorów glutaminianergicznych typu NMDA, które odgrywają kluczową rolę w synaptycznej plastyczności i pobudliwości neuronów, prowadzi do zmniejszenia pobudliwości neuronów LHb. To zjawisko jest odpowiedzialne za przeciwdepresyjne działanie ketaminy, leku, który szybko łagodzi objawy depresji, zwłaszcza u pacjentów z TRD (Chen i wsp., 2024; Yang i wsp., 2018). Lokalna blokada receptora NMDA w LHb odwraca objawy anhedonii i bezradności w modelach depresji u szczurów (Nuno-Perez i wsp., 2021; Yang i wsp., 2018). Dodatkowo wykazano, że blokada receptora AMPA również wykazuje skuteczność przeciwdepresyjną (Li i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2019). Gdy mechanizmy przetwarzania sygnałów hamujących w LHb stają się coraz bardziej zrozumiałe, pojawiają się również możliwości ich wykorzystania jako potencjalnych strategii terapeutycznych w leczeniu depresji (Webster i wsp., 2021).

Jądra Hb stanowią ważny punkt przekaźnikowy łączący przodomózgowie z tyłomózgiem. Przeprowadzone *post-mortem* badania ludzkiego mózgu wykazały znacznie zmniejszone objętości jąder Hb, zarówno MHb, jak i LHb u pacjentów z depresją w porównaniu do zdrowych grup kontrolnych i pacjentów ze schizofrenią. Stwierdzono również zmniejszenie liczby komórek neuronalnych i powierzchni komórek u pacjentów z depresją w porównaniu do grup kontrolnych i pacjentów ze schizofrenią (Ranft i wsp., 2010). Powyższe wyniki badań wskazują, że jądra Hb, szczególnie LHb, są kluczowym węzłem sieci neuronalnej zaangażowanej w rozwój depresji i jednocześnie stanowią perspektywny punkt uchwytu dla interwencji farmakologicznych i neuromodulacyjnych.

4.10. Psylocybina

Psychodeliki to grupa substancji psychoaktywnych wywołujących zmiany percepcji, świadomości, sposobu myślenia oraz sposobu odczuwania emocji. Powszechny podział klasyfikuje substancje psychodeliczne na dwie grupy: „klasyczne” i „atypowe” (Wang i wsp., 2024). Klasyczne psychodeliki obejmują substancje będące agonistą lub częściowym agonistą receptora serotoninowego 5-HT_{2a} i są dzielone strukturalnie na dwie główne grupy: fenyloalkiloaminy i tryptaminy. Do fenyloalkiloamin zaliczamy związki takie jak meskalina (3,4,5-trimetoksyfenetyloamina) oraz jej syntetyczny analog DOI (2,5-dimetoksy-4-jodoamfetamina). Natomiast tryptaminy można podzielić na dwie podgrupy: proste tryptaminy, takie jak psylocybina i jej aktywny metabolit psylocyna, oraz DMT (N,N-dimetylotryptamina), które zawierają pierścień indolowy, a także pochodne ergoliny, takie jak LSD (dietyloamid kwasu D-lizergowego) (Jaster i wsp., 2021). Atypowe substancje psychodeliczne mają różne mechanizmy działania, które nie są związane z receptorem 5-HT_{2a} i należą do nich ketamina, ibogaina, muscimol oraz salwinoryna A (Wang i wsp., 2024).

Grzyby zawierające psylocybinę należą do zróżnicowanej grupy grzybów *Basidiomycota*, obejmującej ponad 200 gatunków z rodzajów, takich jak *Psilocybe*, *Gymnopilus* i *Panaeolus*, przy czym najbardziej rozpowszechnionym rodzajem jest *Psilocybe*, obejmujący około 144 gatunków. Grzyby halucynogenne były spożywane i czczone jako obiekty religijne od czasów prehistorycznych przez wiele kultur, a dowody takich praktyk znaleziono w Europie, Afryce i przede wszystkim w Mezoameryce (Wojtas i Gołębiowska, 2023).

Po spożyciu psylocybina jest szybko metabolizowana, a dokładniej defosforylowana przez fosfatazy alkaliczne do swojej farmakologicznie aktywnej formy, psylocyny (Dinis-Oliveira, 2017). Psylocyna przechodzi przez barierę krew-mózg i wchodzi w interakcję z receptorami, co prowadzi do szeregu efektów neurologicznych, w tym zmiany percepcji, myślenia i świadomości, co jest charakterystyczne dla doświadczeń psychodelicznych (Madsen i wsp., 2019). Podobnie jak wszystkie substancje psychodeliczne, psylocyna ma silne powinowactwo do receptorów serotoninowych w mózgu, działając głównie jako agonista receptorów 5-HT_{2a}, 5-HT_{2c} i 5-HT_{1a}. Psychodeliczne działanie psylocyny jest w dużym stopniu osłabiane przez ketanserynę – substancję blokującą receptor 5-HT_{2a} – co sugeruje, że receptor ten odgrywa kluczową rolę w wywoływanych przez nią efektach. Rola receptorów 5-HT_{1a} w psychoaktywnych efektach psylocyny nie została jeszcze zbadana. Ponadto psylocyna

oddziałuje z innymi receptorami serotoninowymi, w tym 5-HT1b, 5-HT1d, 5-HT2b, 5-HT5a, 5-HT6 i 5-HT7 (Ray, 2010; Wojtas i Gołębiowska, 2023).

Receptory serotoninowe są kluczowe w wielu procesach fizjologicznych związanych z regulacją nastroju, lęku, agresji, snu, apetytu i innych stanów emocjonalnych. Działanie SSRI polega na blokowaniu wychwytu zwrotnego serotoniny w neuronach presynaptycznych, co prowadzi do zwiększenia stężenia serotoniny w przestrzeni synaptycznej i wydłużenia czasu jej działania na receptory postsynaptyczne. Jednak mimo popularności i szerokiego zastosowania SSRI, ich skuteczność jest ograniczona, co stwarza potrzebę opracowania nowych metod terapeutycznych (Ślifirski i wsp., 2021). Dalsze badania nad mechanizmami działania psylocybiny mogą dostarczyć cennych informacji na temat alternatywnych ścieżek terapeutycznych. Jest to szczególnie istotne, biorąc pod uwagę znaczną liczbę pacjentów, którzy nie reagują na konwencjonalne leczenie.

Badania przedkliniczne pokazują, że psylocybina szybko indukuje ekspresję genów związaną z neuroplastycznością, głównie w PFC szczurów, a ekspresja genów takich jak: *Cebpb*, *c-Fos*, *Dups1*, *Fosb*, *Junb*, *Ikβ-α*, *Nr4a1*, *P11*, *Psd95*, czy *Sgk1* jest modulowana w zależności od podanej dawki psylocybiny (Jefsen i wsp., 2021). Zastosowanie mikroskopii dwufotonowej do obrazowania wierzchołkowych kolców dendrytycznych neuronów piramidowych warstwy piątej w mPFC myszy wykazało, że pojedyncza dawka psylocybiny doprowadziła do ~10% wzrostu rozmiaru i gęstości kolców. Przebudowa strukturalna nastąpiła szybko, w ciągu 24 godzin i utrzymywała się miesiąc później (Shao i wsp., 2021). Ponadto nowsze badanie wykorzystujące dwufotonową mikroskopię całego mózgu do mapowania bezpośredniej wczesnej ekspresji genów, wykazało, że zarówno po podaniu ketaminy jak i psylocybiny, ekspresja genu *c-Fos* jest obecna m. in. w ACC, LC, pierwotnej korze wzrokowej, środkowym i boczno-podstawnym jądrze migdałowatym oraz LHb i MHb u samców i samic myszy (Davoudian i wsp., 2023). Wyniki ostatnich badań przeprowadzonych przez Moliner i współautorów (2023) sugerują, że psylocyna wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do kinazy receptora tropomiozyny B (ang. *Tropomyosin receptor kinase B*, TrkB) w porównaniu z innymi lekami przeciwdepresyjnymi. Chociaż psylocyna nie działa jako bezpośredni agonista TrkB, wspomaga działanie endogennego BDNF uwalnianego w synapsach poprzez działanie allosteryczne, co zwiększa dimeryzację i plastyczność receptora TrkB. Aktywacja receptora TrkB uruchamia sygnalizację kinazy ssaczego celu rapamycyny (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*, mTOR) niezbędną do tworzenia nowych połączeń synaptycznych (Moliner i wsp., 2023).

Hibicke i współautorzy (2020) wykazali, że pojedyncza dawka psylocybiny (1 mg/kg) ma działanie przeciwdepresyjne u zwierząt o fenotypie TRD – szczurach WKY, a zaobserwowany efekt terapeutyczny utrzymywał się dłużej niż po podaniu ketaminy (Hibicke i wsp., 2020). Autorzy wykazali również, że w modelu chronicznego stresu unieruchomienia u dojrzewających szczurów (ang. *adolescent Chronic Restraint Stress*, aCRS), pojedyncze podanie psylocybiny wystarczyło do normalizacji zachowań poznawczych u stresowanych szczurów (Hibicke i wsp., 2023). Badania przeprowadzone w naszym zespole (Kolasa i wsp., 2024) wykazały, że jednokrotne podanie psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg szczurom WKY również wykazuje działanie przeciwdepresyjne w teście FST. Analiza molekularna wykazała, że w obrębie PFC dochodzi do wzrostu poziomu białka związanego z cytoszkieletem regulowanego aktywnością (ang. *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein*, Arc) zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. Wzrost ten sugeruje, że jednokrotne podanie psylocybiny indukuje zmiany w plastyczności synaptycznej mózgu i wykazuje działanie przeciwdepresyjne (Kolasa i wsp., 2024).

Pilotażowe badania kliniczne dostarczyły obiecujących dowodów na to, że psylocybina może być skuteczna w leczeniu różnych zaburzeń neuropsychiatrycznych. W szczególności wykazano jej potencjał w leczeniu TRD (Carhart-Harris i wsp., 2016, 2018), lęku i depresji związanych z chorobą nowotworową (Grob i wsp., 2011; Ross i wsp., 2016; Griffiths i wsp., 2016), a także uzależnieniu od nikotyny (Johnson i wsp., 2014) i alkoholu (Bogenschutz i wsp., 2015). Badania te dostarczyły zachęcających wyników, wskazując na terapeutyczny potencjał psylocybiny w leczeniu zaburzeń zdrowia psychicznego. W związku z tym psylocybina stanowi nową i obiecującą opcję terapeutyczną dla pacjentów cierpiących na różne zaburzenia psychiczne, szczególnie w przypadkach, gdy tradycyjne leki okazały się mało skuteczne lub miały ograniczoną efektywność (Pouyan et al., 2022).

W badaniu otwartym przeprowadzonym przez Carhart-Harris i współautorów (2016) na grupie 12 pacjentów z TRD, oceniono efekty dwóch dawek psylocybiny: 10 i 25 mg. Zastosowano początkową niską dawkę (10 mg) w celu oceny bezpieczeństwa oraz wysoką dawkę (25 mg) tydzień później, przy której zaobserwowano efekty psychodeliczne utrzymujące się przez około 6 godzin. Podana substancja była stosunkowo dobrze tolerowana, choć u niektórych uczestników występował przejściowy niepokój oraz łagodna tachykardia. Badanie wykazało znaczną poprawę w różnych skalach oceny depresji i lęku, takich jak Inwentarz Depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*, BDI), Inwentarz Stanu i Cechy Lęku (ang. *State-Trait Anxiety Inventory*, STAI), Skala Oceny Depresji Hamiltona (ang. *Hamilton*

Depression Rating Scale, HDRS) i Skala Oceny Depresji Montgomery-Åsberg (ang. *Montgomery-Åsberg Depression Rating Scale*, MADRS) 3 miesiące po podaniu dwóch dawek psylocybiny. Wyniki te sugerują pozytywne efekty terapeutyczne psylocybiny w leczeniu objawów depresji i lęku u pacjentów z TRD (Carhart-Harris i wsp., 2016).

Podobnie, w niedawno przeprowadzonym dużym, randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu klinicznym, Godwin i współautorzy (2022) zbadali zastosowanie psylocybiny w leczeniu TRD. Badanie wykazało, że psylocybina w dawce 25 mg, a nie w dawce 10 mg, charakteryzowała się znaczną poprawą skuteczności w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała 1 mg substancji. Skuteczność oceniano na podstawie wyniku w skali MADRS po 3 tygodniach. Kluczowym odkryciem badania był szybki początek działania przeciwdepresyjnego, zaobserwowany już drugiego dnia po podaniu psylocybiny. Dodatkowo, znacząca część uczestników (około jednej piątej), którzy otrzymali 25 mg psylocybiny, wykazała utrzymującą się odpowiedź terapeutyczną od 3. do 12. tygodni, co sugeruje długotrwałość efektów leczenia (Goodwin i wsp., 2022).

Przeprowadzone przez Daws i współpracowników funkcjonalne obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *functional Magnetic Resonance Imaging*, fMRI) wykazało, że szybka i trwała odpowiedź przeciwdepresyjna psylocybiny była skorelowana ze spadkiem modułowości sieci mózgowej, co oznacza, że działanie przeciwdepresyjne psylocybiny może zależeć od globalnego wzrostu integracji sieci mózgowej. Analizy kartografii sieciowej wskazały, że bogate w receptory 5-HT_{2a} wyższego rzędu funkcjonalne sieci stały się bardziej funkcjonalnie połączone i elastyczne po leczeniu psylocybiną. Natomiast odpowiedź przeciwdepresyjna na escitalopram była słabsza i nie zaobserwowano żadnych zmian w organizacji sieci mózgowej (Daws i wsp., 2022).

Uznając ograniczenia konwencjonalnych leków przeciwdepresyjnych pierwszego rzutu oraz brak skutecznych opcji terapeutycznych dla pacjentów cierpiących na TRD, niedawna aprobata esketaminy przez amerykańską Agencję Żywności i Leków oraz Europejską Agencję Leków (McIntyre i wsp., 2021) przyczyniła się do wzrostu zainteresowania grupą szybko działających leków przeciwdepresyjnych (ang. *Rapid Acting Antidepressants*, RAADs). Leki te charakteryzują się zdolnością do wywołania efektu terapeutycznego już po jednej lub kilku dawkach w stosunkowo krótkim czasie, zwykle od kilku dni do tygodnia (Witkin i wsp., 2019). Przykładem RAADs jest ketamina, która wykazuje poprawę objawów depresyjnych już w ciągu kilku godzin po podaniu, w przeciwieństwie do leków przeciwdepresyjnych opartych na mechanizmach monoaminergicznych, wymagających zazwyczaj co najmniej czterech tygodni,

aby uzyskać efekt kliniczny (Ramaker i Dulawa, 2017). Pomimo obiecującej skuteczności ketaminy u części pacjentów, jej działanie często nie jest trwałe, a wielu chorych nie osiąga pełnej remisji objawów. Fakt ten podkreśla konieczność dalszych poszukiwań oraz rozwoju alternatywnych RAADs (Witkin i wsp., 2019). Australia jest pierwszym krajem, który formalnie uznał substancje psychodeliczne jako leki terapeutyczne. Australijska Agencja ds. Produktów Terapeutycznych (ang. *Therapeutic Goods Administration*, TGA) poinformowała, że od 1 lipca 2023 r. lekarze mogą przepisywać substancje psychodeliczne do leczenia niektórych schorzeń psychicznych. Specjalnie upoważnieni psychiatrzy mogą przepisywać leki psychodeliczne zawierające psylocybinę do leczenia TRD oraz MDMA (3,4-metylenodioksymetamfetaminę) w leczeniu zespołu stresu pourazowego (ang. *Post-Traumatic Stress Disorder*, PTSD). Decyzja TGA opiera się na rosnącej ilości badań naukowych wskazujących na potencjalne korzyści terapeutyczne substancji psychodelicznych. Badania te pokazują, że psylocybina i MDMA mogą prowadzić do trwałych pozytywnych zmian w zdrowiu psychicznym pacjentów, które są trudne do osiągnięcia za pomocą tradycyjnych metod leczenia (Haridy, 2023).

5. Hipoteza i cel pracy

Celem niniejszej pracy jest molekularna charakterystyka jąder Hb szczurów szczepu WKY – uznanego zwierzęcego modelu oporności na działanie standardowych leków przeciwdepresyjnych – oraz ocena wpływu psylocybiny na funkcjonowanie tej struktury. Badania obejmują analizę ekspresji genów i białek w jądrach Hb, co pozwala na identyfikację mechanizmów molekularnych modulowanych przez psylocybinę. Dodatkowym, istotnym celem pracy jest poszukiwanie potencjalnych molekularnych i neuronalnych markerów lekooporności, które odpowiadają za brak skuteczności standardowych terapii przeciwdepresyjnych u szczurów WKY.

Przeprowadzone badania mają na celu pogłębienie wiedzy o neurobiologicznych podstawach depresji, w szczególności TRD, oraz ocenę potencjalnej roli psylocybiny jako nowoczesnej strategii terapeutycznej. Wyniki tej pracy mogą przyczynić się do rozwoju bardziej efektywnych metod leczenia oraz lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za lekooporność w depresji.

6. Materiały i metody

6.1. Odczynniki chemiczne

Odczynniki chemiczne użyte w doświadczeniach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono w tabeli 6.1.

Tabela 6.1. Podstawowe odczynniki chemiczne

Odczynnik	Producent, numer katalogowy
Heptan	POCH, 470470117
Alkohol etylowy 96.6%	POCH, 396480111
Alkohol metylowy	POCH, 621990110
Sól fizjologiczna zbuforowana fosforanami, pH 7.4 (PBS)	Sigma Aldrich, P5493
Nadtlenek wodoru, H ₂ O ₂	POCH, 885193111
Triton X-100	Sigma Aldrich, X100

6.2. Zwierzęta

Samce szczurów Wistar Han (WIS) (w wieku 7 tygodni i wadze około 210 g) i samce szczurów WKY (w wieku około 7 tygodni i wadze około 200 g) zakupiono w Charles River (Sulzfeld, Niemcy). Zwierzęta przebywały w standardowej klatce laboratoryjnej, po 5 szczurów w klatce, ze swobodnym dostępem do pożywienia i wody w 12-godzinny cykl światło/ciemność (światło włączane o 8 rano) w warunkach stałej temperatury (22 ± 2 °C) i wilgotności ($45 \pm 5\%$). Wszystkie badania opisane w niniejszej rozprawie zostały zatwierdzone przez II Komisję Etyczną przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (uchwała nr 256/2022 i 126/2024).

6.3. Podanie psylocybiny

Psylocybina została zsyntetyzowana w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, metodą opisaną przez Shirota i współautorów (2003). Użyty pirofosforan tetrabenzyliu został przygotowany zgodnie z procedurą opisaną przez Nelsona i współautorów (2003). Psylocybinę rozpuszczono w roztworze soli fizjologicznej (Polpharma, Polska) i za pomocą iniekcji dootrzewnowej podano szczurom jednokrotną dawkę 0.3 mg/kg masy ciała. Zwierzęta kontrolne otrzymały jednokrotną dootrzewnową iniekcję roztworu soli fizjologicznej. W celu przeprowadzenia badań molekularnych, szczury poddano dekapitacji 4

oraz 24 godziny po podaniu psylocybiny. W przypadku badań elektrofizjologicznych, zwierzęta zdekapitowano po 24 godzinach od podania psylocybiny.

6.4. Przygotowanie tkanki

W celu przygotowania materiału do analiz molekularnych pobrano mózgi od szczurów. Do analiz ekspresji miRNA i mRNA mózgi natychmiast zamrożono w heptanie chłodzonym suchym lodem. Zamrożone mózgi pocięto na skrawki o grubości 20 μm za pomocą kriostatu Jung CM 3000 (Leica, Niemcy). Skrawki zawierające jądra Hb zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych z membraną PEN 2.0 μm (ThermoFisher Scientific, USA) i wybarwione fioletem krezyłu z zestawu LCM Staining Kit (Life Technologies, USA) zgodnie z instrukcją producenta. MHb i LHb zostały oddzielnie wycięte za pomocą mikrodysektora laserowego LMD (Leica, Niemcy). Do analiz ekspresji mRNA 4 godziny po podaniu psylocybiny z mózgów odseparowano mPFC, a za pomocą sztancy pozyskano DR i VTA. Pozostałą część mózgu zamrożono w celu pozyskania skrawków do wycięcia MHb i LHb za pomocą mikrodysektora laserowego LMD. Do analiz ekspresji mRNA 24 godziny po podaniu psylocybiny z mózgów odseparowano Hb, DR i VTA za pomocą sztancy. Wszystkie struktury zostały zebrane zgodnie ze stereotaktycznym atlasem mózgu szczura (Paxinos i Watson, 1998). Pozyskane tkanki przechowywano w temperaturze -80°C do momentu przeprowadzenia dalszych etapów.

6.5. Izolacja miRNA z MHb i LHb

Izolację miRNA przeprowadzono przy użyciu zestawu miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Całkowite stężenie miRNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA), a jakość miRNA oceniano metodą elektroforezy mikrokapilarnej przy użyciu zestawu Experion RNA HighSens Analysis Kit (Bio-Rad, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Do dalszych eksperymentów wykorzystano próbki, które przekroczyły próg jakości ($\text{RIN} > 8.0$).

6.6. Macierze TaqMan miRNA z MHb i LHb

Według wstępnych badań zaprojektowano macierze TaqMan Array MicroRNA (ThermoFisher Scientific, USA) zawierające 32 wybrane miRNA (tabela 6.2) w trzech technicznych powtórzeniach. Próbkę zduplikowano i jedną macierz TaqMan Array MicroRNA wykorzystano na 4 próbki. Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Otrzymany cDNA poddano wstępnej amplifikacji w celu zwiększenia ilości cDNA przy użyciu TaqMan PreAmp Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Namnożony produkt rozcieńczono i przeprowadzono reakcję ilościową PCR przy użyciu TaqMan Universal PCR Master Mix II (no UNG) (ThermoFisher Scientific, USA) w systemie QuantStudio 12 K Flex (Applied Biosystems, USA).

Dane analizowano za pomocą oprogramowania QuantStudio 12 K Flex (Applied Biosystems, USA). Dla wszystkich próbek ustalono ten sam próg równy 0.2. Wartości cyklu detekcji CT powyżej 31 uznano za niewykrywalne miRNA ze względu na przeprowadzenie reakcji preamplifikacji. Następnie zastosowano oprogramowanie qbase+ Biogazelle (Biogazelle, Belgia) i za pomocą algorytmu geNorm wybrano miR-7a-1-3p i miR-328a-3p jako miRNA referencyjne (Marabita i wsp., 2016). Następnie obliczono względny poziom ekspresji metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$ według Pfaffla (2001) ze zmodyfikowanym równaniem dla wielu referencji. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t Studenta dla prób niezależnych. Ze względu na jednoczesny pomiar ekspresji miRNA na jednej płytce zastosowano miarę False Discovery Rate (FDR), korzystając z dwuetapowej metody Benjamini, Kriegera i Yekutieli ($FDR < 0.05$) w celu oceny wyników testów wielokrotnych. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software).

Tabela 6.2. Wybrane miRNA wraz z numerem akcesyjnym w bazie miRBase i identyfikatorem

miRNA	Numer akcesyjny w bazie miRBase	Identyfikator miRNA	miRNA	Numer akcesyjny w bazie miRBase	Identyfikator miRNA
rno-miR-92a-3p	MIMAT0000816	000430	rno-miR-29a-5p	MIMAT0004718	002447
rno-miR-133a-3p	MIMAT0000839	002246	rno-miR-30a-3p	MIMAT0000809	000416
rno-miR-182	MIMAT0005300	002599	rno-miR-328a-3p	MIMAT0000564	000543
rno-miR-203a-3p	MIMAT0000876	000507	rno-miR-7	MI0029387	000582
rno-miR-449a-5p	MIMAT0001543	001030	rno-miR-7a-2-3p	MIMAT0017091	462860_mat
rno-miR-674-5p	MIMAT0005329	002021	rno-miR-7a-5p	MIMAT0000606	000268
rno-miR-708-5p	MIMAT0005331	002341	rno-miR-34b-3p	MIMAT0017105	002618
rno-miR-184	MIMAT0000861	000485	rno-miR-16-3p	MIMAT0017094	462804_mat
U6 snRNA	NR_004394	001973	rno-miR-362-3p	MIMAT0017357	002616
rno-miR-19a-3p	MIMAT0000789	000395	rno-miR-429	MIMAT0001538	001077
ath-miR159a	MIMAT0000177	000338	rno-miR-451-5p	MIMAT0001633	001141
rno-miR-29a-3p	MIMAT0000802	002112	rno-miR-674-3p	MIMAT0005330	001956
rno-miR-214-3p	MIMAT0000885	000517	rno-miR-16-5p	MIMAT0000785	000391
rno-miR-221-3p	MIMAT0000890	000524	rno-miR-1-3p	MIMAT0003125	002064
rno-miR-223-3p	MIMAT0000892	000526	rno-miR-7-1-3p	MI0000263	001338
rno-miR-23a-3p	MIMAT0000792	000399	rno-miR-7a-1-3p	MIMAT0000607	002062

6.7. Izolacja mRNA z mPFC, MHb, LHb, DR i VTA

Izolację mRNA z mPFC, DR i VTA przeprowadzono przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy), natomiast z MHb i LHb przy użyciu zestawu RNeasy Micro Kit (Qiagen, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. Całkowite stężenie RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA), a jakość RNA oceniano metodą elektroforezy mikrokapilarnej przy użyciu zestawu Experion RNA StdSens/HighSens Analysis Kit (Bio-Rad, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Do dalszych eksperymentów wykorzystano próbki, które przekroczyły próg jakości ($RIN > 8.0$).

6.8. Macierze TaqMan mRNA z MHb i LHb

Zgodnie z wynikami uzyskanymi z analizy miRNA oraz baz danych miRWalk i Target Scan, zaprojektowano macierze TaqMan Gene Expression Array Cards (ThermoFisher Scientific, USA) zawierające 32 wybrane geny (tabela 6.3) w trzech technicznych powtórzeniach. Zastosowano jedną macierz TaqMan Gene Expression Array Cards na 4 próbki. Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję ilościową PCR przeprowadzono przy użyciu TaqMan Universal PCR Master Mix II (no UNG) (ThermoFisher Scientific, USA) zgodnie z instrukcją producenta w systemie QuantStudio 12 K Flex (Applied Biosystems, USA).

Dane analizowano za pomocą oprogramowania QuantStudio 12 K Flex (Applied Biosystems, USA). Dla wszystkich próbek ustalono ten sam próg równy 0.2. Wartość cyklu detekcji CT powyżej 34 uznawano za niewykrywalne mRNA. Następnie obliczono poziom ekspresji genów metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$ według Pfaffla (2001) ze zmodyfikowanym równaniem dla wielu genów referencyjnych: białko rybosomalne L32 (Rpl32), izomeraza peptydyloprolilowa A (Ppia) i 18S rybosomalne RNA (18S). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t Studenta dla prób niezależnych lub dwuczynnikową ANOVA. Za istotną statystycznie uznano wartość $p < 0.05$. Ze względu na jednoczesny pomiar ekspresji mRNA na jednej płycie zastosowano miarę False Discovery Rate (FDR), korzystając z dwuetapowej metody Benjamini, Kriegera i Yekutieli ($FDR < 0.05$) w celu oceny wyników testów wielokrotnych. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software).

Tabela 6.3. Wybrane 32 geny wraz z pełną nazwą i identyfikatorem

Gen	Pełna nazwa genu	Identyfikator genu
<i>Cdkn1c</i>	ang. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C</i> Inhibitor kinazy zależnej od cyklin 1C	Rn01502044_g1
<i>Drd2</i>	ang. <i>Dopamine Receptor D2</i> Receptor dopaminowy D2	Rn00561126_m1
<i>Elk4</i>	ang. <i>ETS Transcription Factor ELK4</i> Czynnik transkrypcyjny ELK4	Rn01484014_m1
<i>Htr2a</i>	ang. <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A</i> Receptor 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) 2A	Rn01468302_m1
<i>Htr4</i>	ang. <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4</i> Receptor 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) 4	Rn00563402_m1
<i>Htr7</i>	ang. <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7</i> Receptor 5-hydroksytryptaminy (serotoniny) 7	Rn00576048_m1
<i>Kcnj5</i>	ang. <i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5</i> Prostowniczy kanał potasowy 5 podrodziny J	Rn01789221_mH
<i>Kcnj9</i>	ang. <i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 9</i> Prostowniczy kanał potasowy 9 podrodziny J	Rn00587665_m1
<i>Slc12a5</i>	ang. <i>Solute Carrier Family 12 Member 5</i> Transporter substancji rozpuszczonych 5 rodziny 12	Rn00592624_m1
<i>Sstr4</i>	ang. <i>Somatostatin Receptor 4</i> Receptor somatostatyny 4	Rn00564741_s1
<i>Slc6a6</i>	ang. <i>Solute Carrier Family 6 (taurine transporter) Member 6</i> Transporter substancji rozpuszczonych (transporter tauryny) 6 rodziny 6	Rn00567962_m1
<i>Slc6a4</i>	ang. <i>Solute Carrier Family 6 (serotonin transporter) Member 4</i> Transporter substancji rozpuszczonych (transporter serotoniny) 4 rodziny 6	Rn00564737_m1
<i>Slc6a2</i>	ang. <i>Solute Carrier Family 6 (norepinephrine transporter) Member 2</i> Transporter substancji rozpuszczonych (transporter noradrenaliny) 2 rodziny 6	Rn00580207_m1
<i>Slc17a6</i>	ang. <i>Solute Carrier Family 17 (vesicular glutamate transporter) Member 6</i> Transporter substancji rozpuszczonych (transporter glutaminianu) 6 rodziny 17	Rn00584780_m1
<i>Nrg1</i>	ang. <i>Neuregulin 1</i> Neuregulina 1	Rn01482165_m1
<i>Prl8a5</i>	ang. <i>Prolactin Family 8, Subfamily A, Member 5</i> Rodzina prolaktyny 8, podrodzina A, członek 5	Rn01789326_m1
<i>Prl3a1</i>	ang. <i>Prolactin Family 3, Subfamily A, Member 1</i> Rodzina prolaktyny 3, podrodzina A, członek 1	Rn01434782_m1
<i>Mapk14</i>	ang. <i>Mitogen Activated Protein Kinase 14</i> Kinaza białkowa 14 aktywowana mitogenem	Rn00578842_m1
<i>Mapk8</i>	ang. <i>Mitogen Activated Protein Kinase 8</i> Kinaza białkowa 8 aktywowana mitogenem	Rn01218952_m1
<i>Tph1</i>	ang. <i>Tryptophan Hydroxylase 1</i> Hydroksylaza tryptofanu 1	Rn01476867_m1
<i>Gpr55</i>	ang. <i>G Protein-coupled Receptor 55</i> Receptor 55 sprzężony z białkiem G	Rn03037213_s1
<i>Sstr3</i>	ang. <i>Somatostatin Receptor 3</i> Receptor somatostatyny 3	Rn02134439_s1
<i>Sstr2</i>	ang. <i>Somatostatin Receptor 2</i> Receptor somatostatyny 2	Rn01464950_g1
<i>Gabra1</i>	ang. <i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha1</i> Podjednostka alfa1 receptora kwasu gamma-aminomasłowego typu A	Rn00788315_m1
<i>Gabrb1</i>	ang. <i>Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta1</i> Podjednostka beta1 receptora kwasu gamma-aminomasłowego typu A	Rn00564146_m1

<i>Chrna1</i>	ang. <i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 1 Subunit</i> Podjednostka alfa 1 cholinergicznego receptora nikotynowego	Rn01278033_m1
<i>Ntrk3</i>	ang. <i>Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3</i> Neurotroficzna receptorowa kinaza tyrozynowa 3	Rn00570389_m1
<i>Ntrk2</i>	ang. <i>Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2</i> Neurotroficzna receptorowa kinaza tyrozynowa 2	Rn01441749_m1
<i>Cacna1b</i>	ang. <i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 B</i> Podjednostka Alpha1 B wapniowego kanału bramkowanego napięciem	Rn00595911_m1
<i>18S</i>	ang. <i>Eukaryotic 18S rRNA</i> Eukariotyczna podjednostka 18S rRNA	Hs99999901_s1
<i>Ppia</i>	ang. <i>Peptidylprolyl Isomerase A</i> Izomeraza peptydyloprolilowa A	Rn00690933_m1
<i>Rpl32</i>	ang. <i>Ribosomal Protein L32</i> Białko rybosomalne L32	Rn00820748_g1

6.9. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*) przeprowadzono w duplikacie przy użyciu qPCR-HS Mix SYBR (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z instrukcją producenta w systemie detekcji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) w następujących cyklach: aktywacja enzymu w temperaturze 95 °C przez 3 minuty, 40 cykli denaturacji w temperaturze 95 °C przez 20 sekund, przyłączania starterów w temperaturze 60 °C przez 30 sekund, wydłużenia produktu w temperaturze 72 °C przez 15 sekund. Zastosowano odpowiednie sekwencje par starterów zawarte w tabeli 6.4. Poziom ekspresji genów obliczono metodą $2^{-\Delta CT}$ według Pfaffla (2001), ze zmodyfikowanym równaniem dla wielu genów referencyjnych: białko rybosomalne L32 (Rpl32), izomeraza peptydyloprolilowa A (Ppia). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t Studenta dla prób niezależnych lub dwuczynnikową ANOVA z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software). Za istotną statystycznie uznano wartość $p < 0.05$.

Tabela 6.4. Sekwencje par starterów wykorzystanych w reakcji qPCR

Nazwa genu	Nazwa białka	Sekwencja Forward (5'→3')	Sekwencja Reverse (5'→3')
<i>Kcnj5</i>	GIRK4	TTCTTAGCAAGGCCCTTAA	GACGACATTGTGTGTGCTCC
<i>Gabbr2</i>	GABA _B R2	TGTGGAGGCCAATTCCTCAC	CGATGACCCAGATCCCATCG
<i>Ppp2ca</i>	PP2A	GACTATGTGGACAGAGGATATTAC	CAAGGCAGTGAGAGGAAGG
<i>Grin2a</i>	GluN2A	GATCAACAATTCAACCAACG	AGACCACTTCACCTATCATTC
<i>c-Fos</i>	c-Fos	CATCCTTACGGACTCCCCAC	TTCAAGTTGATCTGTCTCCGCT
<i>Arc</i>	Arc	GAGATGGCCGAAGGAACCTC	CTGGTATGAATCACTGCTGGGG
<i>Psd95</i>	Psd95	CAACATGGACTGTCTCTGTATAGT	TTCACCTGCAACTCATATCCTG
<i>Rpl32</i>	Rpl32	GTGAAGCCCCAAGATCGTC	GAACACAAAACAGGCACAC
<i>Ppia</i>	Ppia	TGACTTCACACGCCATAAT	AGATGCCAGGACCTGTATGC

Tabela 6.5. Pełna nazwa genów sprawdzanych za pomocą reakcji qPCR

Gen	Pełna nazwa genu
<i>Kcnj5</i>	ang. <i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5</i> , Prostowniczy kanał potasowy 5 podrodziny J, zwany również GIRK4 (ang. <i>G Protein-Activated Inward Rectifier Potassium Channel 4</i>)
<i>Gabbr2</i>	ang. <i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Receptor Type B 2</i> , Receptor kwasu gamma aminomasłowego (GABA) typu B 2
<i>Ppp2ca</i>	ang. <i>Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Alpha</i> , Podjednostka katalityczna fosfatazy białkowej 2 alfa
<i>Grin2a</i>	ang. <i>N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDA) 2A</i> , Podjednostka typu 2A receptora N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)
<i>c-Fos</i>	ang. <i>Fos Proto-Oncogene</i> Komórkowy Protoonkogen, należący do genów wczesnej odpowiedzi komórkowej
<i>Arc</i>	ang. <i>Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein</i> Białko związane z cytoszkieletem regulowane aktywnością
<i>Psd95</i>	ang. <i>Postsynaptic Density Protein 95</i> Białko Gęstości Postsynaptycznej 95
<i>Rpl32</i>	ang. <i>Ribosomal Protein L32</i> , Białko rybosomalne L32
<i>Ppia</i>	ang. <i>Peptidylprolyl Isomerase A</i> , Izomeraza peptydyloprolilowa A

6.10. Barwienie immunofluorescencyjne – KCC2 i 5-HT7

Zamrożone mózgi szczurze pocięto na skrawki o grubości 16 µm za pomocą kriostatu Jung CM 3000 (Leica, Niemcy) zgodnie ze stereotaktycznym atlasem mózgu szczura (Paxinos i Watson, 1998) i umieszczono na szkiełkach SuperFrost (ThermoFisher Scientific) pokrytych 0.2% żelatyną rozpuszczoną w 0.05 M Tris-HCl, pH=7.6. Skrawki obrysowano markerem tworzącym barierę hydrofobową (Vector Laboratories, USA) i utrwalono w zmrożonym metanolu przez 10 minut. Przeplukano w 0.1 M roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej

fosforanami, pH 7.4 (ang. *Phosphate Buffered Saline, PBS*), trzy razy po 10 minut. Blokowano w 0.1 M PBS z 10% normalną surowicą ośłą (ang. *Normal Donkey Serum, NDS*) (Jackson ImmunoResearch, USA) przez noc w temperaturze 4 °C. Inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi: królicze anty-5-HT₇ (1:100, #ABIN617922, Antibodies-online) lub królicze anty-KCC2 (1:200, #07-432, Sigma Aldrich) zawieszonymi w 0.1 M PBS z 5% NDS przez noc w temperaturze 4 °C. Przepłukano w 0.1 M PBS trzy razy po 10 minut. Inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi: anty-królicze Alexa488 (1:200, #A21206, Invitrogen) lub anty-królicze Alexa555 (1:200, #A31572, Invitrogen) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przepłukano w 0.1 M PBS trzy razy po 10 minut. Inkubowano z 0.1 M PBS z 4,6-diamidyno-2-fenylindolem – DAPI (1:1000, D1306, Invitrogen) w celu uwidocznienia jąder. Przepłukano w 0.1 M PBS dwa razy po 5 minut. Skrawki pokryto środkiem utrwalającym VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) i nałożono szkiełko nakrywkowe. Na każdym etapie barwienia immunofluorescencyjnego szkiełka przechowywano w czarnej komorze wilgotnościowej StainTray z czarną pokrywą (Sigma Aldrich, USA). Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Niemcy). Analiza sygnału została przeprowadzona za pomocą programu ImageJ.

6.11. Barwienie immunofluorescencyjne – GIRK4

Zamrożone mózgi szczurze pocięto na skrawki o grubości 16 µm za pomocą kriostatu Jung CM 3000 (Leica, Niemcy) zgodnie ze stereotaktycznym atlasem mózgu szczura (Paxinos i Watson, 1998) i umieszczono na szkiełkach SuperFrost (ThermoFisher Scientific) pokrytych 0.2% żelatyną rozpuszczoną w 0.05 M Tris-HCl, pH=7.6. Skrawki obrysowano markerem tworzącym barierę hydrofobową (Vector Laboratories, USA) i utrwalono w zmrożonym metanolu przez 10 minut. Przepłukano w 0.1 M PBS dwa razy po 5 minut. Inkubowano w buforze odsłaniającym antygen składającym się z: 0.1 M PBS, 0.2% nadtlenu wodoru, 0.2% Triton X-100, 20% metanol; przez 25 minut w temperaturze pokojowej. Przepłukano w 0.1 M PBS dwa razy po 5 minut. Inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym: królicze anty-KCNJ5 (1:100, #APC-027, Alomone Labs) zawieszone w roztworze składającym się z: 0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 2% NDS; przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie przez noc w temperaturze 4 °C. Przepłukano 0.1 M PBS z 2% NDS (Jackson ImmunoResearch, USA) dwa razy po 5 minut. Inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym: anty-królicze Alexa488 (1:600, #A21206, Invitrogen) zawieszone w roztworze składającym się z: 0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 2% NDS; przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie przez noc w temperaturze 4 °C. Przepłukano

0.1 M PBS z 2% NDS dwa razy po 5 minut. Inkubowano z 0.1 M PBS z DAPI (1:1000, D1306, Invitrogen) w celu uwidocznienia jąder. Przeplukano w 0.1 M PBS dwa razy po 5 minut. Skrawki pokryto środkiem utrwalającym VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, USA) i nałożono szkiełko nakrywkowe. Na każdym etapie barwienia immunofluorescencyjnego szkiełka przechowywano w czarnej komorze wilgotnościowej StainTray z czarną pokrywą (Sigma Aldrich, USA). Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica Thunder (Leica, Niemcy). Analiza sygnału została przeprowadzona za pomocą programu Fiji ImageJ z wykorzystaniem opcji tworzenia masek.

6.12. Elektrofizjologia *whole-cell patch clamp*

Samce szczurów WIS (około 7 tygodni, ważące około 210 g) i WKY (około 7 tygodni, ważące około 200 g) poddano dekapitacji 24 godziny po podaniu psylocybiny lub soli fizjologicznej. Wyizolowane mózgi pocięto na skrawki o grubości 250 μm przy użyciu wibrującego mikrotomu (Leica VT1000 S, Niemcy) w natlenowanym karbogenem, zmrożonym sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *Artificial Cerebrospinal Fluid*, ACSF) przeznaczonym do preparatyki, składającym się z następujących składników: 92 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 30 mM NaHCO_3 , 0.5 mM CaCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 nM HEPES, 5 mM askorbinian sodu, 3 mM pirogronian sodu, 2 mM tiomocznik i 25 mM glukoza (pH 7.4; osmolarność 290-300 mOsmol kg^{-1}). Skrawki zawierające boczne jądro uzdeczki przeniesiono do komory inkubacyjnej zawierającej natlenowany karbogenem, ogrzany (32°C) ACSF zawierający następujące składniki: 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 3 mM KCl, 1.2 mM NaH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1.3 mM MgSO_4 i 10 mM glukoza (pH 7.4; osmolarność 290-300 mOsmol kg^{-1}). Po co najmniej 90 minutach inkubacji, skrawki przeniesiono do zanurzonej komory rejestrującej, w której tkankę stale perfundowano (2 ml/min) natlenowanym karbogenem, ogrzanym (32°C) ACSF o tym samym składzie.

Mikropipety rejestrujące (opór 6–7 M Ω) wyciągano na wyciągarce horyzontalnej (P-1000, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) z kapilar ze szkła borokrzemowego (Sutter Instruments) i napełniono roztworem zawierającym: 145 mM glukonian potasu, 1.3 mM MgCl_2 , 4 mM Na_2ATP , 0.4 mM Na_3GTP , 5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7.3; osmolarność 290–300 mOsmol kg^{-1}) i biocytynę (0.05%) w celu immunofluorescencyjnej identyfikacji rejestrowanych neuronów. Obliczony potencjał prądu upływu dla ACSF i roztworu wewnątrz pipety wynosił +15 mV, a wartość ta została odjęta od danych.

Neurony LHb zlokalizowano za pomocą mikroskopu świetlnego wyposażonego w kontrast różnicowo-interferencyjny (Axio Examiner.D1, Zeiss, Getynga, Niemcy). Kontrola ciśnienia płynu w pipecie odbywała się za pomocą kontrolera mikrociśnień NeoBiosystems EZ-gSEAL100B (USA). Do rejestracji sygnału (filtrowanego dolnoprzepustowo przy 3 kHz i digitalizowanego przy 20 kHz) i akwizycji danych użyto wzmacniacza SEC 05 LX (NPI, Tamm, Niemcy), konwertera Micro 1401 mk II (Cambridge Electronic Design (CED), Cambridge, Wielka Brytania) oraz oprogramowania Signal i Spike2 (CED, RRID:SCR_017081, RRID:SCR_000903).

W celu identyfikacji prądów przepływających przez kanały GIRK wykonano test kroków napięciowych przy potencjale utrzymania -50 mV w zakresie napięć od -140 mV do +40 mV. Skok napięciowy następował co 10 mV, a długość pojedynczego pulsu trwała 1s. Po przeprowadzeniu testów elektrofizjologicznych wymieniono ACSF na ACSF o wysokiej zawartości potasu o składzie: 25 mM NaHCO₃, 25 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄ i 10 mM glukoza (pH 7.4; osmolarność 290-300 mOsmol kg⁻¹). Po całkowitej wymianie powtórzono test kroków napięciowych. Następnie skrawek był opłukiwany ACSF o wysokiej zawartości potasu z dodatkiem 100 nm Tertiapin-Q (#1316, Tocris) w celu blokady prądów przepływających przez kanały GIRK.

6.13. Barwienie immunofluorescencyjne po rejestracji *patch clamp*

Po rejestracji, skrawki mózgu utrwalone w 4% formaldehydzie przez noc w temp. 4°C i wykonano barwienie immunofluorescencyjne w celu uwidocznienia zarejestrowanych neuronów. Przepłukano w PBS dwukrotnie przez 10 min. Inkubowano w roztworze blokującym i permeabilizującym składającym się z: PBS, 10% NDS, 0.3% Triton X-100; przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie inkubowano z ekstrawidyną sprzężoną z Cy3 (1:200, #E4142, Sigma) zawieszoną w roztworze składającym się z: 0.1 M PBS, 2% NDS, 0.3% Triton X-100; przez 48 godzin w temp. 4 °C. Przepłukano w 0.1 M PBS 3 razy przez 15 min. Skrawki nałożono na szkiełka podstawowe, pokryto Fluoroshield™ zawierającym DAPI i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Axio Imager.M2, Zeiss, Niemcy).

6.14. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne i wizualizacje wyników przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism (GraphPad Software).

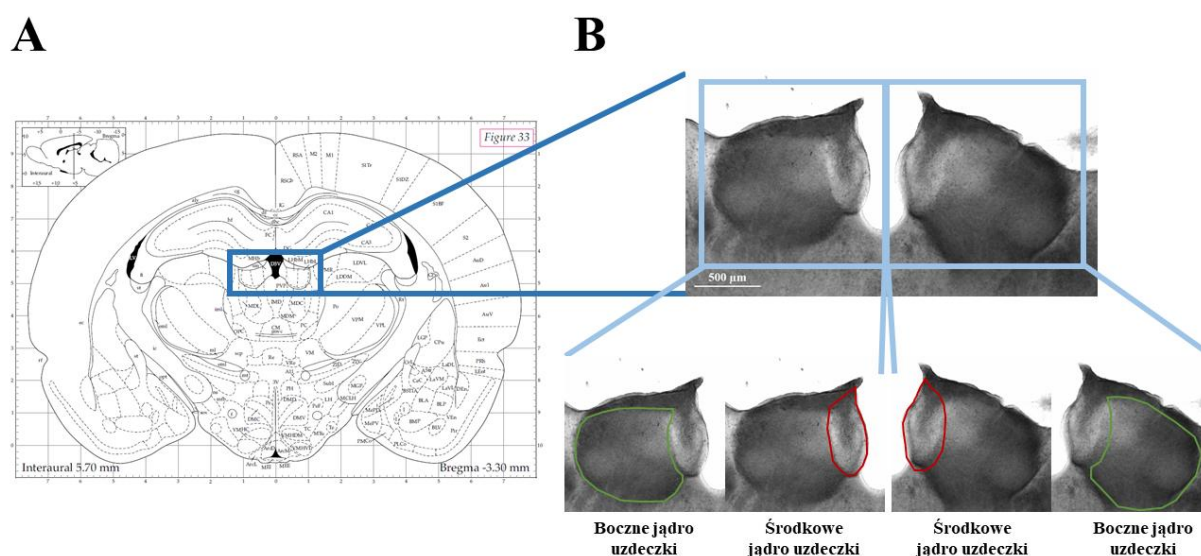
Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ze wszystkich zebranych pomiarów, z odchyleniami określonymi przez błąd standardowy średniej (ang. *Standard Srror of the Mean, SEM*).

Analiza danych obejmowała ocenę rozkładu normalnego za pomocą testu Shapiro–Wilka i testu Kołmogorowa–Smirnowa oraz identyfikację wartości odstających za pomocą metody ROUT. Zastosowano poziom istotności (poziom alfa) wynoszący 5%.

Do oceny różnic pomiędzy szczepem szczurów WIS i szczepem WKY, analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu Testu T Studenta dla prób niezależnych. Ze względu na jednoczesny pomiar ekspresji na jednej płytce zastosowano miarę False Discovery Rate (FDR), korzystając z dwuetapowej metody Benjamini, Kriegera i Yekutieli ($FDR < 0.05$) w celu oceny wyników testów wielokrotnych. Do oceny wpływu działania psylocybiny na szczepy WIS i WKY, analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA.

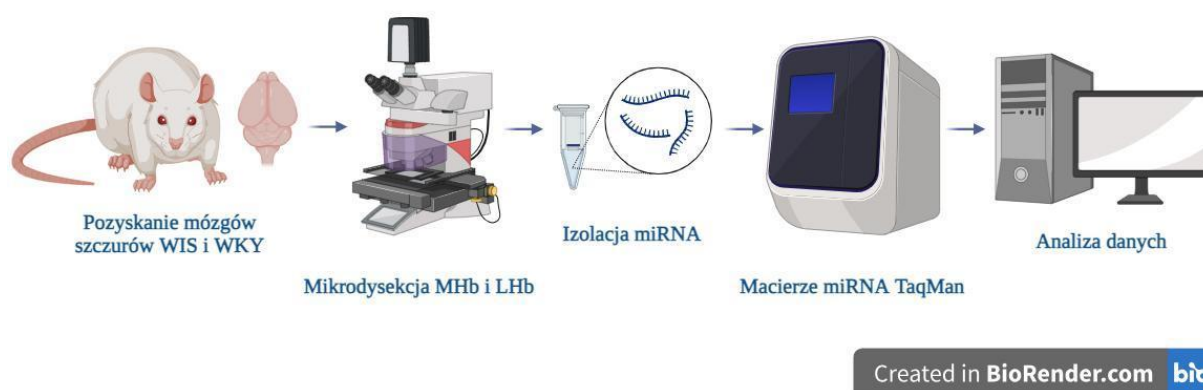
7. Wyniki

MHb i LHb to niewielkie, ale funkcjonalnie istotne struktury zlokalizowane w grzbietowej części międzymózgowia (Groos i Helmchen, 2024). Niewielki rozmiar oraz bliskie sąsiedztwo stanowią istotne wyzwanie dla badań molekularnych wymagających precyzyjnego pozyskania materiału tkankowego. W niniejszej rozprawie doktorskiej kluczowe znaczenie miało zastosowanie techniki mikrodysekcji laserowej, która jako jedyna dostępna metoda pozwala na precyzyjne wyizolowanie konkretnych struktur anatomicznych z dużą dokładnością przestrzenną. Dzięki tej technice możliwe było niezależne pozyskanie tkanki z tej struktury oraz przeprowadzenie dalszych analiz molekularnych, które przedstawiono w niniejszej pracy. Lokalizację jąder uzdeczki oraz obszar wycięcia za pomocą mikrodysekcji laserowej przedstawiono na rycinie 7.1.



7.1. Ekspresja mikroRNA w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto

W celu szczegółowego scharakteryzowania molekularnych różnic w obrębie jąder Hb między szczurami kontrolnymi szczepu WIS a szczurami WKY, wykazującymi fenotyp TRD, przeprowadzono analizę ekspresji cząsteczek mikroRNA (miRNA). MiRNA to niewielkie, niekodujące cząsteczki RNA, które odgrywają kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, głównie poprzez hamowanie translacji lub degradację docelowych mRNA (Bartel, 2004). Ze względu na ich istotny udział w regulacji procesów neuronalnych, plastyczności synaptycznej oraz odpowiedzi na stres, analiza poziomu ich ekspresji w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki może dostarczyć cennych informacji na temat mechanizmów molekularnych różnicujących osobniki podatne i odporne na leczenie przeciwdepresyjne. Schemat przebiegu doświadczenia przedstawiono na rycinie 7.2.



Rycina 7.2. Schemat przebiegu analizy ekspresji miRNA w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Na podstawie literatury oraz wyników wstępnych uzyskanych we wcześniejszych badaniach w laboratorium wyselekcjonowano 32 miRNA. Ekspresję wybranych miRNA oceniono w MHb i LHb przy użyciu macierzy miRNA TaqMan. Wyniki analizy statystycznej ekspresji miRNA w MHb i LHb przedstawiono w tabeli 7.1.

Tabela 7.1. Wyniki analizy statystycznej ekspresji miRNA w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Różnice w poziomie ekspresji pomiędzy szczepami sprawdzono za pomocą testu t Studenta

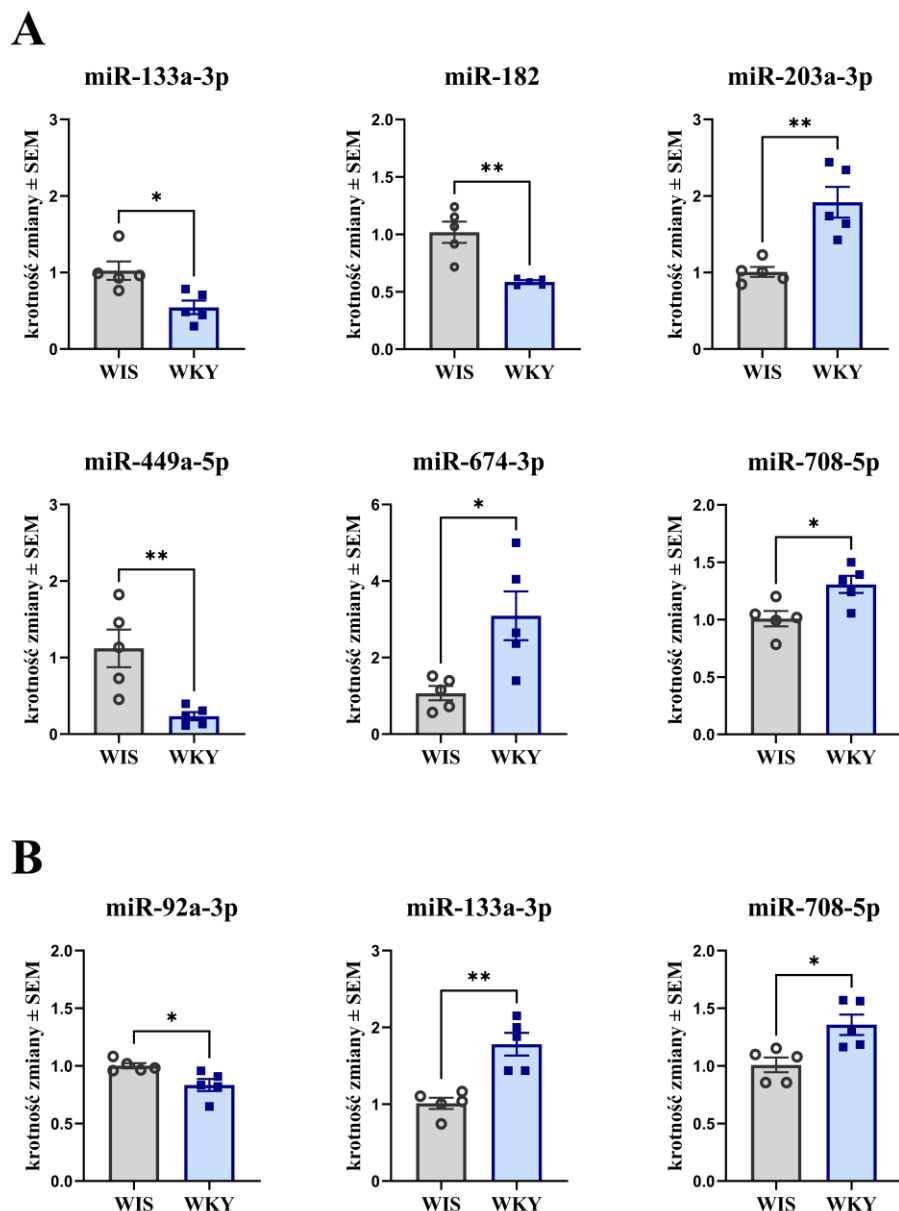
miRNA	Analiza ekspresji w MHb	Analiza ekspresji w LHb
miR-133a-3p	$p = 0.0121$ *	$p = 0.0016$ **
miR-708-5p	$p = 0.0182$ *	$p = 0.0128$ *
miR-203a-3p	$p = 0.0026$ **	$p = 0.0510$
miR-449a-5p	$p = 0.0078$ **	$p = 0.3276$
miR-674-3p	$p = 0.0161$ *	$p = 0.9316$
miR-182	$p = 0.0017$ **	ekspresja poza progiem detekcji
miR-92a-3p	$p = 0.7380$	$p = 0.0191$ *
miR-7a-5p	$p = 0.5355$	$p = 0.3358$
miR-16-5p	$p = 0.4112$	$p = 0.6552$
miR-19a-3p	$p = 0.5270$	$p = 0.1525$
miR-221-3p	$p = 0.0856$	$p = 0.0738$
miR-223-3p	$p = 0.1555$	$p = 0.1875$
miR-23a-3p	$p = 0.0644$	$p = 0.6320$
miR-29a-5p	$p = 0.1929$	$p = 0.1637$
miR-29a-3p	$p = 0.6231$	$p = 0.0632$
miR-30a-3p	$p = 0.1788$	$p = 0.1719$
miR-34b-3p	$p = 0.6983$	$p = 0.2618$
miR-451-5p	$p = 0.5887$	$p = 0.2455$
miR-674-3p	$p = 0.2507$	$p = 0.3421$
miR-7a-2-3p	$p = 0.3738$	$p = 0.1366$
miR-7-1-3p	$p = 0.0535$	$p = 0.5885$
miR-7	$p = 0.8160$	$p = 0.5382$
miR-184	$p = 0.1997$	ekspresja poza progiem detekcji
miR-1-3p	ekspresja poza progiem detekcji	$p = 0.1148$
miR-214-3p	ekspresja poza progiem detekcji	$p = 0.1118$
miR-16-3p	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
miR-429	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
miR-362-3p	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ oznaczono istotnie statystyczne różnice w ekspresji. MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Większość analizowanych miRNA wykazywała zbliżony poziom ekspresji u obu szczepów szczurów w obu jądrach Hb. Jednak w obrębie MHb ekspresja sześciu miRNA różnicowała istotnie szczury WKY od szczurów WIS (tabela 7.1, rycina 7.3). Trzy z nich charakteryzowały się niższym poziomem ekspresji u szczurów WKY w porównaniu do szczurów WIS: miR-133a-3p ($p=0.0121$), miR-182 ($p=0.0017$), miR-449a-5p ($p=0.0078$). Natomiast dla trzech pozostałych miRNA ekspresja była wyższa u szczurów WKY: miR-203a-3p ($p=0.0026$), miR-674-3p ($p=0.0161$), miR-708-5p ($p=0.0182$) (rycina 7.3).

W Lhb istotne różnice w ekspresji między szczepami odnotowano dla trzech miRNA (tabela 7.1, rycina 7.3). Dwa z nich, miR-133a-3p ($p=0.0016$) oraz miR-708-5p ($p=0.0128$), wykazały wyższy poziom ekspresji u szczurów WKY w porównaniu do WIS, podczas gdy ekspresja miR-92a-3p ($p=0.0191$) była niższa u szczurów WKY (rycina 7.3).

Ze względu na fakt, że wszystkie miRNA analizowano na jednej płytce, przeprowadzono dodatkową kontrolę błędu statystycznego, stosując metodę korekcji dla wielokrotnych porównań. Wykorzystano dwuetapową metodę krokową Benjamina, Kriegera i Yekutieli, przyjmując próg istotności dla współczynnika fałszywych odkryć ($FDR < 0.05$).

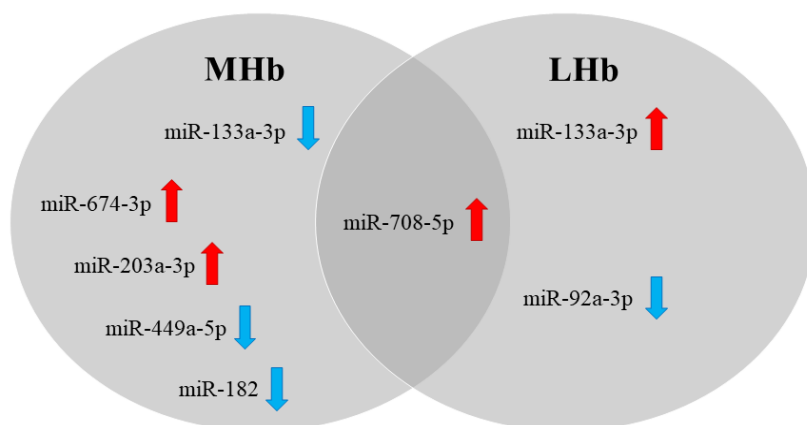


Rycina 7.3. Ekspresja statystycznie istotnie różnicujących miRNA pomiędzy szczurami Wistar Han i Wistar Kyoto w: **A)** środkowym jądrze uzdeczki (MHb) oraz **B)** bocznym jądrze uzdeczki (LHb). Wyniki uzyskano dla 5 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako krotność zmiany $\pm$ SEM. Wartości p oszacowano przy użyciu testu t Studenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto

Uzyskane wyniki przedstawiono również na diagramie Venna w celu zobrazowania różnic w zmianach ekspresji miRNA pomiędzy MHb i LHb. Spośród analizowanych miRNA, miR-133a-3p oraz miR-708-5p wykazywały istotne różnice w ekspresji między szczepami w obu jądrach Hb. Ekspresja miR-708-5p była wyższa u szczurów WKY w porównaniu do WIS w obu strukturach (rycina 7.4). Natomiast poziom ekspresji miR-133a-3p wykazywał odmienny

wzorzec: w MHb był istotnie niższy u szczurów WKY, podczas gdy w LHb – wyższy w porównaniu do szczurów WIS (rycina 7.4).

Zmiany miRNA u szczurów WKY w porównaniu
do grupy kontrolnej – szczurów WIS



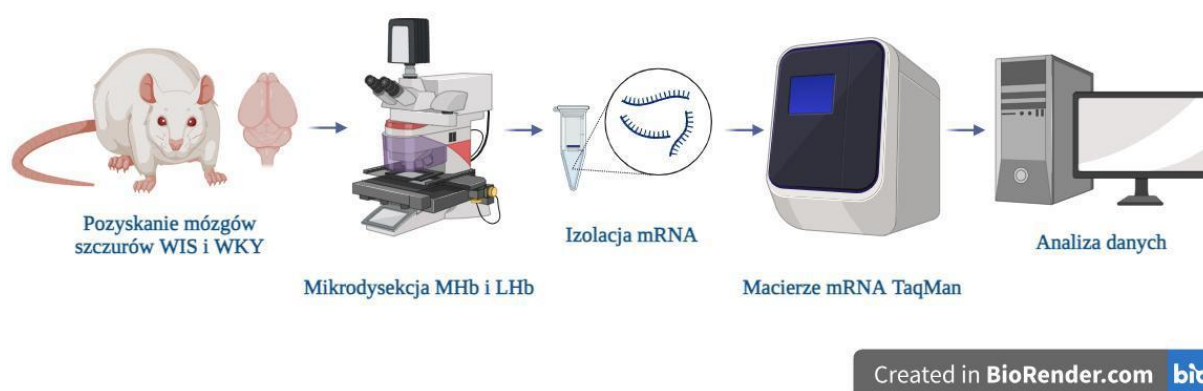
Rycina 7.4. Diagram Venna przedstawiający porównanie zmian miRNA w obrębie środkowego i bocznego jądra uzdeczki u szczurów Wistar Kyoto w porównaniu z grupą kontrolną – szczurami Wistar Han. WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Podsumowując uzyskane wyniki wykazano, że MHb i LHb wykazują wyraźnie zróżnicowany profil ekspresji miRNA, co sugeruje, że każda z tych struktur może podlegać odrębnym mechanizmom regulacji potranskrypcyjnej i pełnić różne funkcje molekularne w kontekście fenotypu oporności na leczenie przeciwdepresyjne.

7.2. Ekspresja genów w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto

Uwzględniając biologiczną funkcję miRNA, polegającą na regulacji stabilności i translacji mRNA docelowych genów, w kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę ekspresji mRNA. Na podstawie dostępnych baz danych, takich jak miRWalk oraz TargetScan – bezpłatnych otwartych platform bioinformatycznych umożliwiających identyfikację przewidywanych oraz eksperymentalnie zweryfikowanych miejsc wiązania cząsteczek miRNA z docelowymi mRNA – przeprowadzono analizę w celu wytypowania potencjalnych genów

regulowanych przez różnicujące się miRNA. Celem tej analizy było wskazanie cząsteczek mRNA, których ekspresja może być modulowana przez miRNA istotnie różniące się pomiędzy szczurami WIS i WKY. Sprawdzenie poziomu mRNA pozwoliło zweryfikować, czy zmiany w ekspresji miRNA przekładają się na zmiany w ekspresji ich potencjalnych celów na poziomie transkryptu. Schemat przebiegu doświadczenia przedstawiono na rycinie 7.5.



Rycina 7.5. Schemat przebiegu analizy ekspresji mRNA w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Ekspresję wybranych mRNA oceniono w MHb i LHb przy użyciu macierzy mRNA TaqMan. Wyniki analizy statystycznej ekspresji wyselekcjonowanych genów przedstawiono w tabeli 7.2.

Tabela 7.2. Wyniki analizy statystycznej ekspresji genów w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Różnice w poziomie ekspresji pomiędzy szczepami sprawdzono za pomocą testu t Studenta

Gen	Analiza ekspresji w MHb	Analiza ekspresji w LHb
<i>Cacna1b</i>	$p = 0,7583$	$p = 0,7641$
<i>Cdkn1c</i>	$p = 0,0011$ **	$p = 0,1462$
<i>Chrna1</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Drd2</i>	$p = 0,5115$	$p = 0,0121$ *
<i>Elk4</i>	$p = 0,0837$	$p = 0,0190$ *
<i>Gabra1</i>	$p = 0,1620$	$p = 0,1147$
<i>Gabrb1</i>	$p = 0,0647$	$p = 0,6410$
<i>Gpr55</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Htr2a</i>	ekspresja poza progiem detekcji	$p = 0,0037$ **
<i>Htr4</i>	$p = 0,0527$	$p = 0,0428$ *
<i>Kcnj5</i>	$p = 0,0983$	$p = 0,0126$ *
<i>Kcnj9</i>	$p = 0,0051$ **	$p = 0,3263$
<i>Htr7</i>	$p = 0,0096$ **	$p = 0,0288$ *
<i>Mapk14</i>	$p = 0,6826$	$p = 0,3950$
<i>Mapk8</i>	$p = 0,8766$	$p = 0,7846$
<i>Nrg1</i>	$p = 0,3996$	$p = 0,4061$
<i>Ntrk2</i>	$p = 0,0569$	$p = 0,3761$
<i>Ntrk3</i>	$p = 0,3556$	$p = 0,0952$
<i>Prl3a1</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Prl8a5</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Slc12a5</i>	$p = 0,0028$ **	$p = 0,0129$ *
<i>Slc17a6</i>	$p = 0,5356$	$p = 0,9215$
<i>Slc6a2</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Slc6a4</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Slc6a6</i>	$p = 0,4789$	$p = 0,7018$
<i>Sstr2</i>	$p = 0,3926$	ekspresja poza progiem detekcji
<i>Sstr3</i>	ekspresja poza progiem detekcji	$p = 0,4838$
<i>Sstr4</i>	ekspresja poza progiem detekcji	$p = 0,0144$ *
<i>Tph1</i>	ekspresja poza progiem detekcji	ekspresja poza progiem detekcji

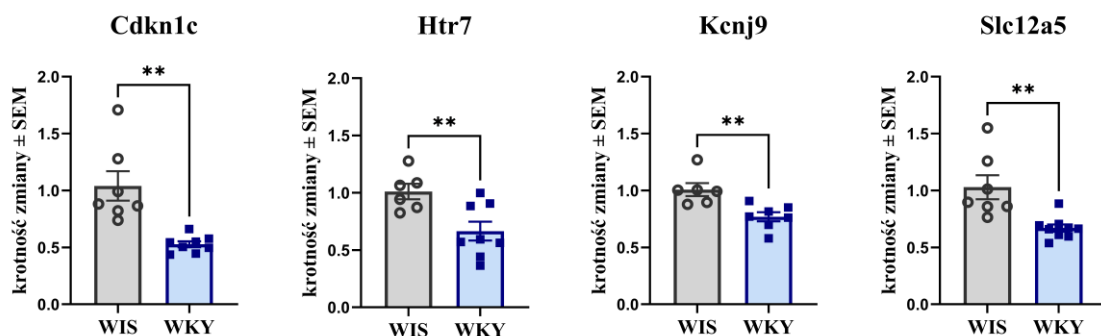
* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ oznaczono istotnie statystycznie różnice w ekspresji. MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w ekspresji czterech genów pomiędzy szczepami WIS i WKY w obrębie MHb. Poziom ekspresji wszystkich tych genów był niższy u szczurów WKY w porównaniu do WIS: *Cdkn1c* ($p=0.0011$), *Htr7* ($p=0.0096$), *Kcnj9* ($p=0.0029$) oraz *Slc12a5* ($p=0.0028$) (tabela 7.2., rycina 7.6).

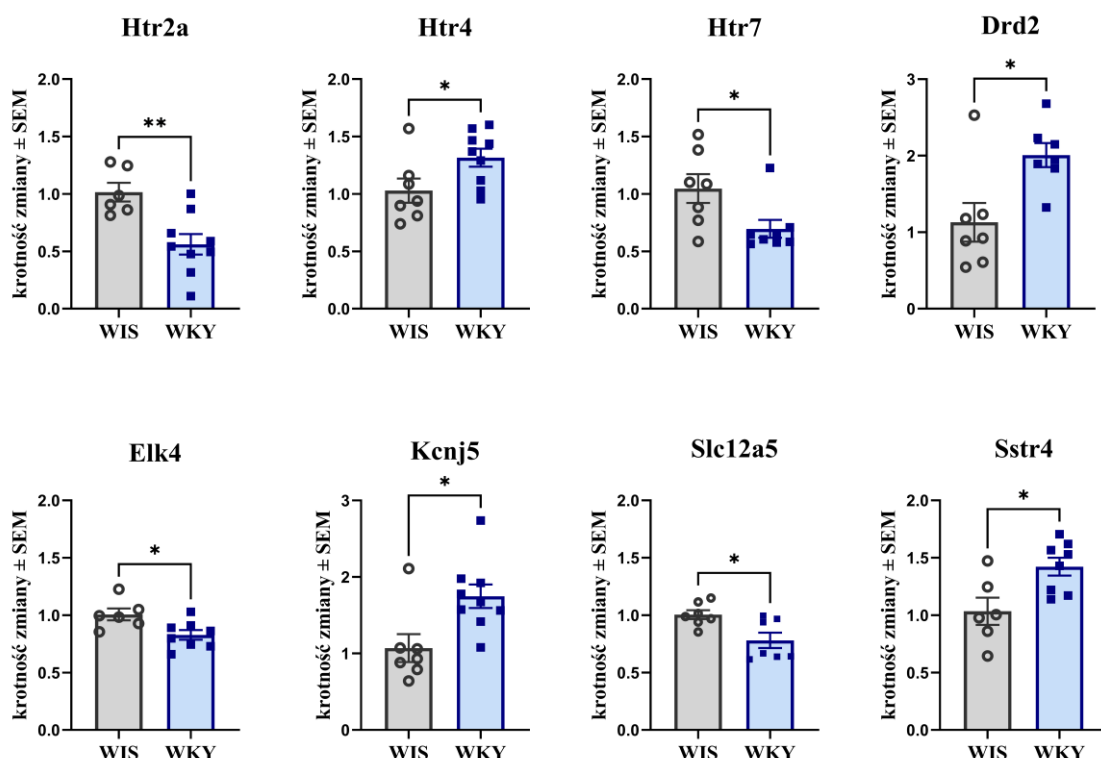
Natomiast w LHb zaobserwowano istotne różnice w ekspresji ośmiu genów. Poziom ekspresji czterech z nich był wyższy u szczurów WKY w porównaniu do szczurów WIS: *Htr4*

($p=0.0428$), *Drd2* ($p=0.0121$), *Kcnj5* ($p=0.0126$), *Sstr4* ($p=0.0144$). Z kolei dla pozostałych czterech genów ekspresja była niższa u szczurów WKY: *Htr2a* ($p=0.0037$), *Htr7* ($p=0.0288$), *Elk4* ($p=0.0190$), *Slc12a5* ($p=0.0129$) (tabela 7.2., rycina 7.6).

A



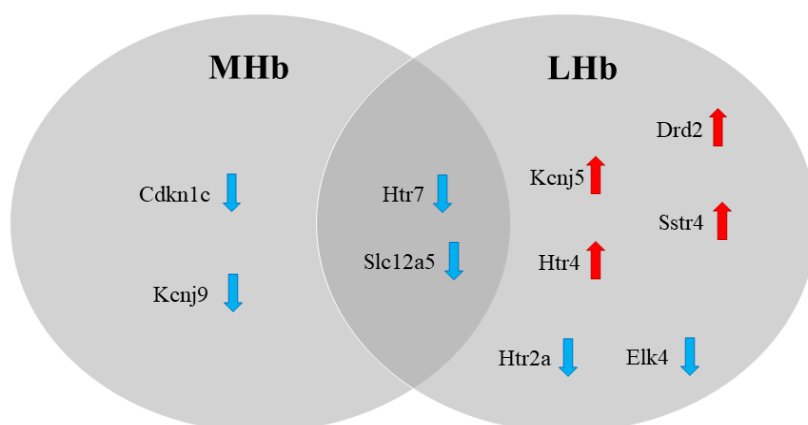
B



Rycina 7.6. Ekspresja statystycznie istotnie różnicujących mRNA pomiędzy szczurami Wistar Han i Wistar Kyoto w: **A**) środkowym jądrze uzdeczki (MHb) oraz **B**) bocznym jądrze uzdeczki (LHb). Wyniki uzyskano dla 6-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako krotność zmiany $\pm$ SEM. Wartości p oszacowano przy użyciu testu t Studenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto

Uzyskane wyniki zilustrowano również za pomocą diagramu Venna (rycina 7.7) w celu porównania różnic w zmianach ekspresji mRNA pomiędzy MHb i LHb. Wspólnymi genami różnicującymi oba szczepy szczurów w obu strukturach były *Htr7* oraz *Slc12a5*, przy czym ich poziomy ekspresji były niższe u szczurów WKY w porównaniu do szczurów WIS (rycina 7.7).

Zmiany mRNA u szczurów WKY w porównaniu do
grupy kontrolnej – szczurów WIS

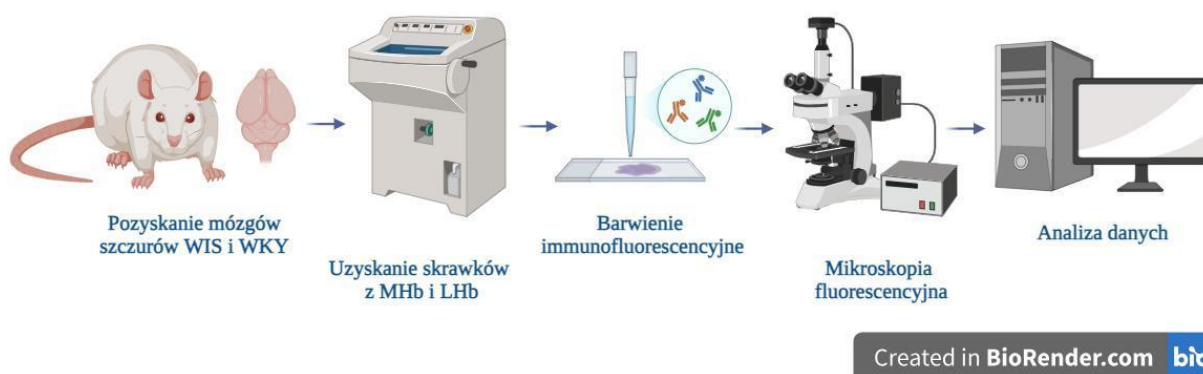


Rycina 7.7. Diagram Venna przedstawiający porównanie zmian mRNA w obrębie środkowego i bocznego jądra uzdeczki u szczurów Wistar Kyoto w porównaniu z grupą kontrolną – szczurami Wistar Han. WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Podsumowując uzyskane wyniki, należy podkreślić, że w przypadku cząsteczek miRNA większa liczba wykazywała istotnie zmienioną ekspresję w MHb w porównaniu do LHb. Natomiast na poziomie transkryptomu (mRNA) więcej różnic pomiędzy szczurami WIS i WKY odnotowano w LHb. Taka rozbieżność w lokalizacji zmian ekspresji pomiędzy poziomem regulacyjnym a efektorowym może wskazywać na złożony układ regulacji transkrypcyjnej i potranskrypcyjnej w obrębie jąder Hb. Szczególnie interesujące jest to w kontekście danych przedstawionych przez Kim i Chang (2005), którzy wykazali strukturalną asymetrię połączeń pomiędzy jądrami Hb – jedynie MHb wysyła projekcje do LHb. Może to sugerować, że zmiany na poziomie miRNA w MHb oddziałują pośrednio na ekspresję mRNA w LHb, co stanowi potencjalny mechanizm komunikacji funkcjonalnej pomiędzy tymi strukturami i może mieć znaczenie w kontekście zaburzeń depresyjnych.

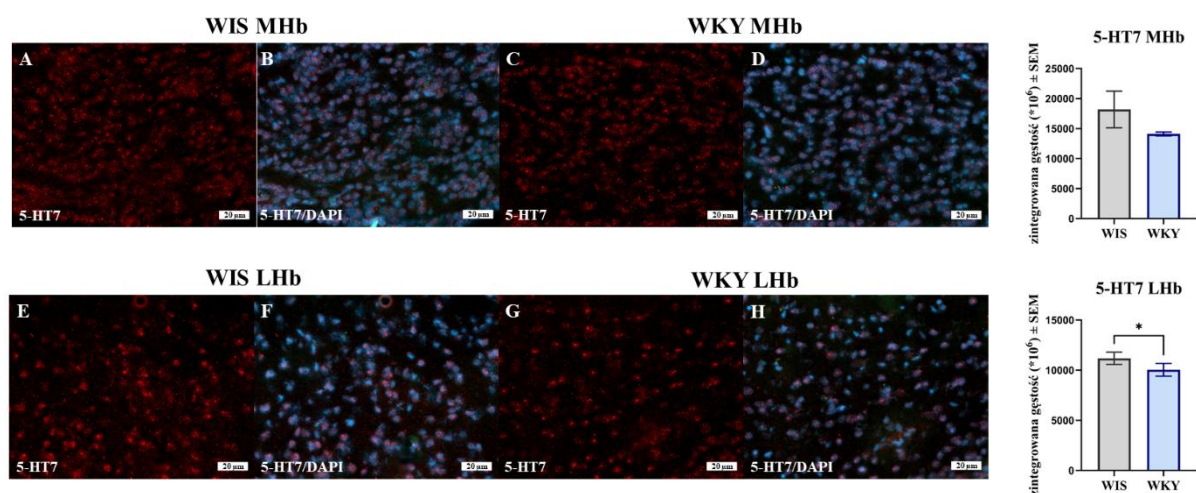
7.3. Poziom białka receptora serotoninowego 5-HT7 i kanału chlorkowo-potasowego KCC2 w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto

Spośród genów, dla których stwierdzono istotne zmiany poziomu ekspresji w analizie transkryptomicznej, jedynie dwa wykazały zmienioną ekspresję zarówno w MHb, jak i LHb – gen *Htr7* kodujący receptor serotoninowy 5-HT7 oraz gen *Slc12a5* kodujący kanał chlorkowo-potasowy KCC2. Biorąc pod uwagę ich potencjalne znaczenie funkcjonalne oraz fakt, że zmiany ekspresji występowały niezależnie od lokalizacji anatomicznej, zdecydowano się na dalszą charakterystykę tych genów na poziomie białkowym. Ze względu na ograniczenia techniczne, jedyną techniką umożliwiającą ocenę poziomu białka było barwienie immunofluorescencyjne. Zastosowanie tej metody pozwoliło na określenie, czy obserwowane zmiany w poziomie mRNA znajdują odzwierciedlenie również na poziomie białka. Schemat przebiegu doświadczenia przedstawiono na rycinie 7.8.



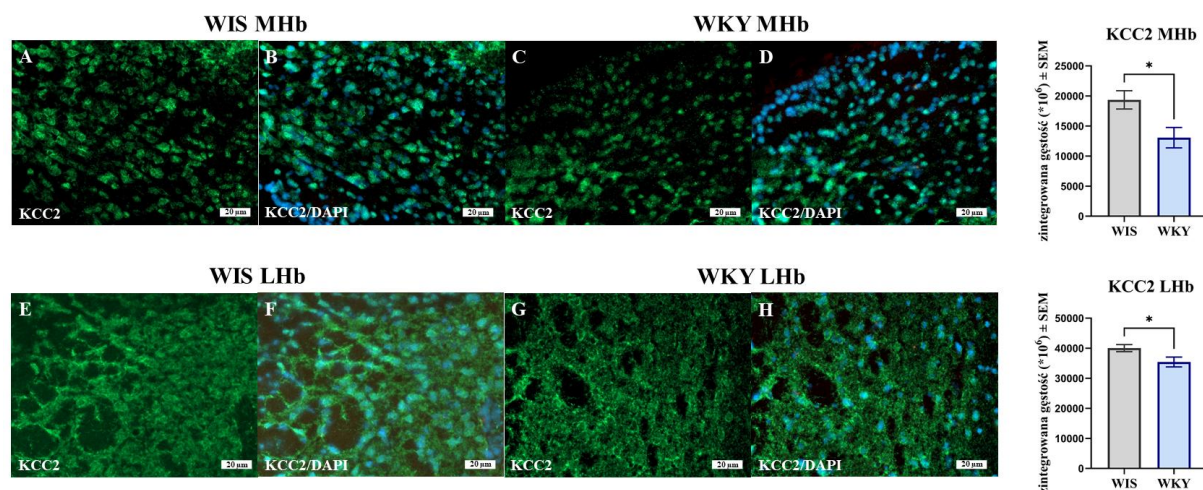
Rycina 7.8. Schemat przebiegu analizy poziomu białka w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Przeprowadzona analiza immunofluorescencyjna wykazała obniżony poziom receptora serotoninowego 5-HT7, przy czym istotność statystyczną zaobserwowano jedynie w LHb ($p=0.0288$) (rycina 7.9).



Rycina 7.9. Poziom białka receptora serotoninowego 5-HT7 w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające ekspresję 5-HT7 w MHb szczurów WIS (A, B) i WKY (C, D) oraz w LHb szczurów WIS (E, F) i WKY (G, H). Analizę przeprowadzono dla 4–5 zwierząt na grupę, a wyniki przedstawiono na wykresie jako średnie zintegrowanej gęstości $\pm$ SEM. Skala = 20 μm . WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Z kolei ekspresja kanału chlorkowo-potasowego KCC2, kodowanego przez gen *Slc12a5*, była istotnie zmniejszona zarówno w LHb ($p=0.0432$), jak i w MHb ($p=0.0328$) (rycina 7.10).

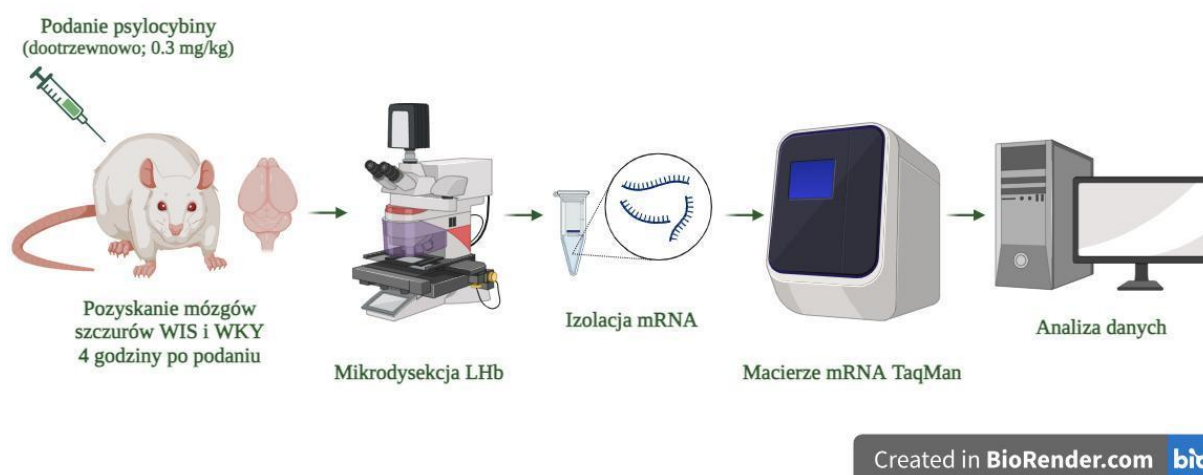


Rycina 7.10. Poziom białka kanału chlorkowo-potasowego KCC2 w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające ekspresję KCC2 w MHb szczurów WIS (A, B) i WKY (C, D) oraz LHb szczurów WIS (E, F) i WKY (G, H). Analizę przeprowadzono dla 4–5 zwierząt na grupę, a wyniki przedstawiono na wykresie jako średnie zintegrowanej gęstości $\pm$ SEM. Skala = 20 μm . Skróty: WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Podsumowując, wyniki te sugerują, że zaburzenia w ekspresji tych białek mogą odgrywać rolę w patofizjologii obserwowanego fenotypu szczurów WKY.

7.4. Ekspresja genów w bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

Bazując na najnowszych doniesieniach dotyczących skuteczności psylocybiny w leczeniu depresji lekoopornej zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych (Goodwin i wsp., 2022; Kolasa i wsp., 2024), postanowiono ocenić molekularny efekt jej działania po jednokrotnym podaniu. Szczury kontrolne WIS i WKY otrzymały dootrzewnowo roztwór soli fizjologicznej, natomiast szczury doświadczalne WIS i WKY otrzymały dootrzewnowo roztwór psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. Po upływie 4 godzin od podania zwierzęta zostały poddane dekapitacji. Schemat przebiegu doświadczenia przedstawiono na rycinie 7.11.



Rycina 7.11. Schemat przebiegu analizy ekspresji mRNA w bocznym jądrze uzdeczki 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Po podaniu psylocybiny sprawdzano ekspresję tych samych genów, aby ocenić, czy substancja ta wpływa na molekularne cele wcześniej zidentyfikowane jako różnicujące szczury WIS i WKY. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej ekspresji genów w LHb po podaniu psylocybiny szczurom WIS i WKY przedstawiono w tabeli 7.3.

Tabela 7.3. Wyniki analizy statystycznej ekspresji genów w bocznym jądrze uzdeczki 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Różnice w poziomie ekspresji sprawdzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA)

Gen	Analiza ekspresji w LHb		
	Interakcja	Szczep	Lek
<i>Cacna1b</i>	F (1, 32) = 0.6538 $p=0.4247$	F (1, 32) = 8.340 $p=0.0069$ **	F (1, 32) = 3.002 $p=0.0928$
<i>Cdkn1c</i>	F (1, 31) = 0.0367 $p=0.8493$	F (1, 31) = 5.133 $p=0.0306$ *	F (1, 31) = 0.013 $p=0.9092$
<i>Chrna1</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Drd2</i>	F (1, 32) = 0.740 $p=0.3961$	F (1, 32) = 1.562 $p=0.2204$	F (1, 32) = 0.161 $p=0.6908$
<i>Elk4</i>	F (1, 32) = 0.880 $p=0.3552$	F (1, 32) = 0.063 $p=0.8041$	F (1, 32) = 0.391 $p=0.5362$
<i>Gabra1</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Gabbr1</i>	F (1, 32) = 0.477 $p=0.4949$	F (1, 32) = 0.285 $p=0.5969$	F (1, 32) = 0.090 $p=0.7664$
<i>Gpr55</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Htr2a</i>	F (1, 32) = 1.249 $p=0.2721$	F (1, 32) = 4.996 $p=0.0325$ *	F (1, 32) = 0.112 $p=0.7396$
<i>Htr4</i>	F (1, 32) = 0.393 $p=0.5349$	F (1, 32) = 1.847 $p=0.1836$	F (1, 32) = 0.011 $p=0.9174$
<i>Kcnj5</i>	F (1, 29) = 6.006 $p=0.0205$ *	F (1, 29) = 28.06 $p<0.0001$ ****	F (1, 29) = 5.256 $p=0.0293$ *
<i>Kcnj9</i>	F (1, 30) = 1.540 $p=0.2243$	F (1, 30) = 0.00083 $p=0.9772$	F (1, 30) = 0.241 $p=0.6273$
<i>Htr7</i>	F (1, 29) = 7.000 $p=0.0130$ *	F (1, 29) = 24.63 $p<0.0001$ ****	F (1, 29) = 1.554 $p=0.2225$
<i>Mapk14</i>	F (1, 29) = 6.013 $p=0.0205$ *	F (1, 29) = 5.856 $p=0.0220$ *	F (1, 29) = 1.662 $p=0.2076$
<i>Mapk8</i>	F (1, 32) = 0.048 $p=0.8274$	F (1, 32) = 0.131 $p=0.7201$	F (1, 32) = 2.919 $p=0.0972$
<i>Nrg1</i>	F (1, 32) = 2.668 $p=0.1122$	F (1, 32) = 0.326 $p=0.5722$	F (1, 32) = 1.171 $p=0.2872$
<i>Ntrk2</i>	F (1, 31) = 3.213 $p=0.0828$	F (1, 31) = 0.533 $p=0.4709$	F (1, 31) = 0.228 $p=0.6368$
<i>Ntrk3</i>	F (1, 32) = 2.592 $p=0.1172$	F (1, 32) = 1.904 $p=0.1771$	F (1, 32) = 0.053 $p=0.8196$
<i>Prl3a1</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Prl8a5</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Slc12a5</i>	F (1, 30) = 2.028 $p=0.1648$	F (1, 30) = 14.31 $p=0.0007$ ***	F (1, 30) = 0.983 $p=0.3294$
<i>Slc17a6</i>	F (1, 32) = 0.077 $p=0.7829$	F (1, 32) = 0.066 $p=0.7983$	F (1, 32) = 2.406 $p=0.1307$
<i>Slc6a2</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Slc6a4</i>	ekspresja poza progiem detekcji		
<i>Slc6a6</i>	F (1, 32) = 0.770 $p=0.3867$	F (1, 32) = 30.51 $p<0.0001$ ****	F (1, 32) = 15.80 $p=0.0004$ ****
<i>Sstr2</i>	F (1, 32) = 1.878 $p=0.1800$	F (1, 32) = 4.758 $p=0.0366$ *	F (1, 32) = 0.136 $p=0.7145$
<i>Sstr3</i>	F (1, 32) = 0.043 $p=0.8370$	F (1, 32) = 2.448 $p=0.1275$	F (1, 32) = 3.770 $p=0.0610$
<i>Sstr4</i>	F (1, 31) = 0.187 $p=0.6680$	F (1, 31) = 5.085 $p=0.0313$ *	F (1, 31) = 2.261 $p=0.1428$
<i>Tph1</i>	F (1, 30) = 4.304 $p=0.0467$ *	F (1, 30) = 3.094 $p=0.0888$	F (1, 30) = 0.204 $p=0.6550$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ oznaczono istotne statystyczne różnice w ekspresji.

LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

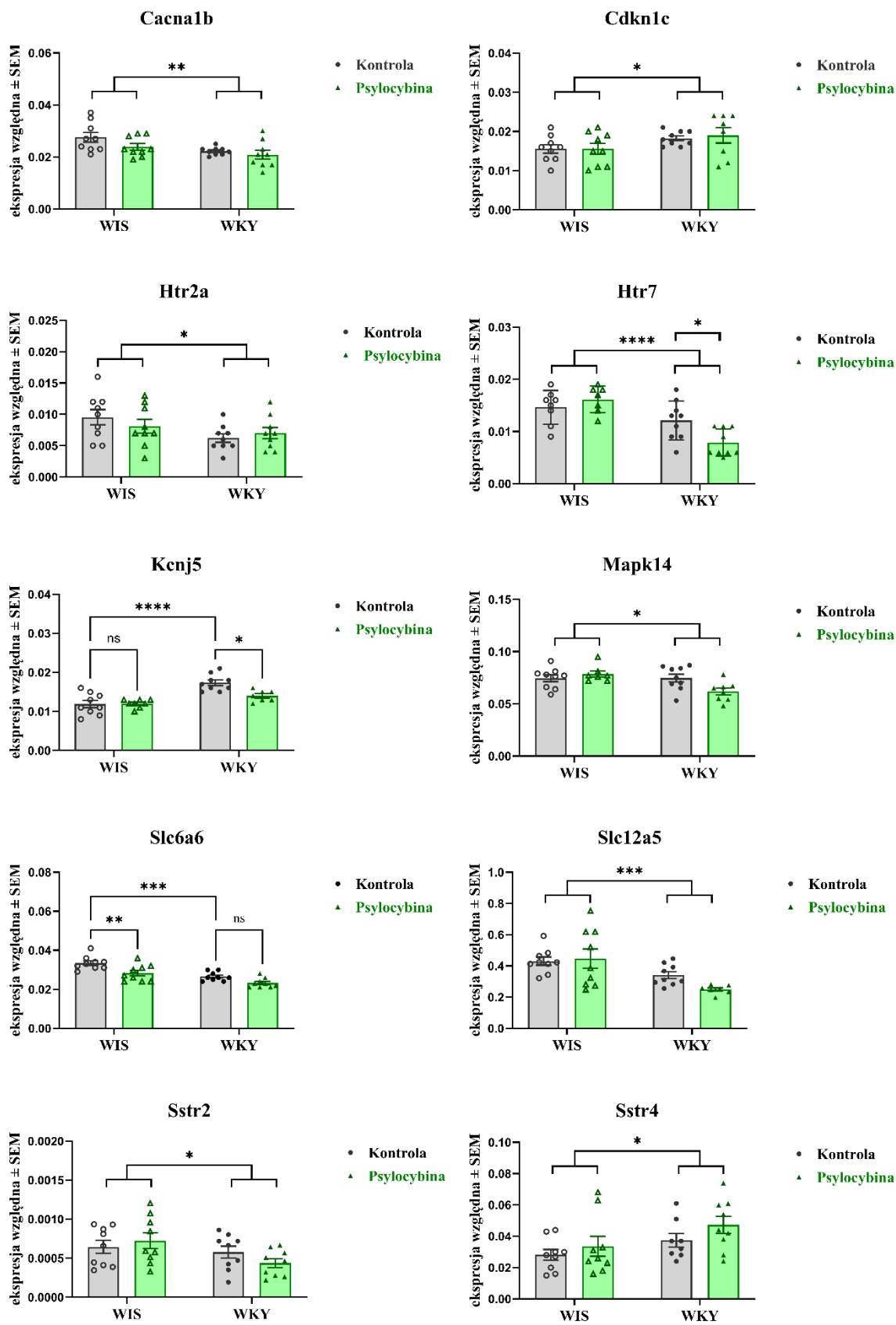
Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcję w ekspresji czterech genów: *Kcnj5* (F(1, 29)=6.006, $p=0.0205$), *Htr7* (F(1, 29)=7.000, $p=0.0130$), *Mapk14* (F(1, 29)=6.013; $p=0.0205$) oraz *Tph1* (F(1, 30)=4.304; $p=0.0467$) (tabela 7.3).

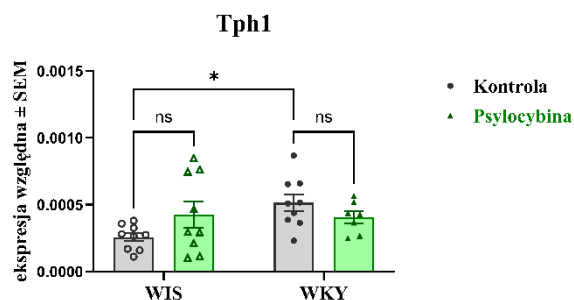
Ponadto analiza wykazała istotne różnice międzyszczepowe w ekspresji dziesięciu genów: *Cacna1b* ($F(1, 32)=8.340$, $p=0.0069$), *Cdkn1c* ($F(1, 31)=5.133$, $p=0.0306$), *Htr2a* ($F(1, 32)=4.996$, $p=0.0325$), *Kcnj5* ($F(1, 29)=28.06$, $p<0.0001$), *Htr7* ($F(1, 29)=24.63$, $p<0.0001$), *Mapk14* ($F(1, 29) = 5.856$, $p=0.0220$), *Slc12a5* ($F(1, 30)=14.31$, $p=0.0007$), *Slc6a6* ($F(1, 32)=30.51$, $p<0.0001$), *Sstr2* ($F(1, 32)=4.758$, $p=0.0366$) oraz *Sstr4* ($F(1, 31)=5.085$, $p=0.0313$) (tabela 7.3, rycina 7.12)

Dodatkowo analiza wykazała istotny wpływ psylocybiny w ekspresji dwóch genów: *Kcnj5* ($F(1, 29)=5.256$, $p=0.0293$) oraz *Slc6a6* ($F(1, 32)=15.80$, $p=0.0004$) (tabela 7.3, rycina 7.12).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya ujawniła istotnie niższą ekspresję genu *Slc6a6* ($p= 0.0004$) oraz istotnie wyższą ekspresję genu *Kcnj5* ($p<0.0001$) i *Tph1* ($p=0.0411$) u szczurów WKY (tabela 7.3, rycina 7.12).

Podanie psylocybiny spowodowało istotny spadek ekspresji *Slc6a6* ($p=0.0087$) u szczurów WIS, a także obniżenie ekspresji *Htr7* ($p=0.0344$) i *Kcnj5* ($p=0.0131$) u szczurów WKY (tabela 7.3, rycina 7.12).



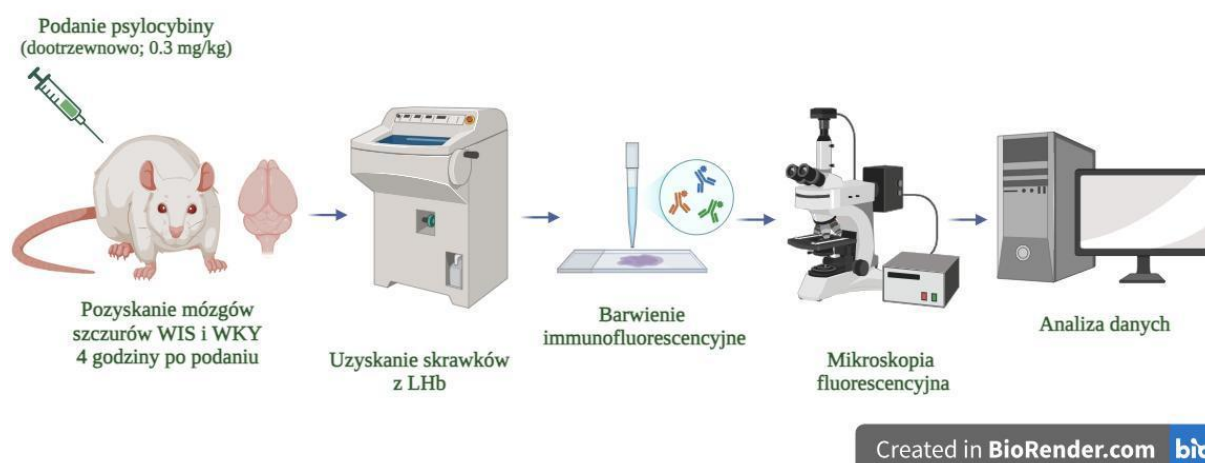


Rycina 7.12. Ekspresja genów w bocznym jądrze uzdeczki 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. Wyniki uzyskano dla 7-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że gen *Kcnj5* może odgrywać istotną rolę w mechanizmach molekularnych leżących u podstaw przeciwdepresyjnego działania psylocybiny. Jednokrotne podanie psylocybiny spowodowało spadek poziomu transkryptu *Kcnj5* u szczurów WKY do wartości porównywalnych z poziomem obserwowanym u szczurów WIS. Może to wskazywać na potencjalne działanie normalizujące psylocybiny w zakresie ekspresji tego genu, co jest szczególnie istotne w kontekście jego roli w regulacji funkcji neuronalnych i zaburzeń depresyjnych.

7.5. Poziom białka GIRK4 kodowanego przez gen *Kcnj5* w bocznym jądrze uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

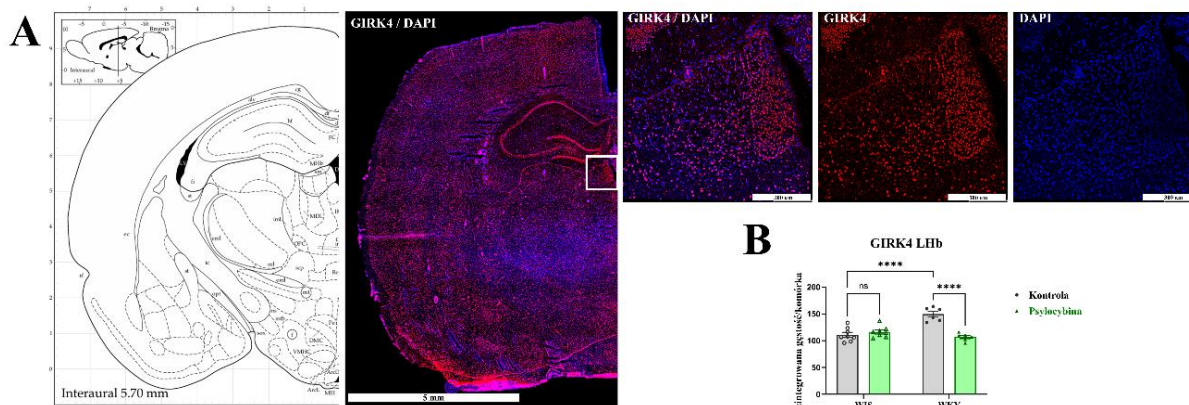
W związku z obserwowanymi, istotnymi zmianami w ekspresji genu *Kcnj5* w LHb (rycina 7.12), zdecydowano się na dalsze badania mające na celu określenie poziomu białka kodowanego przez ten gen – kanału potasowego GIRK4. Analiza poziomu tego białka została przeprowadzona w celu zweryfikowania, czy zmiany obserwowane na poziomie transkryptu znajdują odzwierciedlenie także na poziomie translacji. W tym celu wykonano barwienie immunofluorescencyjne 4 godziny po jednokrotnym dootrzewnowym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. Schemat przebiegu doświadczenia przedstawiono na rycinie 7.13.



Rycina 7.13. Schemat przebiegu analizy poziomu białka w bocznym jądrze uzdeczki 4 godziny po podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcję w ekspresji białka kodowanego przez gen *Kcnj5* ($F(1, 24)=31.69$, $p<0.0001$), różnice międzyszczepowe ($F(1, 24)=12.10$, $p=0.0019$) oraz wpływ psylocybiny ($F(1, 24)=19.57$, $p=0.0002$).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya ujawniła istotnie wyższy poziom białka genu *Kcnj5* ($p<0.0001$) u szczurów WKY kontrolnych, natomiast podanie psylocybiny spowodowało istotny spadek poziomu białka genu *Kcnj5* ($p<0.0001$) u tych zwierząt (rycina 7.14B).



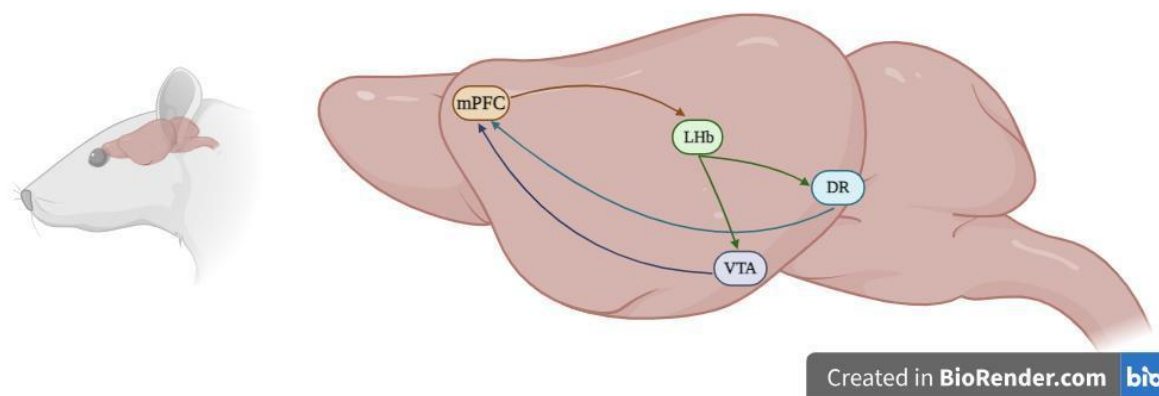
Rycina 7.14. Ekspresja białka GIRK4 kodowanego przez gen *Kcnj5* w bocznym jądrze uzdeczki 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. **A**) Reprezentatywny skrawek mózgu szczura przedstawiający lokalizację jąder uzdeczki (atlas stereotaktyczny Paxinosa i Watsona (2007), poziom bregma: -3.30 mm) oraz reprezentatywne zdjęcia przedstawiające boczne jądro uzdeczki po barwieniu immunofluorescencyjnym dla GIRK4 oraz barwieniu jąder komórkowych za pomocą DAPI. **B**) Analizę ilościową ekspresji białka przeprowadzono dla 6–8 zwierząt w każdej grupie, a dane przedstawiono jako średnią zintegrowaną gęstość na komórkę $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako **** $p < 0.0001$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki

Podsumowując, wynik ten potwierdza zmiany obserwowane na poziomie transkryptu. Jednokrotne podanie psylocybiny spowodowało znaczące obniżenie poziomu białka GIRK4 u szczurów WKY do wartości zbliżonych do tych obserwowanych u szczurów WIS, co sugeruje potencjalny wpływ tej substancji na normalizację aktywności układów kanałów jonowych w modelu depresji lekoopornej.

7.6. Ekspresja genu *Kcnj5* w środkowym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

LHb jest strukturą mózgu należącą do międzymózgowia, pełniącą funkcję istotnego węzła integracyjnego pomiędzy przodomózgowiem, a śródmózgowiem i tyłomózgowiem. LHb wysyła projekcje m.in. do DR oraz VTA, natomiast otrzymuje projekcję m.in. z mPFC (rycina

7.15) (Groos i Helmchen, 2024). Uwzględniając tę sieć połączeń oraz wcześniej zaobserwowane zmiany w ekspresji genu *Kcnj5* w LHb, zdecydowano się rozszerzyć analizę poziomu ekspresji tego genu również na inne, anatomicznie powiązane struktury, tj. mPFC, DR, VTA oraz MHb.

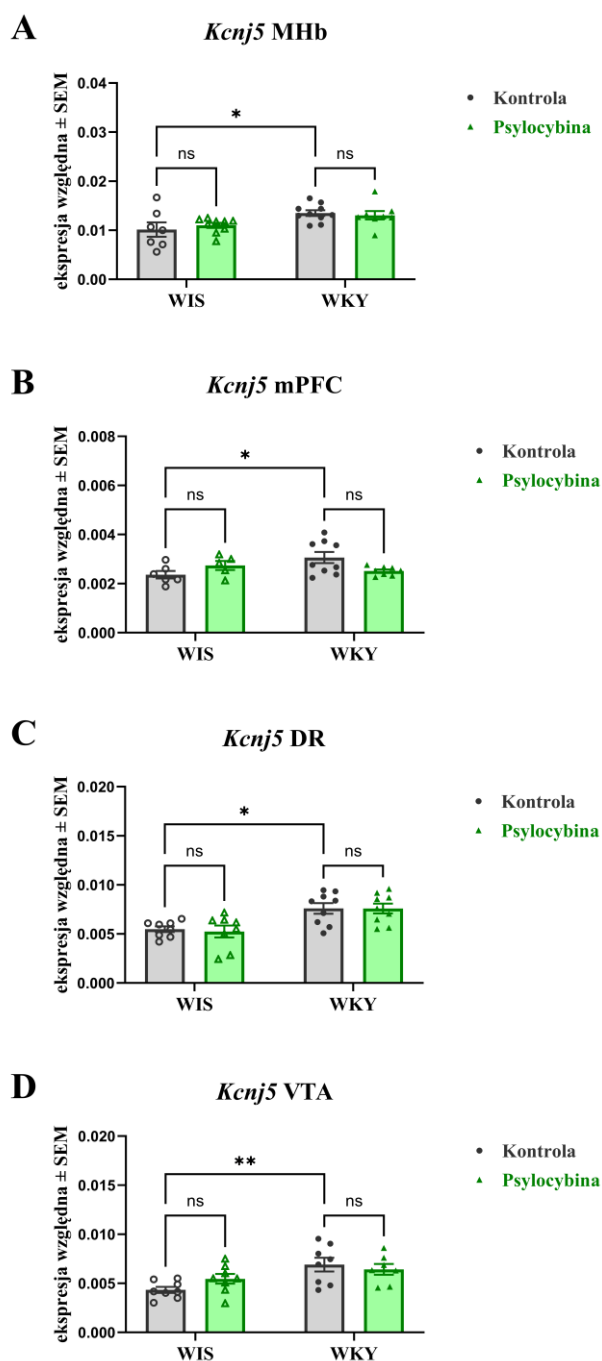


Rycina 7.15. Schematyczne przedstawienie wybranych połączeń pomiędzy strukturami w mózgu szczura. mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Poziom ekspresji genu *Kcnj5* oznaczono w MHb, mPFC, DR i VTA 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcje ekspresji *Kcnj5* w mPFC ($F(1, 24)=6.351$, $p=0.0188$) (rycina 7.16B) oraz różnice międzyszczepowe w MHb ($F(1, 30)=10.18$, $p=0.0033$) (rycina 7.16A), DR ($F(1, 30)=19.27$, $p=0.0001$) (rycina 7.16C) i VTA ($F(1, 27)=10.94$, $p=0.027$) (rycina 7.16D).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya wykazała istotnie wyższy poziom ekspresji *Kcnj5* u szczurów WKY kontrolnych w MHb ($p=0.0445$), mPFC ($p=0.0454$), DR ($p=0.0299$) oraz VTA ($p=0.0091$) (rycina 7.16)



Rycina 7.16. Ekspresja genu *Kcnj5* w środkowym jądrze uzdeczki (A), środkowej korze przedczołowej (B), jądrze grzbietowym szwu (C), brzusznej połacie nakrywki (D) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 4 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg. Wyniki uzyskano dla 6-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, pole brzuszne nakrywki

Podsumowując, szczury szczepu WKY wykazują istotnie wyższą ekspresję genu *Kcnj5* nie tylko w LHb, ale również w MHb, a także w strukturach anatomicznie z nim powiązanych – tj. w DR oraz VTA, do których LHb wysyła projekcje, oraz w środkowej korze przedczołowej mPFC, która z kolei wysyła projekcje do LHb. Taki wzorzec może wskazywać na szeroko rozpowszechnione zaburzenia w regulacji kanałów potasowych GIRK4 u szczurów WKY. Co istotne, jednorazowe podanie psylocybiny, mimo wpływu obserwowanego w LHb, nie spowodowało obniżenia ekspresji *Kcnj5* w żadnej z pozostałych badanych struktur, co może

sugerować, że efekt tej substancji jest regionowo specyficzny i ukierunkowany na kluczowe obszary związane z patofizjologią depresji.

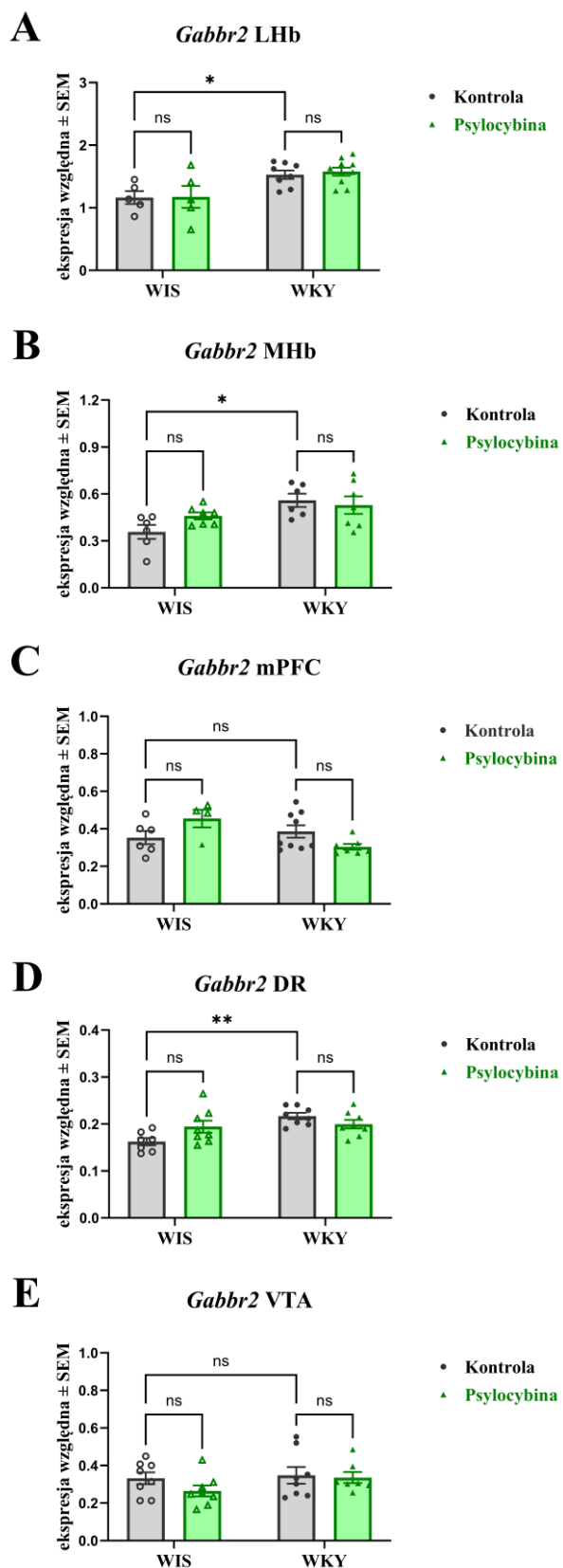
7.7. Ekspresja *Gabbr2* w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

W świetle wcześniejszych doniesień literaturowych, które wskazują, że aktywacja kanałów GIRK przez receptor GABA_B w obrębie LHb odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu fenotypu depresyjnego (Lecca i wsp., 2016), postanowiono sprawdzić poziom ekspresji genu *Gabbr2*, kodującego podjednostkę 2 receptora GABA_B, w tej strukturze oraz w pozostałych powiązanych strukturach. Analiza ta miała na celu ocenę, czy zmiany w układzie GABAergicznym mogą towarzyszyć obserwowanym zaburzeniom funkcji kanału GIRK4 i tym samym stanowić potencjalny mechanizm leżący u podstaw dysregulacji neuroprzekąźnictwa w modelu depresji lekoopornej.

Poziom ekspresji genu *Gabbr2* oznaczono w LHb, MHb, mPFC, DR oraz VTA 4 godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcję ekspresji *Gabbr2* w mPFC ($F(1, 22)=7.211$, $p=0.0135$) (rycina 7.17C) i DR ($F(1,27)=6.593$, $p=0.161$) (rycina 7.17D) oraz różnice międzyszczepowe w LHb ($F(1, 24)=15.63$ $p=0.0006$) (rycina 7.17A), MHb ($F(1, 22)=9.756$, $p=0.0049$) (rycina 7.17B) i DR ($F(1, 27)=9.644$, $p=0.0044$) (rycina 7.17D) oraz brak różnic w VTA (rycina 7.17E).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya wykazała istotnie wyższy poziom ekspresji *Gabbr2* w LHb ($p=0.0156$) (rycina 7.17A), MHb ($p=0.0214$) (rycina 7.17B) i DR ($p=0.0027$) u szczurów WKY.



Rycina 7.17. Ekspresja genu *Gabbr2* w bocznym jądrze uzdeczki (A), środkowym jądrze uzdeczki (B), środkowej korze przedczołowej (C), jądrze grzbietowym szwu (D), brzuszным polu nakrywki (E) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 4 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg. Wyniki uzyskano dla 5-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste koło dla szczurów WIS, pełne koło dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki

Podsumowując, szczury WKY charakteryzują się istotnie wyższą ekspresją genu *Gabbr2* w LHb, MHb oraz DR, w porównaniu do szczurów WIS, co może wskazywać na nasiloną sygnalizację GABAergiczną w tych obszarach u tego szczepu. Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji tego genu w mPFC ani w VTA. Co istotne, podanie psylocybiny nie wpłynęło istotnie na poziom ekspresji *Gabbr2* w żadnej z analizowanych struktur mózgu.

7.8. Ekspresja *Ppp2ca* w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszynym polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

Uwzględniając doniesienia literaturowe wskazujące, że nadaktywność LHb, obserwowana w depresji, może być związana ze zwiększoną aktywnością fosfatazy białkowej 2A (PP2A) – kluczowego regulatora szlaku sygnalizacyjnego receptora GABA_B oraz kanału potasowego GIRK (Lecca i wsp., 2016) – przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genu *Ppp2ca*, kodującego katalityczną podjednostkę PP2A, zarówno w LHb, jak i w pozostałych strukturach zaangażowanych w ten układ funkcjonalny.

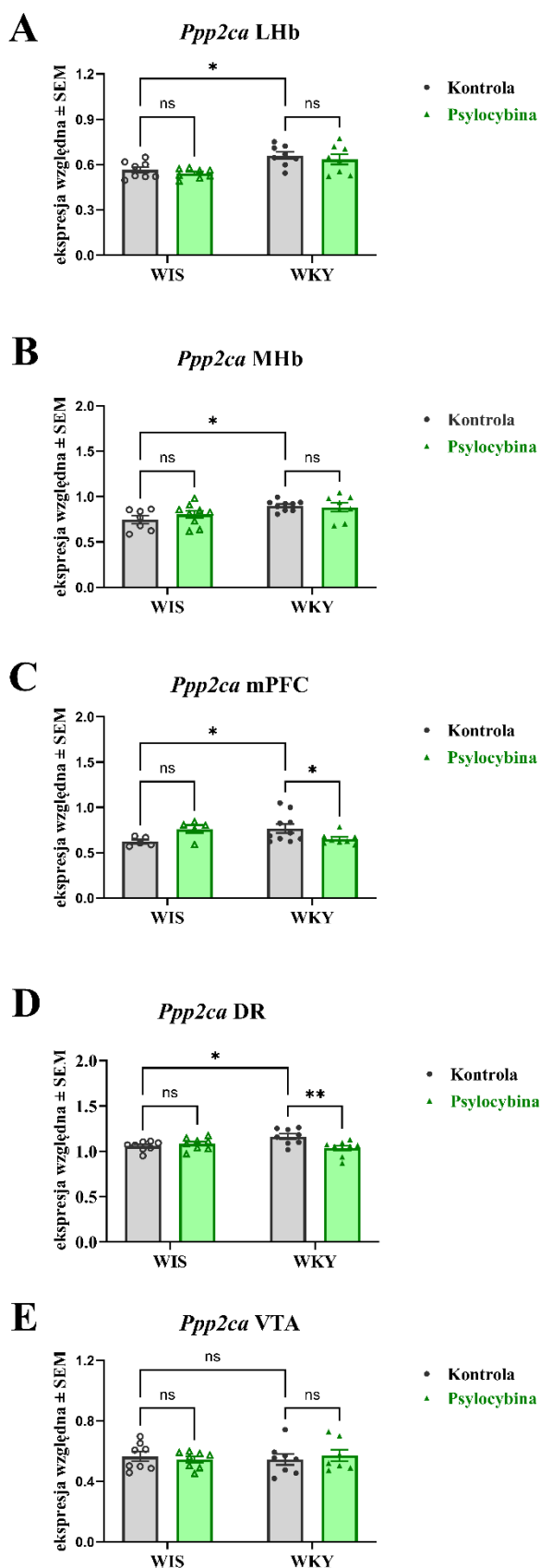
Poziom ekspresji genu *Ppp2ca* oznaczono w LHb, MHb, mPFC, DR i VTA cztery godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcję ekspresji *Ppp2ca* w mPFC ($F(1, 24)=8.260$, $p=0.0084$) (rycina 7.18C) i DR ($F(1, 29)=9.007$, $p=0.0055$) (rycina 7.18D) oraz różnice międzyszczepowe w LHb ($F(1,28)=15.99$, $p=0.004$) (rycina 7.18A) i MHb ($F(1, 29)=9.338$, $p=0.0048$) (rycina 7.18B).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya wykazała istotnie wyższy poziom ekspresji *Ppp2ca* w LHb ($p=0.0465$) (rycina 7.18A), MHb ($p=0.0414$) (rycina 7.18B), mPFC ($p=0.0270$) (rycina 7.18C) i DR ($p=0.0387$) (rycina 7.18D) u szczurów WKY.

Podanie psylocybiny spowodowało spadek ekspresji *Ppp2ca* w mPFC ($p=0.0396$) (rycina 7.18C) i DR ($p=0.007$) (rycina 7.18D) u szczurów WKY.

Nie zaobserwowano żadnych różnic w ekspresji *Ppp2ca* w VTA (rycina 7.18E).



Rycina 7.18. Ekspresja genu *Ppp2ca* w bocznym jądrze uzdeczki (A), środkowym jądrze uzdeczki (B), środkowej korze przedczołowej (C), jądrze grzbietowym szwu (D), brzuszным polu nakrywki (E) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 4 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg. Wyniki uzyskano dla 5-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki

Podsumowując, szczury WKY charakteryzują się istotnie wyższą ekspresją genu *Ppp2ca* w LHb, MHb, mPFC oraz DR w porównaniu do szczurów WIS. Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji tego genu w VTA. Co ciekawe, podanie psylocybiny spowodowało istotne obniżenie ekspresji *Ppp2ca* mPFC i DR u szczurów WKY, co może również stanowić kolejny potencjalny cel molekularny leżących u podstaw przeciwdepresyjnego działania psylocybiny.

7.9. Ekspresja *Grin2a* w środkowym i bocznym jądrze uzdeczki, środkowej korze przedczołowej, jądrze grzbietowym szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 4 godziny po podaniu psylocybiny

Analiza ekspresji genu *Grin2a*, kodującego podjednostkę GluN2A receptora NMDA, została dołączona do badań ze względu na dobrze udokumentowaną rolę układu glutaminianergicznego – a w szczególności receptorów NMDA – w patofizjologii depresji oraz w mechanizmie działania ketaminy, wykazującej szybkie działanie przeciwdepresyjne u pacjentów chorujących na TRD (Chen i wsp., 2024; Yang i wsp., 2018). Zmiany w jego ekspresji mogą wpływać na plastyczność synaptyczną, neuroprzeżywalność i odpowiedź neuronalną na stres. Włączenie tego genu do analizy umożliwia zatem ocenę, czy obserwowane efekty molekularne psylocybiny obejmują również układ glutaminianergiczny, co mogłoby wspierać hipotezę o jej działaniu poprzez modulację neuroplastyczności.

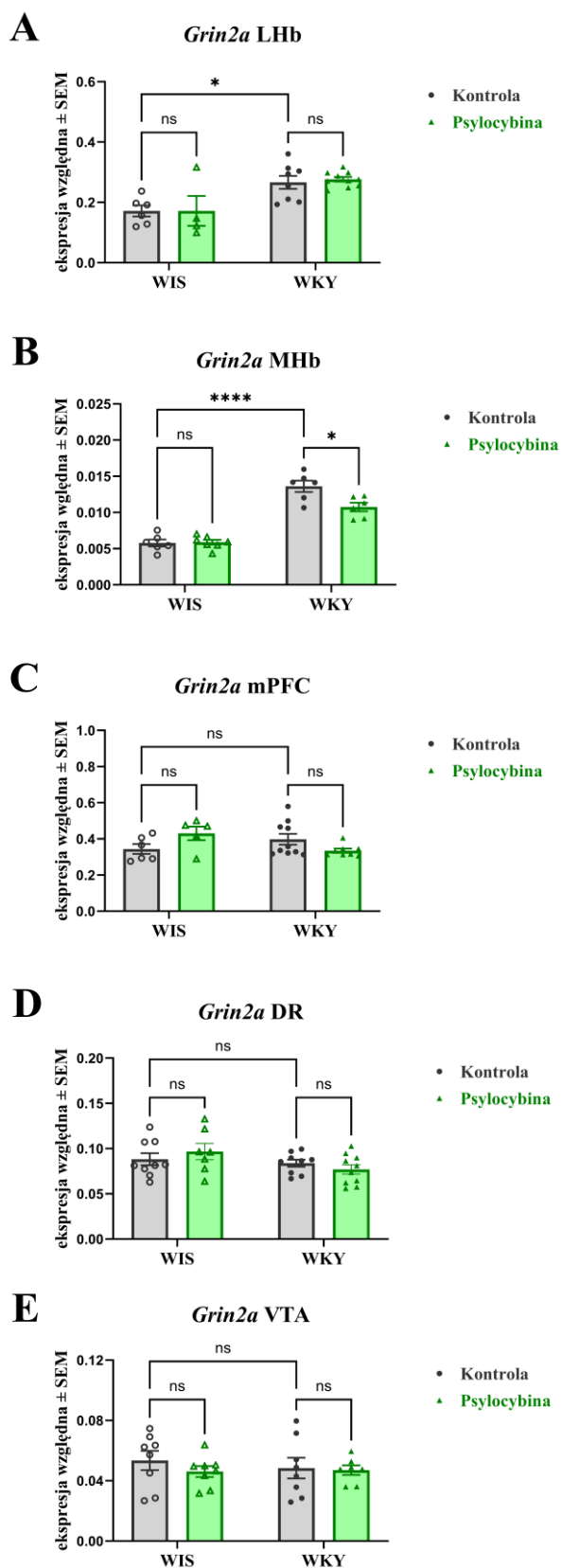
Poziom ekspresji genu *Grin2a* oznaczono w LHb, MHb, mPFC, DR i VTA cztery godziny po jednokrotnym podaniu psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotną statystycznie interakcję ekspresji *Grin2a* w MHb ($F(1, 21) = 7.047, p=0.0148$) (rycina 7.19B) i mPFC ($F(1, 25)=6.813, p=0.0151$) (rycina 7.19C) oraz różnice międzyszczepowe w MHb ($F(1, 21)=130.2, p<0,0001$) (rycina 7.19B) i LHb ($F(1, 24)=20.94, p=0.0001$) (rycina 7.19A).

Dalsza analiza post hoc przy użyciu testu Tukeya wykazała istotnie wyższy poziom ekspresji *Grin2a* w LHb ($p=0.0216$) (rycina 7.19A) i MHb ($p<0.0001$) (rycina 7.19B) u szczurów WKY.

Podanie psylocybiny spowodowało spadek ekspresji *Grin2a* w MHb u szczurów WKY ($p=0.0110$) (rycina 7.19B).

Nie zaobserwowano żadnych różnic w ekspresji *Grin2a* w DR (rycina 7.19D) oraz VTA (rycina 7.19E).



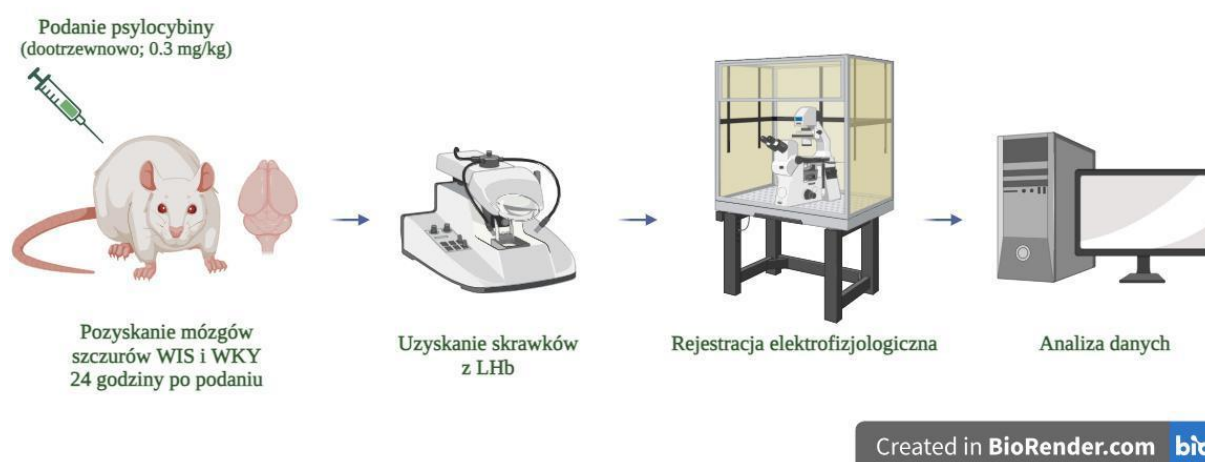
Rycina 7.19. Ekspresja genu *Grin2a* w bocznym jądrze uzdeczki (A), środkowym jądrze uzdeczki (B), środkowej korze przedczołowej (C), jądrze grzbietowym szwu (D), brzuszным polu nakrywki (E) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 4 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg. Wyniki uzyskano dla 5-9 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną ± SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste koło dla szczurów WIS, pełne koło dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole zielonych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki; mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki

Podsumowując, szczury WKY charakteryzują się istotnie wyższą ekspresją genu *Grin2a* w LHb i MHb w porównaniu do szczurów WIS, co może odzwierciedlać zwiększoną aktywność

glutaminianergiczną w tych strukturach. Natomiast bez różnic w ekspresji w mPFC, DR i VTA. Co ciekawe, podanie psylocybiny spowodowało istotne obniżenie ekspresji *Grin2a* w MHb u szczurów WKY, co może również stanowić kolejny potencjalny cel molekularny leżących u podstaw przeciwdepresyjnego działania psylocybiny.

7.10. Badania elektrofizjologiczne przepływu prądu dokomórkowego przez kanały GIRK w komórkach bocznego jądra uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny

Na podstawie wcześniejszych analiz molekularnych, które wskazały na istotną rolę kanału GIRK4 w LHb oraz sugerowały potencjalne działanie przeciwdepresyjne psylocybiny, przeprowadzono badania elektrofizjologiczne metodą *whole-cell patch clamp*. Celem było określenie wpływu psylocybiny na udział kanałów GIRK4 w przewodnictwie błonowym neuronów LHb. Schemat eksperymentu przedstawiono na rycinie 7.20.

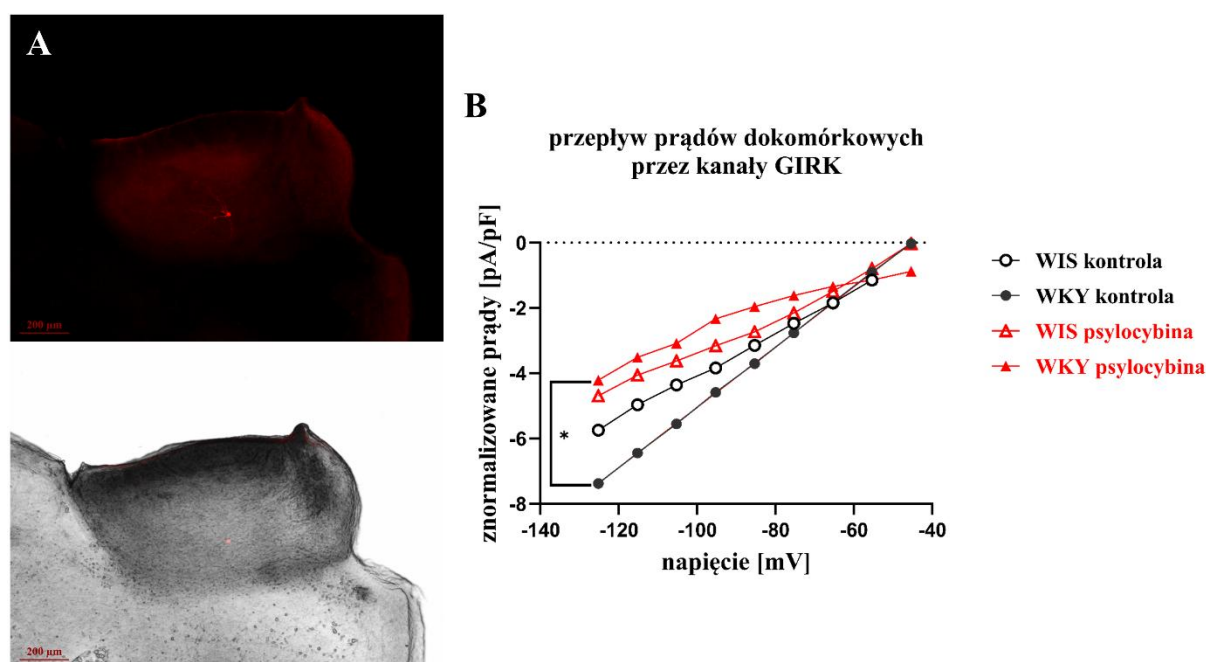


Rycina 7.20. Schemat przebiegu badania elektrofizjologicznego udziału kanałów GIRK4 w bocznym jądrze uzdeczki 24 godziny po podaniu psylocybiny u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki. Rycina została wykonana przy użyciu oprogramowania BioRender (<https://biorender.com>)

Badanie przeprowadzono na szczurach WIS i WKY. Zwierzęta kontrolne otrzymały roztwór soli fizjologicznej, natomiast grupa doświadczalna – pojedynczą dawkę psylocybiny (0,3 mg/kg). Rejestracja elektrofizjologiczna obejmowała trzy etapy:

1. pomiar w ACSF w celu określenie podstawowego poziomu przepływu prądu;
2. pomiar przy zwiększonym stężeniu jonów potasu w ACSF w celu aktywacji kanałów GIRK;
3. pomiar z zastosowaniem blokera kanałów GIRK – w tym przypadku Tertiapin-Q – w celu określenia udziału kanałów GIRK4 w zarejestrowanym prądzie.

Tertiapin-Q, będący stabilizowanym analogiem naturalnego peptydu pszczelego, zastosowano jako farmakologiczny bloker kanałów GIRK (Kir3.x), gdyż wykazuje on wysokie powinowactwo do kanałów Kir1.1 (ROMK1) oraz heterotetramerów GIRK1/4 (Kir3.1/3.4), z wartościami K_i odpowiednio 1.3 nM i 13.3 nM (tocris.com, tertiapin-q). Mimo braku całkowitej selektywności względem GIRK4 (Kir3.4), w dostępnych warunkach doświadczalnych był to najskuteczniejszy funkcjonalny bloker kompleksów zawierających podjednostkę GIRK4.



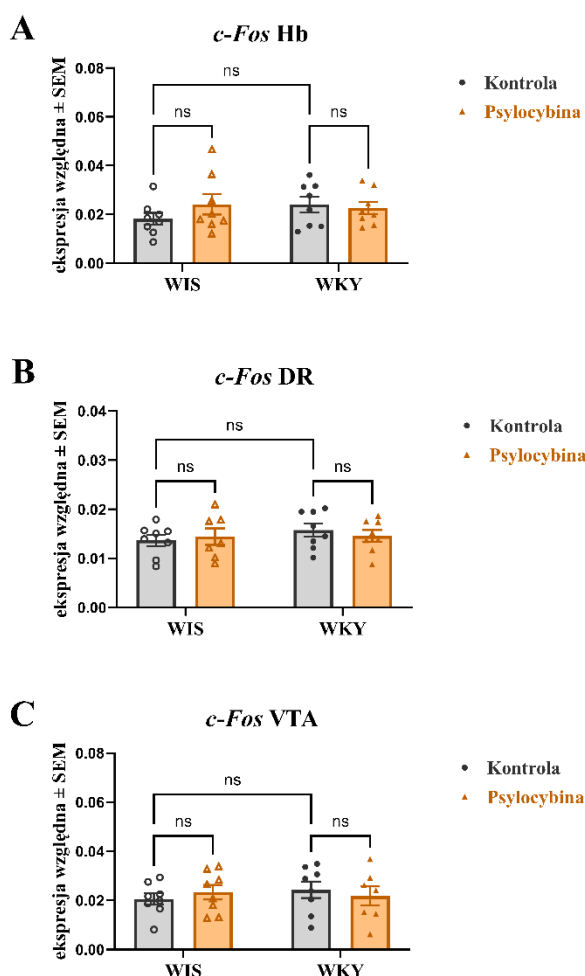
Rycina 7.21. Przepływ prądów dokomórkowych przez kanały GIRK w komórkach bocznego jądra uzdeczki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 24-godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. **A)** Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające lokalizacje rejestrowanych komórek w bocznym jądrze uzdeczki po barwieniu immunofluorescencyjnym. **B)** Wykres przedstawiający średnie wartości znormalizowanych prądów (pA/pF) przy zadanym napięciu (mV). Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbol pustego czarnego kółka dla szczurów WIS i pełnego czarnego kółka dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbol pustego czerwonego trójkąta dla szczurów WIS i pełnego czerwonego trójkąta dla szczurów WKY. Analizę danych przeprowadzono metodą regresji liniowej dla każdej z grupy osobno. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako $*p < 0.05$. WIS – Wistar Han; WKY – Wistar Kyoto. Eksperyment przeprowadzony przez mgr Patryka Sambaka (współpraca z Uniwersytetem Jagiellońskim i dr hab. Anną Błasiak, prof. UJ)

Ostateczne wyniki pomiarów prądów przepływających przez kanały GIRK przedstawiono na rycinie 7.21B. Przepływ rejestrowanego prądu został znormalizowany poprzez podzielenie wartości prądu przez pojemność komórki. Przewodnictwo kanałów GIRK oceniano na podstawie nachylenia regresji liniowej w każdej grupie. Porównanie współczynników regresji umożliwiło ocenę wpływu szczepu oraz działania psylocybiny. Pomimo że wcześniejsze analizy molekularne sugerowały zwiększony przepływ prądu u kontrolnych szczurów WKY (rycina 7.12 i 7.13), uzyskane pomiary elektrofizjologiczne tego nie potwierdziły. Co istotne, podanie psylocybiny istotnie zmniejszyło przepływ prądu przez kanały GIRK w LHb u szczurów WKY w porównaniu do grupy kontrolnej WKY ($F(1,149)=5.135$; $p=0.0249$) (rycina 7.21B).

7.11. Ekspresja genu wczesnej odpowiedzi komórkowej – *c-Fos* w uzdeczce, jądrze grzbietowym szwu i brzusznyemu polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny

W celu zbadania aktywacji neuronalnej wywołanej psylocybiną postanowiono sprawdzić poziom ekspresji genu *c-Fos*, stanowiący gen wczesnej odpowiedzi (ang. *Immediate Early Gene*, IEG), którego ekspresja ulega przejściowemu wzrostowi w odpowiedzi na bodźce prowadzące do aktywacji komórek nerwowych. Chociaż szczyt ekspresji *c-Fos* występuje zazwyczaj w ciągu 1–2 godzin od stymulacji, wykazano, że niektóre substancje mogą wywoływać również długofalowe zmiany w ekspresji tego genu. Analiza przeprowadzona po 24 godzinach miała na celu wykrycie potencjalnych, trwałych efektów działania psylocybiny na aktywność neuronalną, które mogą mieć znaczenie dla jej mechanizmów przeciwdepresyjnych.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Tukeya nie wykazała istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu *c-Fos* w Hb, DR oraz VTA pomiędzy dwoma szczepami WIS i WKY (rycina 7.22A, 7.22B, 7.22C). Ponadto, jednorazowe podanie psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg nie wywołało istotnych zmian w ekspresji *c-Fos* w analizowanych strukturach mózgowych po 24 godzinach od podania (rycina 7.22A, 7.22B, 7.22C).



Rycina 7.22. Ekspresja genu *c-Fos* w uzdeczce (A), jądrze grzbietowym szwu (B), brzuszny polu nakrywki (C) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 24 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. Wyniki uzyskano dla 7-8 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole pomarańczowych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; Hb – *habenula*, uzdeczka; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki

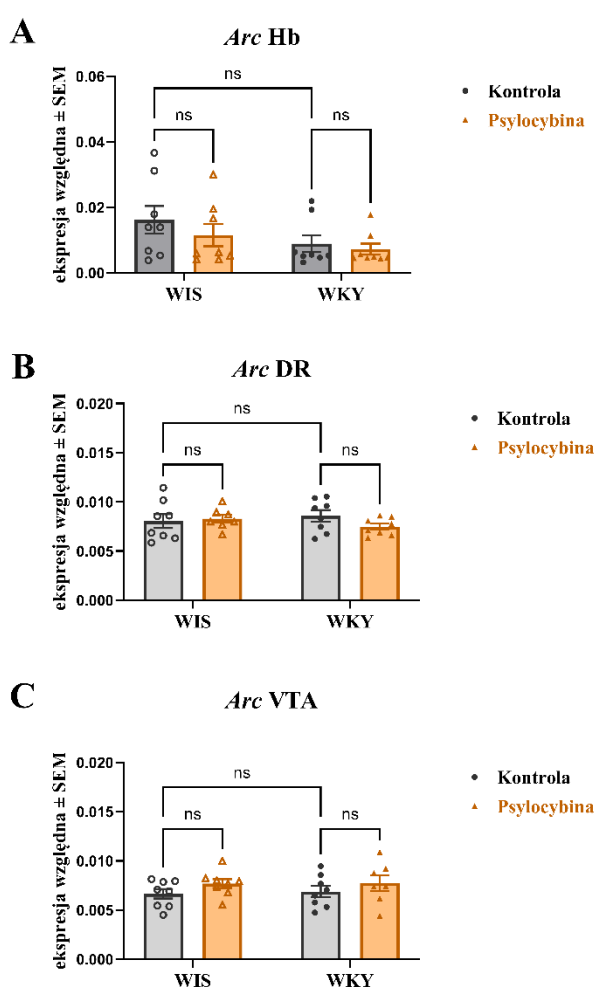
Podsumowując, jednorazowe podanie psylocybiny nie spowodowało istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *c-Fos* w żadnej z analizowanych struktur mózgowych po upływie 24 godzin od podania. Wynik ten sugeruje, że efekt działania psylocybiny nie wiąże się z długotrwałą aktywacją neuronalną mierzoną poziomem *c-Fos*.

7.12. Ekspresja genów będących markerami plastyczności synaptycznej – *Arc* i *Psd95* w uzdeczce, grzbietowym jądrze szwu i brzuszny polu nakrywki u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto 24 godziny po podaniu psylocybiny

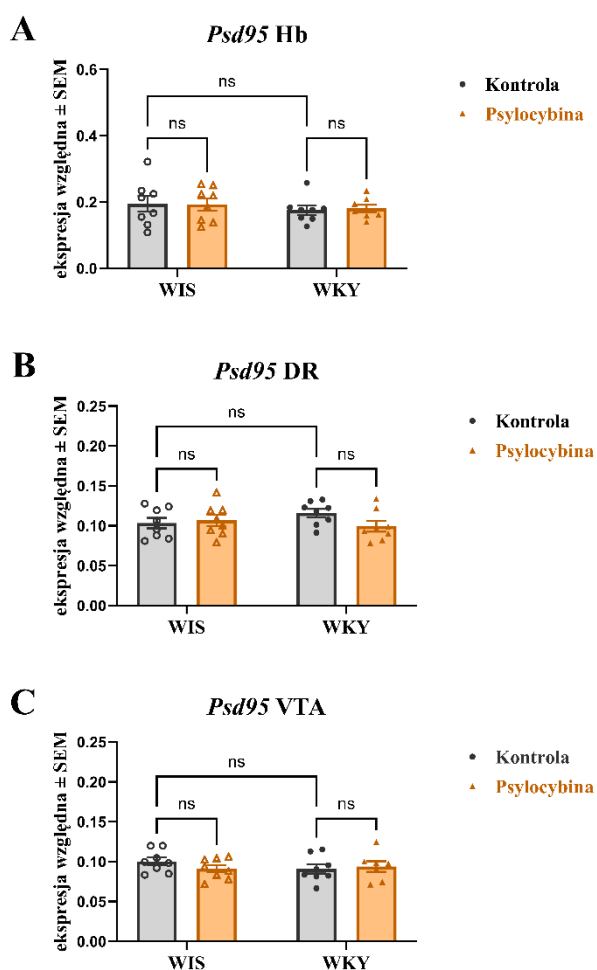
W celu zbadania potencjalnych zmian w plastyczności synaptycznej wywołanych psylocybiną postanowiono sprawdzić poziom ekspresji genów *Arc* i *Psd95*. Geny *Arc* oraz *Psd95* kodują białka odgrywające istotną rolę w regulacji plastyczności synaptycznej i konsolidacji pamięci. Ich ekspresja jest indukowana przez aktywność neuronalną, a zmiany w ich poziomie mogą występować już w ciągu pierwszych godzin po stymulacji. W związku z tym, pomiar ekspresji tych genów 24 godziny po podaniu psylocybiny umożliwia ocenę

szybkich, potencjalnie adaptacyjnych zmian synaptycznych, które mogą leżeć u podstaw wczesnych efektów neuroplastycznych wywoływanych przez tą substancję.

Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wraz z testem post hoc Tukeya nie wykazała istotnych statystycznie różnic w ekspresji gen *Arc* i *Psd95* w Hb, DR oraz VTA pomiędzy dwoma szczepami WIS i WKY (rycina 7.23 i rycina 7.24). Ponadto, jednorazowe podanie psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg nie wywołało istotnych zmian w ekspresji *Arc* i *Psd95* w analizowanych strukturach mózgowych po 24 godzinach od podania (rycina 7.23 i rycina 7.24).



Rycina 7.23. Ekspresja genu *Arc* w uzdeczce (A), jądrze grzbietowym szwu (B), brzuszным polu nakrywki (C) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 24 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. Wyniki uzyskano dla 7-8 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną ± SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste koło dla szczurów WIS, pełne koło dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole pomarańczowych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; Hb – *habenula*, uzdeczka; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki



Rycina 7.24. Ekspresja genu *Psd95* w uzdeczce (A), jądrze grzbietowym szwu (B), brzuszным polu nakrywki (C) u szczurów Wistar Han i Wistar Kyoto po 24 godzinach od jednokrotnego podania psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg masy ciała. Wyniki uzyskano dla 7-8 zwierząt na grupę i przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Grupy kontrolne (podanie roztworu soli fizjologicznej) przedstawiono jako symbole szarych kółek: puste kółko dla szczurów WIS, pełne kółko dla szczurów WKY. Grupy doświadczalne (podanie psylocybiny) przedstawiono jako symbole pomarańczowych trójkątów: puste trójkąty dla szczurów WIS, pełne trójkąty dla szczurów WKY. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. ns – nieistotne statystycznie; WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; Hb – *habenula*, uzdeczka; DR – *Dorsal Raphe Nucleus*, jądro grzbietowe szwu; VTA – *Ventral Tegmental Area*, brzuszne pole nakrywki

Podsumowując, zarówno ekspresja genu *Arc*, jak i *Psd95* nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy szczepami WIS i WKY w żadnej z analizowanych struktur mózgowych (Hb, DR, VTA). Co więcej, jednorazowe podanie psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg nie wpłynęło na poziom ekspresji tych genów po upływie 24 godzin. Wyniki te sugerują, że ani predyspozycja genetyczna do fenotypu TRD, ani działanie psylocybiny nie oddziałują na regulację ekspresji *Arc* i *Psd95* w tych regionach mózgu w analizowanym czasie.

8. Dyskusja

Badania przeprowadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej rozpoczęto od analizy zmian na poziomie mikroRNA, ponieważ cząsteczki te odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, kontrolując poziomy docelowych mRNA. W porównaniu z pełnym transkryptomem, liczba znanych mikroRNA jest relatywnie mniejsza, co czyni je dogodnym punktem wyjścia w poszukiwaniu potencjalnych markerów zmienności związanej z zaburzeniami psychicznymi. Takie podejście pozwala nie tylko na uchwycenie szerszego kontekstu molekularnego, ale także stanowi solidną podstawę do dalszych analiz, szczególnie w obszarze poszukiwania nowych celów terapeutycznych i biomarkerów depresji (Kaurani, 2024).

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotne różnice w ekspresji siedmiu miRNA pomiędzy szczurami WKY, które są zwierzęcym modelem TRD, a szczepem kontrolnym – szczurami Wistar – w obu jądrach Hb. miR-708-5p wyróżniał się spójnym wzorcem podwyższonej ekspresji zarówno w LHb, jak i MHb u szczurów WKY. Jak wynika z wcześniejszych badań, miR-708-5p odgrywa istotną rolę w odpowiedzi na stres i może pełnić funkcję biomarkera zaburzeń nastroju. Zwiększoną ekspresję miR-708-5p obserwowano w PFC oraz hipokampie w modelach stresu społecznego i izolacji społecznej (Chen i wsp., 2015; Gilardi i wsp., 2025). Co więcej, obecność w krwi obwodowej pacjentów z wysokim ryzykiem rozwoju zaburzeń afektywnych sugeruje na potencjalne zastosowanie tego miRNA w diagnostyce (Gilardi i wsp., 2025). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z tymi doniesieniami, wspierając hipotezę o udziale miR-708-5p w patogenezie depresji poprzez modulację aktywności struktur limbicznych, w tym Hb.

Kolejnym istotnym miRNA, którego ekspresja była zróżnicowana w badanych strukturach, jest miR-133a-3p. U szczurów WKY w LHb jego poziom był podwyższony, natomiast w MHb – obniżony. Taki dwukierunkowy wzorec sugeruje regionowo specyficzne funkcje regulacyjne tego miRNA. Zmniejszoną ekspresję miR-133a-3p wcześniej obserwowano w PFC pacjentów z chorobą dwubiegunową (Azevedo i wsp., 2017), natomiast jego wzrost wiązano z zaburzeniami lękowymi (Jurkiewicz i wsp., 2020). Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu są zgodne z tymi obserwacjami, sugerując, że zmiany ekspresji miR-133a-3p w różnych obszarach mózgu mogą odzwierciedlać złożoność fenotypu depresyjno-lękowego. Co więcej, zarówno miR-133a-3p, jak i miR-92a-3p, którego obniżoną ekspresję stwierdzono w LHb u WKY, zostały wcześniej zidentyfikowane jako obwodowe biomarkery depresji poudarowej (Zhang i wsp. 2016; He i wsp., 2017). Równoczesne zmiany ekspresji miR-133a-3p i miR-92a-3p w

LHb, a także ich wcześniejsze powiązania z zaburzeniami nastroju w kontekście biomarkerów obwodowych, mogą wskazywać na ich możliwy współdział w patofizjologii depresji. Niemniej, aby określić charakter ich potencjalnego działania, konieczne są dalsze badania.

Ekspresja miR-92a-3p jest szczególnie interesująca ze względu na szerokie powiązania z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera i Parkinsona (Siedlecki-Wullich i wsp., 2019; Taguchi i Wang, 2018), a także ze schizofrenią (Ma i wsp., 2018). W modelach stresu obserwowano zarówno zwiększoną, jak i zmniejszoną ekspresję tego miRNA, co sugeruje jego kontekstowo zależną regulację (Munoz-Llanos i wsp., 2018; Ji i Zhao, 2023). Uzyskane w niniejszym badaniu obniżenie poziomu miR-92-3p w LHb u szczurów WKY może odzwierciedlać zaburzenia równowagi molekularnej w obrębie układu limbicznego, charakterystyczne dla TRD.

Podwyższona ekspresja miR-203a-3p i miR-674-3p w MHb szczurów WKY jest zgodna z wcześniejszymi badaniami wskazującymi na ich udział w odpowiedzi na stres. Wzrost poziomu miR-203a-3p obserwowano w hipokampie w modelu przewlekłego nieprzewidywalnego łagodnego stresu (ang. *Chronic Unpredictable Mild Stress*, CUMS) (Kavuran Buran i wsp., 2022), co sugeruje jego możliwą rolę adaptacyjnych mechanizmach odpowiedzi mózgu na przewlekły stres. Z kolei miR-674-3p, którego ekspresja była podwyższona w ciele migdałowatym oraz surowicy w zwierzęcym modelu PTSD (Balakathiresan i wsp., 2014), a także u ludzi cierpiących na PTSD (Lee i wsp., 2019), może pełnić funkcję wskaźnika podatności na rozwój zaburzeń stresowych. Co istotne, nasze wcześniejsze badania również wykazały regionowo zróżnicowaną regulację tego miRNA w układzie nagrody w modelu CMS, co potwierdza jego istotną rolę w odpowiedzi na przewlekły stres (Zurawek i wsp., 2016).

Odmienny kierunek zmian zaobserwowano dla miR-182 i miR-449a-5p, których ekspresja była obniżona u szczurów WKY. Wcześniejsze badania wskazują, że miR-182 odgrywa dwoistą rolę – jego podwyższona ekspresja w hipokampie wiązała się ze zmniejszeniem objawów depresyjnych i obniżeniem poziomu BDNF oraz CREB1 (Li i wsp., 2016), podczas gdy w innych modelach jego wyciszenie łagodziło objawy depresyjne (Zheng i wsp., 2024). Obniżony poziom tego miRNA w LHb może zatem wskazywać na mechanizmy kompensacyjne lub na odmienną, regionowo specyficzną funkcję. Podobnie, miR-449a-5p – dotychczas kojarzony z odpowiedzią przysadki na stres (Nemoto i wsp., 2013) i obecny we krwi obwodowej pacjentów ze schizofrenią (Lai i wsp., 2016) – może mieć znaczenie w

modulacji osi HPA oraz systemów monoaminergicznych, szczególnie w kontekście przewlekłej ekspozycji na stres.

Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają zróżnicowaną regulację miRNA w obu jądrach Hb w TRD. Analiza ekspresji poszczególnych miRNA, w kontekście wcześniejszych doniesień literaturowych, sugeruje, że obserwowane zmiany odzwierciedlają złożone mechanizmy molekularne związane z przetwarzaniem emocji, odpowiedzią na stres oraz regulacją osi HPA. Wyniki te podkreślają potencjał miRNA jako celów terapeutycznych i biomarkerów depresji, a także wskazują na konieczność dalszych badań funkcjonalnych nad ich rolą w specyficznych obszarach mózgu.

Biorąc pod uwagę, że miRNA wpływają na stabilność i translację mRNA, przeprowadzono analizę transkryptomiczną, aby zbadać potencjalne konsekwencje obserwowanych zmian w ekspresji miRNA. Analiza ta wykazała większe zróżnicowanie ekspresji genów w LHb pomiędzy szczurami szczepów WIS i WKY. Osiem genów różnicowało szczury WKY od WIS w LHb, natomiast cztery geny wykazywały różnice w obrębie MHb. Obniżony poziom ekspresji genu dla receptora serotoninowego 5-HT7 i kanału chlorkowo-potasowego KCC2 u szczurów WKY był wspólny dla obu jąder Hb. Oba jądra charakteryzowały się odmiennym profilem ekspresji genów zależnych od białka G prostowniczych kanałów potasowych GIRK. W obrębie MHb zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genu *Kcnj9*, kodującego kanał GIRK3, natomiast w LHb – zwiększoną ekspresję genu *Kcnj5*, kodującego kanał GIRK4, w LHb. Dodatkowo w MHb zaobserwowano obniżenie ekspresji genu *Cdkn1c* kodującego inhibitor kinazy zależnej od cyklin 1C. W LHb odnotowano natomiast zmiany ekspresji aż trzech genów dla receptorów serotoninowych: obniżenie poziomu 5-HT2a i 5-HT7, oraz wzrost ekspresji 5-HT4. Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję genu dla receptora dopaminowego D2 oraz receptora somatostatyny typu 4, oraz spadek ekspresji genu czynnika transkrypcyjnego Elk4.

Kotransporter potasowo-chlorkowy KCC2 odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu niskiego stężenia jonów chlorkowych (Cl^-) wewnątrz neuronów, co jest niezbędne do powstawania hiperpolaryzacyjnych, hamujących potencjałów postsynaptycznych zależnych od jonotropowych receptorów GABA_A i receptorów glicyny (GlyR). Jego funkcja zależy zarówno od poziomu ekspresji na powierzchni komórki jak i efektywności transportu, które są precyzyjnie regulowane przez mechanizmy fosforylacji, umożliwiające szybkie i łatwo odwracalne zmiany aktywności transportera (Kahle i wsp., 2013). Zaburzenia w ekspresji i

funkcjonowaniu KCC2, prowadzące do utraty lub osłabienia hamującego działania GABA i zwiększenia pobudliwości neuronów, zostały wykazane w różnych stanach patologicznych, m.in. w padaczce (Barmashenko i wsp., 2011), urazach mózgu (Bonislowski i wsp., 2007) czy niedokrwieniu mózgu (Papp i wsp., 2008). Wykazano również, że zaburzenia funkcji KCC2 w obszarach związanych z przetwarzaniem emocji mogą sprzyjać rozwojowi objawów depresyjnych (MacKenzie i Maguire, 2015). Wzmożona aktywność neuronów w jądrach Hb została wykazana zarówno w zwierzęcych modelach depresji jak i u pacjentów z depresją (Yang i wsp., 2018). Obniżona ekspresja KCC2 w obu jądrach Hb u szczurów WKY może prowadzić do zwiększonej aktywności neuronów w tej strukturze i stanowić jedno z możliwych wyjaśnień ich depresyjnego fenotypu. Coraz więcej dowodów wskazuje, że zmiany w homeostazie chlorkowej stanowią fizjologiczną odpowiedź regulacyjną. Wykazano, że ostry stres związany z unieruchomieniem oraz wczesne doświadczenia stresowe prowadzą do obniżenia ekspresji KCC2 w jądrze przykomorowym podwzgórza (ang. *Paraventricular Nucleus*, PVN), co wynika z defosforylacji reszty serynowej 940 (S940). Zmiany te prowadzą do załamania gradientu chlorkowego w neuronach, depolaryzującego działania GABA oraz aktywacji osi HPA (Sarkar i wsp., 2011). Ponieważ stres jest jednym z głównych czynników prowadzących do dysregulacji osi HPA, a KCC2 odgrywa rolę w GABA-ergicznnej regulacji neuronów uwalniających hormon uwalniający kortykotropinę (ang. *Corticotropin-Releasing Hormone*, CRH) w PVN – strukturze kluczowej dla uruchamiania fizjologicznej odpowiedzi organizmu na stres (Hewitt i wsp. 2009) – można przypuszczać, że transporter ten odgrywa istotną rolę w patofizjologii depresji. Ponadto wykazano, że aktywność Hb również jest regulowana przez działanie osi HPA. Wykazano, że CRH zwiększa pobudliwość neuronów LHb oraz osłabia transmisję GABAergiczną skierowaną na te neurony (Authement i wsp., 2018). Co istotne, zaburzenia funkcjonowania transportera KCC2 zostały powiązane z mechanizmami oporności na leczenie (Kadam i Hegarty, 2024). Wykazano, że zwiększenie lub przywrócenie ekspresji bądź aktywności KCC2 może nie tylko przywracać skuteczność, ale także wydłużać okno terapeutyczne leków przeciwdrgawkowych i przeciwbólowych pierwszego rzutu (Li i wsp., 2016; Sullivan i wsp., 2021). Co istotne, interwencje farmakologiczne prowadzące do zwiększenia poziomu KCC2 poprawiają skuteczność leków przeciwdrgawkowych, takich jak benzodiazepiny i kwas walproinowy, a także poprawiają efektywność działania selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny, morfiny oraz antagonistów receptora NMDA w zwierzęcych modelach chorób neurologicznych i bólowych (Li i wsp., 2020; Aby i wsp., 2022; Shi i wsp., 2023). Obniżona ekspresja mRNA

kodującego KCC2, oraz spadek poziomu białka w obu jądrach Hb u szczurów WKY, mogą przyczyniać się zarówno do ich fenotypu depresyjnego jak i oporności na działanie klasycznych leków przeciwdepresyjnych.

Dysregulacja układu serotonergicznego jest powszechnie wiązana z patofizjologią depresji. Neurony LHb wysyłają projekcje do DR i MnR, a także otrzymują od nich sygnały zwrotne. Wzajemna komunikacja z neuronami serotonergicznymi odgrywa istotną rolę w modulacji aktywności układu serotonergicznego. mPFC, zaangażowana w regulację emocji, również wysyła projekcje neuronalne do DR, co sprawia, że oba te szlaki odgrywają istotną rolę w przetwarzaniu informacji związanych z regulacją nastroju. Projekcje z mPFC i LHb mogą aktywować lokalne neurony GABAergiczne w DR, prowadząc do zahamowania aktywności neuronów serotonergiczych. Połączenia te są szczególnie istotne w kontekście roli serotoniny w przewidywaniu bodźców awersyjnych i hamowaniu reakcji behawioralnych. Dysfunkcja sygnalizacji serotonergicznej uznawana jest za jeden z kluczowych mechanizmów rozwoju zaburzeń depresyjnych (Proulx i wsp., 2014). Obniżony poziom ekspresji receptora serotoninowego 5-HT₇ w obu jądrach Hb wykazano u szczurów WKY. Dodatkowo w LHb zaobserwowano zmniejszony poziom transkryptu dla receptora 5-HT_{2A} oraz zwiększoną ekspresję genu dla receptora 5-HT₄. Zmiany te mogą odzwierciedlać istotne zaburzenia w modulacji sygnałów serotonergiczych w tej strukturze i przyczyniać się do zakłóconego przetwarzania bodźców awersyjnych oraz regulacji nastroju u szczurów WKY. Receptor 5-HT_{2A} stanowi kluczowy element sygnalizacji serotonergicznej, zaangażowany m.in. w regulację plastyczności synaptycznej, lęku oraz działania substancji psychodelicznych. Wykazano, że serotonina moduluje transmisję glutaminianergiczną w LHb z wyraźną dominacją roli receptorów 5-HT_{2A}. Podanie antagonisty tego receptora osłabia uwalnianie glutaminianu, podczas gdy zastosowanie agonisty lub inhibitora wychwytu zwrotnego serotoniny ułatwia transmisję glutaminianergiczną w neuronach LHb (Xie i wsp., 2016). Obniżona ekspresja 5-HT_{2A} w LHb u szczurów WKY może zatem prowadzić do ograniczenia zdolności modulacji aktywności neuronalnej w odpowiedzi na serotonergiczne sygnały związane z przetwarzaniem emocji i stresu. Z kolei receptor 5-HT₇ pełni istotną rolę w regulacji nastroju, plastyczności synaptycznej oraz rytmów okołodobowych (Crispino i wsp., 2020). Obniżona ekspresja 5-HT₇ w jądrach Hb u szczurów WKY może wskazywać na zmienioną odpowiedź serotoninową w mózgu. Natomiast badania pokazują, że zwierzęta pozbawione ekspresji receptora 5-HT_{7R}, jak i farmakologiczna blokada 5-HT_{7R}, wywołują efekt przeciwdepresyjny w zwierzęcych modelach depresji (Guscott i wsp., 2005; Wesołowska i

wsp., 2007). Co ciekawe wykazano, że aktywacja receptora 5-HT7 zwiększa pobudliwość komórek piramidowych CA1 (Siwiec i wsp., 2020), co sugeruje, że jego obniżona ekspresja u szczurów WKY może stanowić kolejny mechanizm kompensacyjny nadmiernej aktywności Hb. Co interesujące, doniesienia wskazują, że agoniści receptorów serotoninowych 5-HT2A i 5-HT7 mogą zwiększać ekspresję KCC2, co przyczynia się do przywrócenia hamowania neuronalnego po urazie rdzenia kręgowego (Gackière i wsp., 2014). Wykazano również, że aktywacja 5-HT2A zwiększa fosforylację KCC2, szczególnie w pozycji S940, co normalizuje funkcję transportera chlorkowego i przywraca hamowanie endogenne. Szlak ten jest zależny od sygnalizacji kinazy białkowej C, a jego zablokowanie uniemożliwia odwrócenie zaburzeń (Kimmey i wsp., 2019). Z tego względu interakcje pomiędzy układem serotonergicznym a ekspresją KCC2, mogą mieć istotne znaczenie w kontekście TRD. Uzyskane wyniki sugerują, że obniżenie ekspresji zarówno KCC2, jak i receptora 5-HT7 w Hb szczurów WKY może zaburzać hamowanie neuronalne w tym kluczowym ośrodku emocjonalnym, stanowiąc jeden z potencjalnych mechanizmów ich depresyjnego, lekoopornego fenotypu.

W przeciwieństwie do wcześniej omówionych receptorów serotoninowych, receptor 5-HT4 wykazywał podwyższoną ekspresję w LHb szczurów WKY. Receptor ten znany jest z działania pobudzającego wynikającego ze sprzężenia z białkiem Gs i aktywacji cykazy adenylanowej (Hagena i Manahan-Vaughan, 2017). Zwiększona ekspresja 5-HT4 może zatem sprzyjać nadaktywności LHb, prowadząc do przesunięcia równowagi pobudzeniowo–hamującej w kierunku nadaktywności. Taka zmiana może nasilać awersyjne przetwarzanie bodźców oraz tłumić działanie szlaków nagrody, co wpisuje się w obserwowaną anhedonię i unikanie zachowań eksploracyjnych u szczurów WKY. Co interesujące, w modelu hemiparkinsonizmu (szczury 6_OHDA; ang. *hemiparkinsonian rats*), aktywacja lub blokada receptorów 5-HT4 w LHb wywierała działanie przeciwdepresyjne oraz przywracała równowagę monoamin (dopaminy i serotoniny) w mPFC, hipokampie i LHb (Guo i wsp., 2021). Zwiększona ekspresja tego receptora u szczurów WKY może być również interpretowana jako jeden z czynników leżących u podstaw ich fenotypu depresyjnego – szczególnie w kontekście badań Vidala i wsp. (2010, 2014), którzy wykazali, że przewlekłe podawanie leków przeciwdepresyjnych, takich jak fluoksetyna, paroksetyna i wenlafaksyna (ale nie reboksetyna), prowadziło do obniżenia gęstości receptorów 5-HT4 w mózgu szczura.

Analiza molekularna wykazała istotnie zwiększoną ekspresję genu *Kcnj5* w LHb oraz znacząco obniżony poziom *Kcnj9* w MHb u szczurów WKY. Gen *Kcnj5* koduje białko GIRK4, natomiast gen *Kcnj9* koduje białko GIRK3. Oba te białka należą do rodziny prostowniczych

kanałów potasowych sprzężonych z białkiem G, które odgrywają kluczową rolę w hamowaniu neuronalnym, poprzez regulację spoczynkowego potencjału błonowego oraz modulację odpowiedzi neuronów na sygnały pochodzące z receptorów metabotropowych. Aktywacja kanałów GIRK prowadzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej, co ogranicza generowanie potencjałów czynnościowych i tłumi aktywność neuronalną (Luo i wsp., 2022). Nadekspresja *Kcnj5* w LHb może sugerować kompensacyjne zwiększenie ilości kanałów GIRK4 w odpowiedzi na nadmierną aktywność tej struktury. Wykazano, że bodziec awersyjny, taki jak ekspozycja na szok elektryczny, prowadzi do nadaktywności LHb, czemu towarzyszy wzmożona aktywność fosfatazy PP2A i internalizacja GABA_BR-GIRK. Farmakologiczne zahamowanie PP2A wykazuje działanie przeciwdepresyjne – przywraca funkcję GABA_BR-GIRK i normalizuje pobudliwość LHb (Lecca i wsp., 2016). Potencjalnie zaburzony proces internalizacji tych kompleksów u szczurów WKY, może powodować zwiększenie ekspresji *Kcnj5*, natomiast większa liczba kanałów nie przekłada się na funkcjonalną aktywność hamującą i obserwowany fenotyp depresyjny. Z kolei obniżona ekspresja *Kcnj9* w MHb u szczurów WKY może osłabiać mechanizmy skutecznego hamowania neuronalnego w szlaku MHb–IPN, co również może wspierać utrwalenie fenotypu depresyjno-awersyjnego. Analogiczny mechanizm został opisany w modelu uzależnienia od alkoholu, gdzie brak GIRK3 w VTA prowadził do zwiększonej konsumpcji alkoholu i nasilonej aktywności dopaminergicznej (Mitten i wsp., 2025). To pokazuje, że sprawność układu hamującego GIRK w Hb może być kluczowym czynnikiem prawidłowego utrzymania równowagi neuroprzekątnictwa i regulacji zachowania.

Jedną z funkcji LHb jest regulacja układu nagrody oraz jego odwrotna zależność funkcjonalna względem układu dopaminergicznego. Neurony LHb uczestniczą w przetwarzaniu tzw. błędu przewidywania nagrody (ang. *Reward Prediction Error*, RPE), a część ich sygnałów przekazywana jest do neuronów dopaminergicznych śródmózgowia. Neurony te są pobudzane w odpowiedzi na pozytywny RPE i hamowane przez negatywny RPE. Interakcja pomiędzy LHb a układem dopaminergicznym zachodzi głównie za pośrednictwem RMTg, które składa się z neuronów GABAergicznym o działaniu hamującym (Jhou i wsp., 2009). Zwiększona aktywacja szlaku LHb – neurony dopaminergiczne prowadzi do obniżenia aktywności dopaminergicznej, co przejawia się w zachowaniach takich jak unikanie sytuacji awersyjnych lub ryzykownych, niechęć do eksploracji oraz brak motywacji do podejmowania wymagających działań. Zmiany te, zarówno na poziomie poznawczym, jak i behawioralnym, mogą odzwierciedlać objawy charakterystyczne dla zaburzeń depresyjnych (Russo i Nestler,

2013). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że szczury WKY charakteryzowały się istotnie zwiększoną ekspresją receptora dopaminowego D2 w LHb. Receptory D2 należą do grupy receptorów sprzężonych z białkiem Gi/o, których aktywacja prowadzi do obniżenia poziomu cAMP oraz hiperpolaryzacji błony komórkowej, co skutkuje zahamowaniem aktywności neuronalnej (Zhao i wsp., 2022). W kontekście LHb nadmierna ekspresja receptora D2 może pełnić funkcję mechanizmu kompensacyjnego, mającego na celu przeciwdziałanie nadmiernej aktywności tej struktury. Co więcej, wzrost ekspresji receptora dopaminowego D2, w warunkach hipodopaminergii, czyli obniżonego uwalniania dopaminy – co jest obserwowane w depresji (Lambert i wsp., 2000) – może prowadzić do nieskutecznego tłumienia aktywności neuronów, a tym samym do utrwalenia negatywnego stanu behawioralnego (Meye i wsp. 2013). Utrzymująca się nadekspresja receptora D2 w LHb, przy jednoczesnym obniżonym poziomie dopaminy, może nasilać symptomy depresyjne, takie jak anhedonia, unikanie zachowań eksploracyjnych oraz obniżoną motywację.

W obrębie LHb wykazano obniżoną ekspresję genu *Elk4* kodującego białko Elk-4 (białko zawierające domenę ETS) będące czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny Ets. Elk-4 tworząc kompleks z białkiem SRF (ang. *Serum Response Factor*) wiąże się z fragmentem SRE (ang. *Serum Response Element*) w promotorze genu *c-Fos* i reguluje jego transkrypcję. *C-Fos* jest IEG, który jest aktywowany w odpowiedzi na różne bodźce, np. stres, hormony, czynniki wzrostu czy neuroprzekazniki (Buchwalter i wsp., 2004). Obniżona ekspresja Elk-4 u szczurów WKY może wskazywać na zaburzoną aktywację genu *c-Fos*, prowadzącą do osłabionej reaktywności neuronów LHb. Może to ograniczać zdolność adaptacyjną tych neuronów wobec bodźców emocjonalnych i stresogennych. W modelu niedotlenienia przerywanego u myszy, obniżona ekspresja Elk-4 wiązała się z nasileniem stresu oksydacyjnego, wzrostem produkcji cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF- α) oraz zaburzeń funkcji poznawczych. Co istotne, zwiększenie poziomu Elk-4 prowadziło do zmniejszenia neurozapalenia, wzrostu poziomu czynników przeciwzapalnych (IL-10, TGF- β 1) i neuroprotekcynowego czynnika BDNF (Yang i wsp., 2024). Można przypuszczać, że obniżony poziom Elk-4 w LHb u szczurów WKY może sprzyjać lokalnej dysregulacji mikrośrodowiska neuronalnego poprzez nasilenie procesów zapalnych i stresu oksydacyjnego. Dodatkowo wykazano, że Elk-4 pełni istotną rolę w utrzymaniu integralności bariery krew-mózg. Jej dysfunkcja, wynikająca z obniżonej ekspresji Elk-4, skutkuje zwiększoną przepuszczalnością tej bariery, co może sprzyjać rozwojowi stanu zapalnego w mózgu (Liu i wsp., 2020). W strukturach takich jak LHb, szczególnie podatnych na wpływy środowiskowe, może to prowadzić do trwałej aktywacji mikrogleju i przewlekłej

reakcji zapalnej, pogłębiającej nadaktywność i patologiczną sygnalizację neuronalną. Najnowsze badania Wang i wsp. (2025) pokazują, że Elk-4 bezpośrednio wiąże się z promotorem genu *Homer3*, indukując jego ekspresję w komórkach glejaka i aktywując szlak Wnt/ β -catenin/EMT. W układzie nerwowym białka Homera modułują sygnalizację wapniową, kluczową dla plastyczności synaptycznej, procesów uczenia się i pamięci (Szumlinski i wsp., 2008). Zatem niska ekspresja Elk-4 w LHb u szczurów WKY może prowadzić do obniżenia poziomu *HOMER3*, co z kolei osłabia mechanizmy adaptacyjne zależne od szlaku Wnt/ β -catenin i utrudnia reakcję na sygnały nagradzające, podtrzymując stan awersyjny.

W LHb szczurów WKY wykazano zwiększoną ekspresję genu *Sstr4*, kodującego receptor somatostatynowy typu 4 (*Sstr4*). Receptor ten charakteryzuje się wysoką ekspresją w strukturach limbicznych, takich jak hipokamp i ciało migdałowate oraz jądra Hb. Poprzez sprzężenie z białkami Gi/o, *Sstr4* hamuje aktywność cykazy adenylanowej, ograniczając tym samym produkcję cAMP. W układzie nerwowym wpływa na zmniejszenie uwalniania glutaminianu, hamowanie nadmiernej pobudliwości synaptycznej, a tym samym modulację pamięci awersyjnej i reakcji lękowej (Adamczyk i wsp., 2021). Badania farmakologiczne wykazały, że selektywni agoniści *Sstr4* wykazują działanie przeciwlękowe i przeciwdepresyjne w modelach zwierzęcych, poprzez modulację uwalniania glutaminianu i zwiększenie reaktywności na stres, szczególnie w obrębie ciała migdałowatego (Scheich i wsp., 2016). Podwyższona ekspresja *Sstr4* w LHb u szczurów WKY może odzwierciedlać próbę zahamowania nadmiernej aktywności tej struktury, poprzez modulację neurotransmisji GABA- i glutaminianergicznej. Wzmocniona aktywacja receptorów *Sstr4* tłumi przetwarzanie informacji awersyjnych (Adamczyk i wsp., 2021) – co u WKY może skutkować kumulacją negatywnych stanów emocjonalnych przy jednoczesnym braku odpowiedniego hamowania synaptycznego.

Z kolei w MHb wykazano obniżony poziom transkryptu *Cdkn1c*, kodującego białko p57^{Kip2}, który jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin i pełni kluczową funkcję jako regulator cyklu komórkowego, różnicowania komórek oraz przeżywalności neuronów (Stampone i wsp., 2018). W kontekście rozwoju układu nerwowego *Cdkn1c* odpowiada za właściwe tempo neurogenezy oraz utrzymanie stabilności i plastyczności komórek nerwowych. Jak pokazują badania na modelach genetycznych, jego niedobór prowadzi do zmniejszenia objętości mózgu i zwiększonej śmierci neuronalnej w rozwijającej się korze nowej (Imaizumi i wsp., 2020). MHb jest strukturą szczególnie zaangażowaną w przetwarzanie emocji, kontrolę reakcji na stres oraz mechanizmy związane z uzależnieniem i odstawieniem. Obniżona ekspresja *Cdkn1c* w

tym obszarze może skutkować deficytami w liczbie i funkcji neuronów, co przekłada się na zaburzoną integrację sygnałów projekcyjnych do IPN. Taka dysfunkcja może zakłócać prawidłowe przetwarzanie bodźców emocjonalnych i stresowych, sprzyjając rozwojowi anhedonii, nadmiernej reaktywności awersyjnej i obniżonej odporności na stres – cech typowych dla fenotypu WKY. Z translacyjnego punktu widzenia istotne jest, że podobne zmiany obserwowano u ludzi z depresją – stwierdzono hipermetylację promotora *Cdkn1c* w komórkach krwi obwodowej oraz obniżoną ekspresję jego mRNA (Xiu i wsp., 2022). Wskazuje to na możliwe epigenetyczne mechanizmy regulujące aktywność *Cdkn1c* w warunkach stresu i sugeruje, że jego zmniejszona ekspresja może stanowić wspólny cel molekularny w modelach zwierzęcych i u ludzi cierpiących na zaburzenia depresyjne.

W świetle rosnącej liczby dowodów na przeciwdepresyjny potencjał psylocybiny, coraz więcej badań koncentruje się na zrozumieniu jej mechanizmów działania, zarówno w strukturach korowych, jak i podkorowych. LHb odgrywająca istotną rolę w patofizjologii depresji (Yang i wsp., 2018), stanowi ważny obszar badań, szczególnie w kontekście zwierząt o fenotypie TRD, jakimi są szczury WKY, co zostało potwierdzone w niniejszej rozprawie doktorskiej. LHb uczestniczy w przetwarzaniu sygnałów awersyjnych, hamowaniu aktywności układu nagrody oraz w regulacji funkcji serotoninergetycznych i dopaminergetycznych. Nadaktywność tej struktury koreluje z występowaniem fenotypu depresyjnego zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych (Yang i wsp., 2018).

Psylocybina, naturalny alkaloid tryptaminowy, działa jako agonista receptorów serotoninergetycznych (przede wszystkim 5-HT_{2A}) i jest badana eksperymentalnie jako potencjalna terapia TRD (Carhart-Harris i wsp., 2021; Goodwin i wsp., 2022). Obserwacje kliniczne wskazują, że jednorazowe podanie psylocybiny może prowadzić do długotrwałych efektów przeciwdepresyjnych, nawet po pojedynczej dawce (Griffiths i wsp., 2016). W związku z tym w niniejszych badaniach zdecydowano się na jednokrotne podanie psylocybiny w celu oceny zmian w ekspresji genów w LHb u szczurów WIS i WKY. Na podstawie przeglądu dostępnej literatury, obejmującej zarówno badania kliniczne na ludziach (Carhart-Harris i wsp., 2021; Goodwin i wsp., 2022), jak i badania na modelach zwierzęcych (Hibicke i wsp., 2020; Higgins i wsp., 2021; Kolasa i wsp., 2024; Seillier i wsp., 2025) zdecydowano się na podanie psylocybiny w dawce 0.3 mg/kg. W badaniu Higginsa i wsp. (2021), analizującym zależność dawka–odpowiedź u szczurów, dawka ta została zidentyfikowana jako dawka progowa, aktywująca receptory 5-HT_{2A}, lecz nie wywołująca jeszcze typowych efektów psychomotorycznych, takich jak z „*head-twitch responses*” (HTR), które są charakterystyczne

dla wyższych dawek psylocybiny. Dodatkowo najnowsze badania przeprowadzone przez Seillier i wsp. (2025) wykazały istnienie wąskiego okna terapeutycznego dla działania psylocybiny i jedynie dawka 0.32 mg/kg skutecznie wywoływała szybką i długotrwałą skuteczność przeciwdepresyjną w teście FST u szczurów WIS. Zaobserwowano także efekty prospołeczne i hedonistyczne, bez działań niepożądanych obserwowanych przy wyższych dawkach. Z kolei wyższe dawki (1.0 i 3.2 mg/kg) nie wykazały działania przeciwdepresyjnego, lecz powodowały liczne działania niepożądane takie jak: obniżona temperatura ciała, zaburzona lokomocja oraz zahamowanie przyrostu masy ciała (Seillier i wsp., 2025). Co istotne, psylocybina w dawce 0.3 mg/kg podana szczurom WKY również wykazuje działanie przeciwdepresyjne oraz skutkuje zmianami molekularnymi w mPFC (Kolasa i wsp., 2024).

Analiza ekspresji genów po podaniu psylocybiny potwierdziła różnice w ekspresji większości genów pomiędzy szczurami WIS i WKY w obrębie LHb: obniżony poziom ekspresji *Htr2a*, *Htr7*, *Slc12a5* oraz podwyższony poziom *Kcnj5* i *Sstr4*. Nie potwierdziły się różnice w ekspresji: *Htr4*, *Drd2* i *Elk4*. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała istotne różnice pomiędzy szczepami w ekspresji *Cacna1b*, *Cdkn1c*, *Mapk14*, *Slc6a6* i *Sstr2* oraz istotnie wyższy poziom ekspresji *Tph1* u szczurów WKY. Rozbieżności pomiędzy wynikami testu t Studenta z pierwszego etapu badań a wynikami analizy wariancji (ANOVA) są konsekwencją różnic w podejściu statystycznym. Test t Studenta umożliwia porównanie jedynie dwóch grup, nie uwzględniając wpływu dodatkowych czynników, takich jak działanie psylocybiny czy interakcje między zmiennymi. Z kolei analiza dwuczynnikowa (ANOVA), obejmująca jednoczesne uwzględnienie wszystkich grup badawczych, pozwala na dokładniejsze modelowanie struktury danych – analizując zarówno główny efekt szczepu, jak i możliwe interakcje szczep $\times$ psylocybina. Dzięki temu możliwe było wykrycie subtelnych, wcześniej niewidocznych różnic w ekspresji genów, co podkreśla większą czułość i trafność analizy dwuczynnikowej w kontekście danych biologicznych o złożonym charakterze.

Gen *Cacna1b* koduje podjednostkę α -1b zależnego od napięcia kanału wapniowego typu N - $\text{Ca}_v2.2$. Znajduje się on głównie w presynaptycznych zakończeniach nerwowych, gdzie współdziała z kanałem $\text{Ca}_v2.1$, regulując napływ jonów wapnia, warunkując tym samym uwalnianie neuroprzekazników (Caminski i wsp., 2022). Zmienność w funkcjonowaniu tego kanału postuluje się jako potencjalny mechanizm patogenetyczny w takich jednostkach chorobowych jak autyzm (Liao i Li, 2020), padaczka (Mayo i wsp., 2023), nowotwory (Phan i wsp., 2017) czy ból neuropatyczny (Kutzsche i wsp., 2024). Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że myszy z niedoborem $\text{Ca}_v2.2$ charakteryzują się obniżoną wrażliwością na bodźce

bólowe oraz zmniejszonym poziomem lęku (Saegusa i wsp., 2001). Alternatywne składowanie eksonu 37 genu *Cacna1b* prowadzi do zmian w strukturze kanału $\text{Ca}_v2.2$, co skutkuje wzmożoną reakcją na bodźce awersyjne poprzez zmianę sygnalizacji glutaminergicznej (Bunda i wsp., 2019). Z kolei, podanie inhibitora $\text{Ca}_v2.2$, ω -konotoksyny GVIA, bezpośrednio do mózgu wywołuje zachowania przypominające depresję co sugeruje, że zaburzenie funkcji kanałów wapniowych w układzie nerwowym może przyczyniać się do rozwoju zaburzeń depresyjnych (Zhou i wsp., 2015). W najnowszym badaniu, w którym przeprowadzono precyzyjne mapowanie genów ryzyka związanych z chorobą afektywną dwubiegunową wykazano, że warianty genetyczne mogą wpływać na rozwój tej choroby poprzez alternatywne składowanie mRNA m.in. genu *CACNA1B* w mózgu (Koromina i wsp., 2025). Zmiany w ekspresji tego genu i funkcjonowaniu kanału $\text{Ca}_v2.2$ mają istotny wpływ na wiele procesów emocjonalnych i behawioralnych, w tym odpowiedź na lęk oraz rozwój depresji. Obniżona ekspresja genu *Cacna1b* w LHb, a tym samym ograniczenie funkcji kanałów wapniowych typu N ($\text{Ca}_v2.2$), może zaburzać równowagę pomiędzy układami pobudzającymi a hamującymi w mózgu, prowadząc do nadaktywności tej struktury. Może to stanowić jeden z mechanizmów molekularnych leżących u podstaw depresyjnego fenotypu obserwowanego u szczurów WKY.

Co ciekawe, analiza ujawniła podwyższony poziom ekspresji genu *Cdkn1c* w LHb, którego istotnie obniżoną ekspresję zaobserwowano w MHb u szczurów WKY. Wyższa ekspresja tego genu w LHb może sugerować istnienie mechanizmów kompensacyjnych lub adaptacyjnych w odpowiedzi na nieprawidłowości w innych strukturach mózgowych, takich jak MHb. Zwiększony poziom *Cdkn1c* może wpływać na funkcjonowanie i przeżywalność komórek nerwowych, przyczyniając się do stabilizowania aktywności LHb u szczurów WKY.

Ciekawym wynikiem okazał się wpływ psylocybiny na obniżenie ekspresji receptora *Htr7* u szczurów WKY, którego nie obserwowano u szczurów WIS. Co istotne, mimo że u szczurów WKY ekspresja tego receptora była już obniżona w warunkach kontrolnych, psylocybina dodatkowo ją redukowała. Wynik ten jest to zgodny z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi, że blokada 5-HT7 w LHb wywołuje działanie przeciwdepresyjne, zwiększając poziom serotoniny i dopaminy, natomiast jego aktywacja indukuje wystąpienie fenotypu depresyjnego (Han i wsp., 2016). Aktywność terapeutyczna antagonistów receptora 5-HT7 prawdopodobnie wynika z ich obecności na neuronach GABA-ergicznych. Wykazano, że aktywacja receptora 5-HT7 w hipokampie moduluje pobudliwość neuronów GABA-ergicznych wpływając na równowagę między aktywnością neuronów pobudzających i

hamujących (Tokarski i wsp., 2011). Choć bezpośrednie dane dotyczące lokalizacji i funkcji 5-HT7 w LHb są ograniczone, obniżenie jego ekspresji w odpowiedzi na psylocybinę może prowadzić do zmniejszenia nadmiernej aktywności neuronów LHb, co potencjalnie tłumaczy obserwowane działanie terapeutyczne.

W przypadku ekspresji genu *Mapk14* nie zaobserwowano różnic międzyszczepowych, jednak stwierdzono wpływ psylocybiny na obniżenie ekspresji tego genu u szczurów WKY. Gen *Mapk14* koduje kinazę białkową p38, która odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi na stres oraz regulacji procesów zapalnych. Kinaza p38 jest aktywowana poprzez fosforylację, co prowadzi do jej przejście w formę aktywną, zdolną do modulowania ekspresji genów i odpowiedzi komórkowych (Canovas i wsp., 2021). Co istotne, badania wskazują, że u zwierząt poddanych stresowi nie dochodzi do wzrostu poziomu ekspresji transkryptu genu *Mapk14* (Reisi i wsp., 2017) ani poziomu białka (Zhao i wsp., 2018). Zamiast tego obserwuje się wzrost poziomu fosforylowanej, aktywnej formy tej kinazy (Zhao i wsp., 2018; Zhao i wsp., 2020), co sugeruje, że aktywacja kinazy p38 w odpowiedzi na stres nie zależy od zmiany jej ekspresji, lecz od fosforylacji, a więc aktywacji tej kinazy. Podanie zarówno inhibitora p38, jak i fluoksetyny, skutkuje zmniejszeniem poziomu fosforylowanej, aktywnej formy p38 bez wpływu na formę nieaktywną, co przekłada się na efekt przeciwdepresyjny (Zhao i wsp., 2018; Zhao i wsp., 2020). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że psylocybina może działać już na poziomie regulacji transkrypcji tego genu, obniżając jego ekspresję i wywołując efekt przeciwdepresyjny. Brak zmiany w ekspresji *Mapk14* u szczurów WIS może świadczyć o tym, że mechanizmy związane z kinazą p38 nie są angażowane w taki sam sposób, jak w przypadku szczurów WKY.

W przypadku ekspresji genu *Slc6a6* wykazano istotnie obniżoną ekspresję u szczurów WKY, z kolei podanie psylocybiny spowodowało spadek ekspresji tego genu tylko u szczurów WIS. Gen *Slc6a6* koduje transporter dla tauryny TauT, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tego aminokwasu w mózgu. Tauryna, będąca jednym z głównych aminokwasów osmotycznych w układzie nerwowym, pełni wiele funkcji w mózgu, w tym reguluje ciśnienie osmotyczne, moduluje aktywność neurotransmiterów oraz chroni neurony przed stresem oksydacyjnym (Bala i wsp., 2013). Badania przeprowadzone na zwierzęcych modelach depresji wywołanej stresem wykazały, że obniżony poziom tauryny w mózgu jest charakterystyczny dla stanów depresyjnych, a suplementacja tauryną wykazuje działanie przeciwdepresyjne, między innymi poprzez ochronę neuronów przed utratą kolców

dendrytycznych oraz przywrócenie ekspresji białek synaptycznych (Zhu i wsp., 2022). Ponadto suplementacja tauryną wykazała efekty protekcyjne w kontekście depresji, zapobiegając dysregulacji hormonów i neuroprzekaźników w procedurze CUMS, co może być związane z regulacją osi HPA (Wu i wsp., 2017). Co ciekawe, u pacjentów leczonych wenlafaksyną dochodzi do obniżenia poziomu TauT w komórkach krwi (Fazzino i wsp., 2009), natomiast w modelu zwierzęcym fluoksetyna zwiększała transport tauryny bez wpływu na poziom samego transportera (Colmenares-Aguilar i wsp., 2017). Obniżony poziom TauT u szczurów WKY może wskazywać na zaburzoną homeostazę tauryny, która w połączeniu z dysfunkcją osi HPA może prowadzić do rozregulowania odpowiedzi stresowej i utrwalenia objawów depresyjnych. Z kolei obniżenie poziomu transkryptu *Slc6a6* po podaniu psylocybiny tylko u szczurów WIS sugeruje, że mechanizmy molekularne związane z tauryną i jej transporterem mogą być różnie regulowane w zależności od szczepu i stanu zdrowia.

Analiza wykazała obniżoną ekspresję genu *Sstr2* u szczurów WKY. Gen *Sstr2* koduje receptor somatostatynowy typu 2 (*Sstr2*), należący do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G, który pełni istotną rolę w regulacji neuroprzekaźników oraz odpowiedzi na stres (Robinson i Thiele, 2020). W badaniach na zwierzętach poddanych procedurze przewlekłego stresu (CMS) stwierdzono obniżony poziom ekspresji *Sstr2* w mózgu, przy jednoczesnym podwyższeniu poziomu somatostatyny w osoczu, co wskazuje na jego udział w modulacji odpowiedzi na stres (Faron-Górecka i wsp., 2015). Obniżona ekspresja *Sstr2* w LHb może zatem stanowić kolejny molekularny czynnik odpowiedzialny za występowanie fenotypu depresyjnego i lękowego u szczurów WKY. Zmiany w aktywności receptorów somatostatynowych mogą prowadzić do zaburzeń regulacji nastroju i odpowiedzi na stres, co może utrudniać skuteczność leczenia depresji, zwłaszcza w jej opornych formach. Delecja genu *Sstr2* prowadzi do wystąpienia zaburzeń lękowych oraz zachowań przypominających depresję, co wiąże się z podwyższonym poziomem kortykosteronu, hormonu stresu, odgrywającego kluczową rolę w regulacji osi HPA oraz w mechanizmach odpowiedzi organizmu na stres (Prevot i wsp., 2017). Co istotne, podanie agonisty *Sstr2* wykazuje działanie przeciwlękowe i przeciwdepresyjne, a także skutkuje obniżeniem poziomu kortykosteronu (Prevot i wsp., 2017). W hipokampie postsynaptyczna aktywacja *Sstr2* zmniejsza pobudliwość komórek poprzez hiperpolaryzację błony komórkowej po aktywacji kanałów potasowych (Boehm i Betz, 1997). Mechanizm ten może być istotny w regulacji równowagi pomiędzy sygnałami pobudzającymi i hamującymi w mózgu zależnymi od *Sstr2*. Obniżona ekspresja *Sstr2* w LHb może zatem stanowić kolejny molekularny cel odpowiedzialny za występowanie fenotypu depresyjnego i

lękowego u szczurów WKY. Zmiany w aktywności receptorów somatostatynowych mogą prowadzić do zaburzeń regulacji nastroju i stresu, co może utrudniać skuteczność leczenia depresji, zwłaszcza TRD.

Analiza wykazała istotnie wyższą ekspresję genu *Tph1* u szczurów WKY. Gen *Tph1* koduje enzym hydroksylazę tryptofanu 1 (Tph1), odpowiedzialny za hydroksylację tryptofanu do 5-hydroksytryptofanu, który jest bezpośrednim prekursorem serotoniny. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że obniżenie ekspresji zarówno *Tph1*, jak i *Tph2* prowadzi do obniżenia poziomu serotoniny w mózgu, co pozostaje w ścisłym związku z rozwojem fenotypu depresyjnego (Chen i wsp., 2017). Podwyższona ekspresja *Tph1* w LHb u szczurów WKY może sugerować istnienie mechanizmu kompensacyjnego, mającego na celu zrównoważenie obniżonego poziomu serotoniny u tych zwierząt (Yamada i wsp., 2013), a także o próbie adaptacji organizmu do zaburzeń w funkcjonowaniu układu serotonergicznego.

Jednym z najbardziej zaskakujących wyników niniejszej rozprawy okazał się wpływ psylocybiny na ekspresję genu *Kcnj5*, kodującego kanał potasowy GIRK4. Psylocybina znacząco obniżyła poziom ekspresji tego genu, przywracając go do wartości porównywalnych z obserwowanymi u zdrowych szczurów szczepu WIS. Wynik ten został potwierdzony także na poziomie białkowym – analiza ilości białka GIRK4 wykazała podobny efekt, co sugeruje, że psylocybina może oddziaływać na molekularne mechanizmy leżące u podstaw TRD, poprzez regulację ekspresji *Kcnj5* i aktywność kanałów GIRK4.

Pomimo zwiększonej ekspresji białka GIRK4 u szczurów WKY kontrolnych, która mogłaby sugerować nasilenie aktywności kanałów potasowych, badania elektrofizjologiczne wykazały co prawda wzrost prądów GIRK, aczkolwiek nieistotny statystycznie u tych szczurów. Co istotne, u szczurów WKY podanie psylocybiny istotnie zmniejszyło przepływ prądów dkomórkowych przez kanały GIRK4. Wynik ten sugeruje, że psylocybina może wpływać także na funkcję kanałów GIRK4, a nie tylko na poziom ekspresji. Ponieważ nadmierna aktywność LHb jest ściśle powiązana z fenotypem depresyjnym i może być kluczowym czynnikiem zaburzającym równowagę neuronalną w tej strukturze, w tym kontekście psylocybina może pełnić rolę neuromodulatora, wspierającego przywrócenie tej równowagi.

Kanały GIRK4 odgrywają kluczową rolę w regulacji pobudliwości neuronalnej, uczestnicząc w hiperpolaryzacji błony komórkowej i zmniejszaniu aktywności neuronów (Hibino i wsp., 2010). Z tego względu, ich zwiększona ekspresja w obrębie LHb mogłaby

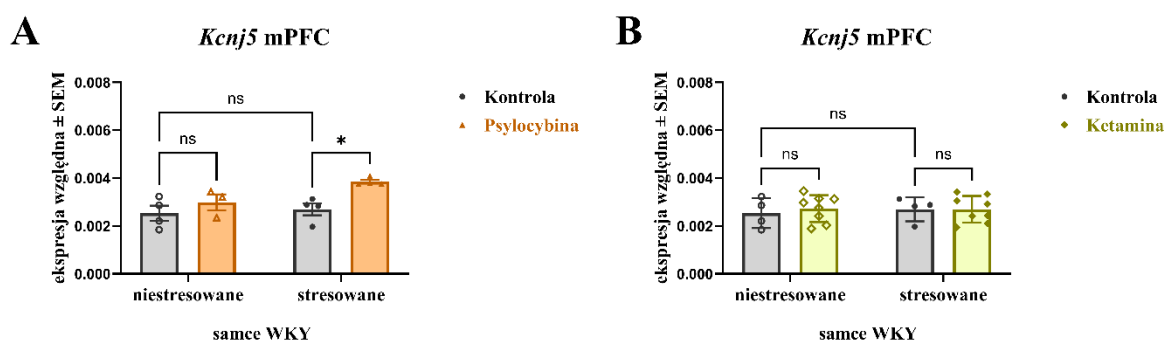
teoretycznie ograniczać nadmierną aktywność neuronów glutaminianergicznych, co sprzyałoby efektowi przeciwdepresyjnemu. Jednak u szczurów WKY – u których stwierdzono podwyższony poziom ekspresji genu *Kcnj5* oraz białka GIRK4 – efekt ten nie występuje. Może to sugerować, że kanały GIRK4 nie są w pełni funkcjonalne, np. z powodu defektów strukturalnych, braku aktywacji przez receptory sprzężone z białkiem G lub zaburzeń w szlakach sygnalizacyjnych. Innym potencjalnym wyjaśnieniem jest możliwość, że GIRK4 w LHb ulegają ekspresji nie na neuronach glutaminianergicznych, lecz na interneuronach GABA-ergicznym. W takim układzie ich aktywacja prowadziłaby do hiperpolaryzacji neuronów hamujących, co w konsekwencji skutkowałoby odhamowaniem neuronów pobudzających i zwiększeniem aktywności LHb. Paradoksalnie, zwiększona ekspresja GIRK4 mogłaby przyczyniać się do nasilenia fenotypu depresyjnego, zamiast prowadzić do jego łagodzenia. Dodatkowo należy uwzględnić mechanizmy regulujące aktywność kanałów GIRK poprzez receptory sprzężone z białkiem G. Kanały te są aktywowane przez podjednostkę $\beta\gamma$ białka G, jednak ich funkcja może być osłabiana przez szlak fosfolipazy C (PLC) i kinazy białkowej C (PKC), aktywowany przez receptory typu Gq, takie jak 5-HT_{2A}. Ten szlak prowadzi m.in. do zmniejszenia dostępności PIP₂ – fosfolipidu niezbędnego do prawidłowego działania kanałów (Lou i wsp., 2022). Psylocybina, jako agonista receptora 5-HT_{2A}, może uruchamiać ten mechanizm, co może tłumaczyć zaobserwowany w niniejszym badaniu spadek przepływu prądów GIRK u szczurów WKY po jej podaniu – mimo wcześniejszej nadekspresji GIRK4.

Szczury WKY wykazały podwyższony poziom receptorów GABAB w LHb, MHb oraz DR, co może sugerować, że mechanizm hamowania aktywności neuronalnej przez te receptory jest zaburzony. Zwiększona ekspresja receptorów GABAB na neuronach hamujących może prowadzić do nadmiernej aktywności neuronów glutaminergicznych, co wiąże się z rozwojem objawów depresyjnych. Z kolei Lecca i wsp., (2016) wykazali, że zwiększona aktywność PP2A prowadzi do internalizacji receptorów GABAB oraz kanałów GIRK, co osłabia prądy GIRK. To zjawisko zmniejsza zdolność GIRK do hamowania aktywności neuronalnej. Zwiększoną ekspresję *Ppp2ca* zaobserwowano w LHb, MHb, mPFC oraz DR u szczurów WKY. W tym kontekście zwiększona aktywność PP2A może tłumić działanie receptorów GABAB oraz kanałów GIRK, co dodatkowo zaburza równowagę pomiędzy neuroprzekaznictwem hamującym i pobudzającym oraz pogłębia objawy depresyjne.

Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki wskazują, że nadekspresja kanału GIRK4 może stanowić jeden z potencjalnych czynników patofizjologicznych warunkujących fenotyp TRD obserwowany u szczurów szczepu WKY. Zwierzęta te wykazują zwiększoną ekspresję

transkryptu dla tego kanału w LHb oraz MHb, a także w mPFC która wysyła projekcje do LHb. Dodatkowo podwyższona ekspresja transkryptu *Kcnj5* została zaobserwowana w DR oraz VTA, strukturach regulowanych przez LHb. Nadekspresja *Kcnj5* w LHb oraz powiązanych obszarach może sugerować kompensacyjne zwiększenie ekspresji kanałów GIRK4 w odpowiedzi na nadmierną aktywność neuronalną. Tego typu zmiany mogą świadczyć o zaburzeniach w regulacji neuroprzebieżności, szczególnie w kontekście modulacji aktywności kanałów potasowych oraz równowagi między sygnałami pobudzającymi a hamującymi w mózgu, co może przyczyniać się do charakterystycznych dla tego modelu zaburzeń nastroju i odpowiedzi na stres. Obserwowany wpływ psylocybiny, polegający na obniżeniu ekspresji genu *Kcnj5*, poziomu białka GIRK4 oraz zmniejszeniu przepływu prądów dokomórkowych w LHb, może stanowić unikalny mechanizm leżący u podstaw jej przeciwdepresyjnego działania.

W badaniach zespołu prof. Pappa, przeprowadzonych na szczurach WKY poddanych procedurze CMS, wykazano istotny wpływ psylocybiny na ekspresję genu *Kcnj5* w obrębie mPFC. Psylocybina wywołała istotny wzrost ekspresji *Kcnj5* w tej strukturze u szczurów poddanych stresowi ($p=0.0304$) (rycina 8.1A). W przeciwieństwie do psylocybiny, ketamina – mimo, że również stosowana w leczeniu TRD – nie wpłynęła na poziom ekspresji *Kcnj5* w mPFC szczurów stresowanych (rycina 8.1B). Dwuczynnikowa analiza ANOVA wykazała istotny wpływ psylocybiny na ekspresję *Kcnj5* w mPFC ($F(1, 11)=9.860$; $p=0.0094$), co potwierdza, że zmiana poziomu ekspresji tego genu jest wynikiem działania psylocybiny.



Rycina 8.1. Ekspresja genu *Kcnj5* w środkowej korze przedczołowej u samców szczurów Wistar Kyoto poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu i leczonych psylocybiną (A) lub ketaminą (B). Wyniki przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako $*p < 0.05$. ns – nieistotne statystycznie; WKY – szczury Wistar Kyoto; mPFC – *medial Prefrontal Cortex*, środkowa kora przedczołowa

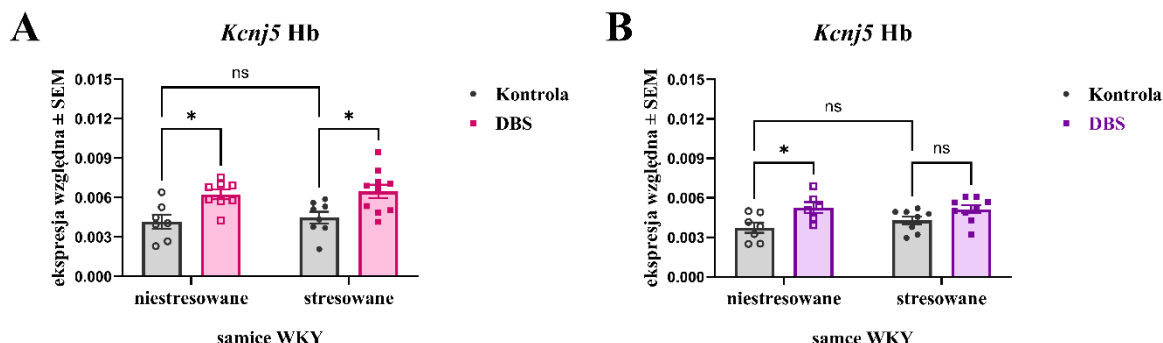
Dane literaturowe wyraźnie wskazują, że klasyczne substancje psychodeliczne gwałtownie zmniejszają łączność funkcjonalną w obrębie sieci trybu domyślnego i zwiększają łączność między sieciami. Zatem podczas doświadczenia psychodelicznego wydaje się zachodzić wyjątkowa zmiana w łączności neuronowej, odzwierciedlająca przejście od bardziej modułowego, posegregowanego mózgu do bardziej połączonej sieci globalnej. To zmniejszenie segregacji międzysięciowej wydaje się być w pewnym stopniu specyficzne dla klasycznych substancji psychodelicznych, chociaż zmniejszona segregacja występuje również w przypadku ketaminy. Nie obserwuje się jej w przypadku leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI, stymulantów, leków uspokajających ani MDMA (Gattuso i wsp., 2022).

Wyniki te sugerują, że ekspresja genu *Kcnj5* jest modulowana przez psylocybinę u szczurów szczepu WKY, przy czym wpływ psylocybiny na ekspresję tego genu różni się w zależności od poziomu stresu oraz konkretnej struktury mózgowej. Wskazuje to na ważny aspekt, jakim jest tzw. “set and settings”, czyli od wewnętrznego nastawienia osoby (emocji, oczekiwań, stanu psychicznego), w tym przypadku działanie stresu, oraz od otoczenia, w którym substancja jest podawana, co moduluje potencjalne efekty terapeutyczne (Hartogsohn, 2016). Zróżnicowane zmiany w ekspresji *Kcnj5* w różnych obszarach mózgu wskazują na złożoność mechanizmów molekularnych, za pośrednictwem których psylocybina wywiera swoje działanie, obejmując różne szlaki neurobiologiczne aktywowane w odpowiedzi na stres.

Co istotne, *Kcnj5* wydaje się być specyficznym molekularnym celem działania psylocybiny – również w mPFC w warunkach stresowych – co nie dotyczy ketaminy, co podkreśla różnice w molekularnych mechanizmach tych dwóch substancji, mimo że obie wykazują skuteczność przeciwdepresyjną w modelu TRD. Ketamina, choć efektywna klinicznie, może działać poprzez odmienne ścieżki molekularne, niezwiązane z regulacją kanałów potasowych GIRK4. Sugeruje to, że pomimo podobnych efektów behawioralnych, psylocybina i ketamina angażują różne szlaki molekularne, prowadząc do zróżnicowanej regulacji aktywności neuronalnej i neuroplastyczności.

Kolejne badania przeprowadzone w ramach eksperymentów prof. Pappa wykazały, że u szczurów WKY, które zostały poddane procedurze CMS i poddanych procedurze DBS w obrębie LHb, dochodzi do wzrostu ekspresji *Kcnj5* w Hb. Co istotne, większą ekspresję zaobserwowano zarówno u samic, które były poddane stresowi ($p=0.0322$), jak i u samic niestresowanych ($p=0.0231$) (rycina 8.2A). Natomiast u samców istotny wzrost ekspresji *Kcnj5* był zauważalny tylko u szczurów niestresowanych ($p=0.0402$) (rycina 8.2B). Dwuczynnikowa

analiza ANOVA wykazała istotny wpływ DBS na poziom ekspresji *Kcnj5* zarówno u samic ($F(1, 29)=17.80$; $p=0.0002$), jak i u samców ($F(1, 26)=11.07$; $p=0.0026$), co potwierdza, że zmiana poziomu ekspresji tego genu jest wynikiem działania DBS.



Rycina 8.2. Ekspresja genu *Kcnj5* w jądrach uzdeczki u samic (A) i samców (B) szczurów Wistar Kyoto poddanych procedurze chronicznego łagodnego stresu i leczonych za pomocą głębokiej stymulacji mózgu w obrębie LHb. Wyniki przedstawiono na wykresie jako ekspresję względną $\pm$ SEM. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA wraz z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Statystycznie istotne zmiany między grupami oznaczono jako * $p < 0.05$. ns – nieistotne statystycznie; WKY – szczury Wistar Kyoto; Hb – *Habenula*, uzdeczka; DBS – *Deep Brain Stimulation*, głęboka stymulacja mózgu

Mechanizm terapeutyczny DBS nadal jest nie w pełni zrozumiany, natomiast teoria postuluje, że DBS działa poprzez mechanizm multimodalny. Obecnie wiodąca hipoteza dotycząca potencjału terapeutycznego DBS zakłada, że moduluje ona aktywność w obrębie sieci neuronowych. Jest to spójne z danymi, które pokazują, że wiele chorób leczonych za pomocą DBS wiąże się z zaburzeniami sieci neuronowych. DBS można by więc uznać za terapię sieciową, co sprawia, że identyfikacja odpowiednich sieci neuronowych będzie miała kluczowe znaczenie dla polepszenia skuteczności tej terapii (Sandoval-Pistorius i wsp., 2023).

Psylocybina wpływa na mózg, wywołując głębokie zmiany w percepcji, nastroju oraz myśleniu. Jednym z efektów działania psylocybiny jest jej zdolność do resetowania sieci neuronowych, co ma szczególne znaczenie w kontekście leczenia zaburzeń psychicznych, takich jak depresja. Psylocybina prowadzi do rozluźnienia sztywnych wzorców aktywności neuronalnej oraz zaburza łączność funkcjonalną w korze oraz częściach podkorowych. Najsilniejsze zmiany w łączności zaobserwowano w sieci trybu domyślnego, który jest połączony z przednim hipokampem i uważa się, że odpowiada za poczucie przestrzeni, czasu i siebie. Trwała redukcja łączności sieci trybu domyślnego może stanowić neuroanatomiczny i

mechanistyczny korelat proplastyczności i terapeutycznego działania substancji psychodelicznych (Siegel i wsp., 2024).

Wyniki te sugerują, że DBS, będąca skuteczną formą terapii w leczeniu TRD, również wpływa na ekspresję genu *Kcnj5* u szczurów WKY, co potwierdza istotną rolę tego genu w mechanizmie działania przeciwdepresyjnego. Zmiana poziomu ekspresji *Kcnj5* w odpowiedzi na DBS wskazuje, że kodowany przez ten gen kanał potasowy może pełnić kluczową funkcję w regulacji aktywności neuronalnej w strukturach mózgowych zaangażowanych w przetwarzanie emocji oraz odpowiedzi na stres. Tym samym, modyfikacja ekspresji *Kcnj5* może stanowić jedno z molekularnych ogniw działania DBS, co podkreśla potencjalne znaczenie tego kanału w leczeniu TRD.

Zwiększony poziom ekspresji *Grin2a* w LHb oraz MHb u szczurów WKY może mieć kluczowe znaczenie dla obserwowanego fenotypu tych szczurów, zwłaszcza w kontekście zaburzeń neurobiologicznych charakterystycznych dla depresji. Gen *Grin2a* koduje podjednostkę GluN2A receptora NMDA, a jego podwyższona ekspresja sugeruje nadmierną aktywność glutaminianergiczną w tych strukturach mózgowych, co może przyczyniać się do zaburzeń neuroplastyczności i nieprawidłowego przetwarzania bodźców emocjonalnych. Co ciekawe, w badaniach na szczurach WKY stwierdzono obniżony poziom GluN2A w PFC u samców (Millard i wsp., 2019) oraz u samic, u których dodatkowo zaobserwowano spadek poziomu tej podjednostki również w hipokampie (Millard i wsp., 2021). Wyniki te sugerują, że równowaga aktywności glutaminianergicznej może być zróżnicowana zarówno ze względu na płeć, jak i lokalizację mózgową, co może wpływać na sposób, w jaki szczury WKY reagują na stres i bodźce emocjonalne. Z kolei w badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że podwyższony poziom GluN2A w synapsach zakłóca długotrwałą plastyczność synaptyczną w neuronach CA1 hipokampa (Li i wsp., 2022), natomiast zastosowanie antagonistów GluN2A wywierało działanie przeciwdepresyjne (Jimenez-Sanches i wsp., 2014; Lundbye i wsp., 2018). Co więcej, badania przeprowadzone przez Su i wsp. (2023) wykazały, że przeciwdepresyjne działanie ketaminy jest pośredniczone właśnie przez podjednostkę GluN2A, co dodatkowo podkreśla jej rolę w kontekście neuroplastyczności i odpowiedzi na terapię przeciwdepresyjną. Z kolei analiza Davoudiana i wsp. (2023) wykazała, że endogenne poziomy ekspresji *Grin2a* w różnych obszarach mózgu mogą przewidywać, które regiony będą wrażliwe na neuroplastyczność indukowaną przez psylocybinę. Sugeruje to, że receptory glutaminianowe,

w tym GluN2A, pełnią kluczową rolę w mechanizmach działania psylocybiny, a ich aktywacja lub modulacja może być odpowiedzialna za jej efekty.

Mechanizmy działania substancji psychodelicznych, takich jak psylocybina, są przedmiotem intensywnych badań, które koncentrują się na ich wpływie na struktury mózgowe i związanych z tym zmianach w aktywności neuronalnej. Jednym z kluczowych narzędzi wykorzystywanych do oceny aktywacji neuronów w odpowiedzi na różne bodźce jest analiza poziomu ekspresji genów wczesnej odpowiedzi, takich jak *c-Fos*, który pełni rolę markera aktywności neuronalnej. *c-Fos* jest białkiem, którego ekspresja jest natychmiastowo indukowana przez aktywność neuronalną, a jego poziom odzwierciedla stopień pobudzenia neuronów w odpowiedzi na bodźce, w tym także na substancje psychoaktywne (Sakurai, 2024).

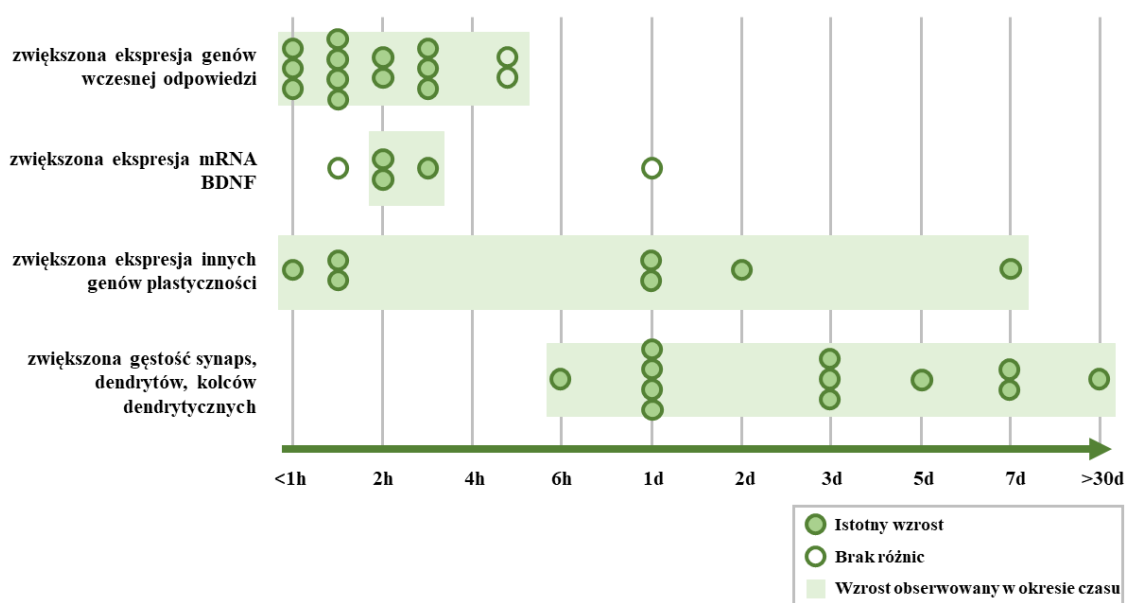
W przeprowadzonych badaniach, mających na celu ocenę wpływu psylocybiny na aktywność neuronów, ekspresję *c-Fos* zbadano 24 godziny po podaniu substancji. Wyniki tych badań nie wykazały istotnego wzrostu poziomu *c-Fos* w żadnej z analizowanych struktur mózgowych, co może sugerować, że psylocybina nie wywołuje istotnej aktywacji neuronów. Należy jednak zaznaczyć, że brak obserwowanych zmian może wynikać z wyboru niewłaściwego punktu czasowego. Jak wskazuje przegląd Calder i Hasler (2022), wzrost ekspresji genów wczesnej odpowiedzi, w tym *c-Fos*, pod wpływem substancji psychodelicznych jest zazwyczaj obserwowany w krótkim czasie po podaniu substancji – zwykle do 3 godzin (rycina 8.3). Tym samym, wybrany punkt czasowy (24 godziny po podaniu) mógł być zbyt odległy, aby uchwycić wczesną odpowiedź neurobiologiczną.

Zatem uzyskane wyniki sugerują, że brak wzrostu ekspresji *c-Fos* 24 godziny po podaniu psylocybiny może być wynikiem zastosowanego punktu czasowego, a nie braku działania substancji. Z drugiej strony, badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że krótko po podaniu psylocybiny dochodzi do zwiększenia ekspresji *c-Fos* w LHb – zarówno u myszy (Davoudian i wsp., 2023), jak i u szczurów (Funk i wsp., 2024). Wzrost ten świadczy o aktywacji neuronów w tej strukturze w odpowiedzi na psylocybinę, co podkreśla potencjalną rolę LHb w mechanizmach działania tej substancji, szczególnie w kontekście jej właściwości przeciwdepresyjnych. LHb odgrywa kluczową rolę w regulacji reakcji na stres, emocji oraz zachowań depresyjnych, co sugeruje, że jej modulacja może być jednym z głównych mechanizmów terapeutycznego działania psylocybiny.

Efekt przeciwdepresyjny substancji psychodelicznych, takich jak psylocybina, jest często powiązany ze wzrostem neuroplastyczności, czyli zdolności układu nerwowego do adaptacji, reorganizacji i tworzenia nowych połączeń neuronalnych. Zjawisko to obejmuje między innymi zmiany w ekspresji genów związanych z plastycznością synaptyczną, takich jak *Arc* i *Psd95*, które pełnią kluczową rolę w procesach synaptogenezy i modyfikacji strukturalnych w odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Wzrost poziomu tych markerów jest często uznawany za jeden z głównych mechanizmów działania substancji psychodelicznych, które mogą przyczyniać się do poprawy funkcjonowania mózgu w kontekście leczenia depresji oraz innych zaburzeń psychiatrycznych (Jefsen i wsp., 2021).

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano jednak żadnych istotnych różnic w ekspresji genu *Arc* oraz *Psd95* 24 godziny po podaniu psylocybiny, co sugeruje, że zmiany w neuroplastyczności związane z działaniem tej substancji nie występują w tak krótkim okresie. Wynik ten może być konsekwencją doboru nieoptymalnego punktu czasowego, ponieważ jak wskazuje przegląd Calder i Hasler (2022), wzrost ekspresji genów związanych z neuroplastycznością w odpowiedzi na substancje psychodeliczne, w tym psylocybiny, zazwyczaj obserwowany jest po dłuższym czasie, często dopiero po 7 dniach od podania substancji (rycina 8.3).

Z kolei długoterminowe badania przeprowadzone przez Kolasa i wsp. (2024), wykazały wzrost poziomu *Arc* w mPFC u szczurów WKY po 24 dniach od jednokrotnego podania psylocybiny. Wyniki te sugerują, że zmiany neuroplastyczne wywołane przez psylocybinę mogą rozwijać się stopniowo i wymagać czasu, aby osiągnąć mierzalny poziom, co może stanowić podstawę jej długotrwałego działania terapeutycznego. Powyższe obserwacje podkreślają znaczenie odpowiedniego doboru punktów czasowych w badaniach nad mechanizmami działania psylocybiny, szczególnie w kontekście jej potencjału w leczeniu depresji i innych zaburzeń afektywnych.



Rycina 8.3. Oś czasu przedstawiająca najwcześniejsze i najpóźniejsze obserwacje różnych zmian neuroplastyczności po leczeniu pojedynczą dawką serotonergicznych substancji psychodelicznych: LSD, psylocybiny/psylocyny, DMT lub DOI. Jedna kropka reprezentuje jedno badanie i punkt czasowy; badania przeprowadzone na zwierzętach i in vitro. Rycina sporządzona na podstawie publikacji Calder i Hasler, 2022 (doi: 10.1038/s41386-022-01389-z)

Uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki potwierdzają zrealizowanie założonych głównych celów pracy, jakimi było molekularne scharakteryzowanie jąder Hb u szczurów szczepu WKY oraz ocenienie wpływu psylocybiny na funkcjonowanie tej struktury (Tabela 8.1). Dodatkowo przeprowadzona pogłębiona analiza wskazuje na kanał GIRK4, kodowany przez gen *Kcnj5*, jako potencjalny molekularny marker lekooporności, który może odgrywać kluczową rolę w braku skuteczności standardowych terapii przeciwdepresyjnych u szczurów szczepu WKY. Regulacja ekspresji *Kcnj5* w tym modelu jest widoczna już na poziomie miRNA, które – działając jako regulatory potranskrypcyjne – wpływają na stabilność i translację mRNA. W szczególności, obniżony poziom miR-92a-3p w LHb szczurów WKY, będący jednym z regulatorów *Kcnj5*, może przyczyniać się do podwyższenia ekspresji tego genu i zwiększenia poziomu białka GIRK4.

Pomimo obserwowanej nadekspresji GIRK4 w LHb szczurów WKY, nie stwierdzono istotnego statystycznie zwiększenia przepływu prądów dokomórkowych, co sugeruje, że kanały te mogą być нефunkcjonalne lub ich aktywność jest w istotnym stopniu zaburzona. Może to oznaczać, że w warunkach zwierzęcego modelu TRD, podwyższona ekspresja GIRK4 nie

przekłada się na skuteczne ograniczenie pobudliwości neuronalnej, co w efekcie utrudnia działanie standardowych leków przeciwdepresyjnych.

Z kolei psylocybina wykazuje istotny wpływ na obniżenie zarówno poziomu transkryptu *Kcnj5*, jak i ilości białka GIRK4. Jednocześnie, pod jej wpływem dochodzi do zmniejszenia przepływu prądów dokomórkowych w neuronach LHb szczurów WKY, co sugeruje, że psylocybina może działać poprzez modulację funkcji GIRK4, przywracając równowagę w aktywności neuronalnej tej struktury. Wpływ ten może sprzyjać reorganizacji połączeń neuronalnych w obrębie LHb, co prowadzi do redukcji jego nadmiernej aktywności, stanowiąc jeden z mechanizmów przeciwdepresyjnych działania psylocybiny.

W świetle powyższych wyników, miR-92a-3p, *Kcnj5* oraz GIRK4 mogą stanowić istotne biomarkery w kontekście molekularnych mechanizmów depresji lekoopornej. Zrozumienie roli tych elementów może otworzyć nowe perspektywy terapeutyczne, obejmujące np. modulację miRNA lub funkcji kanałów potasowych, w celu poprawy odpowiedzi na leczenie przeciwdepresyjne. W przyszłości może to umożliwić opracowanie bardziej precyzyjnych, ukierunkowanych terapii, zdolnych do przezwyciężenia oporności na tradycyjne leki przeciwdepresyjne.

Tabela 8.1. Podsumowanie najważniejszych wyników

Obszar badawczy	Opis / Wynik	
1. Różnice molekularne u szczurów WKY w porównaniu do szczurów WIS		
Ekspresja miRNA	LHb ↓ miR-92a-3p ↓ miR-133a-3p ↑ miR-708-5	MHb ↓ miR-133a-3p ↓ miR-182 ↑ miR-203a-3p ↓ miR-449a-5p ↑ miR-674-5p ↑ miR-708-5p
Ekspresja genów	receptory dla monoamin (<i>Htr2a</i> , <i>Htr4</i> , <i>Htr7</i> , <i>Drd2</i>)	
	receptory dla aminokwasów (<i>Gabbr2</i> , <i>Grin2a</i>)	
	kanały jonowe (<i>Slc12a5</i> , <i>Kcnj5</i> , <i>Kcnj9</i> , <i>Cacna1b</i>)	
	receptory somatostatyny (<i>Sstr2</i> , <i>Sstr4</i>)	
	kinazy białkowe (<i>Cdkn1c</i> , <i>Mapk14</i>)	
	fosfataza (<i>Ppp2ca</i>)	
	czynnik transkrypcyjny (<i>Elk4</i>)	
	transporter tauryny (<i>Slc6a6</i>)	
	enzym hydroksylaza tryptofanu (<i>Tph1</i>)	
Ekspresja białek	LHb ↓ 5-HT7 ↓ KCC2 ↑ GIRK4	MHb ↓ KCC2
2. Wpływ psylocybiny		
Ekspresja genów	↓ <i>Kcnj5</i> (w LHb u WKY) ↓ <i>Htr7</i> (w LHb u WKY) ↓ <i>Slc6a6</i> (w LHb u WIS)	
Ekspresja białka	↓ GIRK4 (w LHb u WKY)	
Zmiany funkcjonalne	Psylocybina zmniejsza przepływ prądów przez kanały GIRK w LHb szczurów WKY	
Wpływ na aktywność neuronalną	Psylocybina obniża poziom <i>Kcnj5</i> i białka GIRK4, zmniejszając aktywność LHb i wspierając działanie przeciwdepresyjne	

WIS – szczury Wistar Han; WKY – szczury Wistar Kyoto; LHb – *Lateral Habenular Nucleus*, boczne jądro uzdeczki; MHb – *Medial Habenular Nucleus*, środkowe jądro uzdeczki

9. Podsumowanie

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki można osadzić w świetle dwóch nowych, koncepcyjnych modeli opisujących neurokognitywny mechanizm powstawania oraz leczenia depresji – modelu TIBER (ang. *Tightened BELiefs in Response to uncertainty*) oraz REBUS (ang. *RElaxed Beliefs Under pSychedelics*) (Carhart-Harris, 2019; Carhart-Harris i Friston, 2019). Oba te modele zostały opracowane w odpowiedzi na rosnącą potrzebę zrozumienia, w jaki sposób psychodeliki oddziałują na mózg, szczególnie w kontekście leczenia TRD.

Model TIBER zakłada, że w wyniku przewlekłego stresu, niepewności lub traumy, mózg zaczyna reagować defensywnie poprzez usztywnienie przekonań oraz sposobie postrzegania rzeczywistości. Takie sztywne przekonania sterują tym, jak odbieramy rzeczywistość, co może prowadzić do błędnego koła, przyczyniając się w konsekwencji do tego, że wszystko interpretujemy w sposób potwierdzający te przekonania, a elastyczność poznawcza maleje. W ujęciu neurobiologicznym stan ten odpowiada zmniejszeniu plastyczności sieci neuronalnych oraz obniżeniu różnorodności aktywności mózgu. W kontekście przedstawionych wyników, szczury WKY – stanowiące uznany model TRD – wykazywały szereg cech odpowiadających tej koncepcji, m.in. podwyższoną ekspresję kanałów GIRK4 (*Kcnj5*), zaburzoną sygnalizację receptorów serotoninowych 5-HT_{2A} i 5-HT₇ oraz obniżoną ekspresję transportera KCC2, co razem sugeruje upośledzoną zdolność do elastycznej regulacji aktywności neuronów Hb.

Z kolei model REBUS odnosi się do działania psychodelików jako substancji, które tymczasowo „rozluźniają” te sztywne przekonania. Psychodeliki, działając poprzez receptory 5-HT_{2A}, zwiększają neuroplastyczność oraz entropię aktywności mózgowej, prowadząc do dezintegracji patologicznie zorganizowanych sieci funkcjonalnych (np. sieci tryby domyślnego). W tym stanie zwiększonej elastyczności, wcześniej niedostępne perspektywy poznawcze i emocjonalne mogą zostać ponownie zintegrowane w sposób bardziej adaptacyjny. W odniesieniu do uzyskanych wyników, podanie psylocybiny u szczurów WKY skutkowało m.in. obniżeniem ekspresji *Kcnj5* w LHb, co może świadczyć o zmniejszeniu nadaktywności układu awersyjnego. Zidentyfikowane zmiany w ekspresji miRNA – zwłaszcza obniżony poziom miR-92-3p w LHb – mogą dodatkowo wspierać hipotezę o molekularnym „zakleszczeniu” sieci awersyjnej, która stanowi istotną barierę dla skutecznego leczenia klasycznymi lekami przeciwdepresyjnymi. Ich obecność jedynie u zwierząt z fenotypem TRD może wskazywać na bardziej trwałe zmiany epigenetyczne, które wymagają dłuższego okresu leczenia lub wielokrotnej ekspozycji terapeutycznej.

Podsumowując, dane uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej wspierają założenia modeli TIBER i REBUS, wskazując, że TRD może być rozumiana jako stan utrwalonych i sztywnych przekonań zakodowanych w określonych wzorcach aktywności i ekspresji genetycznej w obrębie takich struktur jak Hb. Psychodeliki, takie jak psylocybina, poprzez wpływ na receptory serotoninowe oraz kluczowe mechanizmy plastyczności, mogą odblokowywać te wzorce, tworząc „okno” neurobiologicznej elastyczności niezbędnej do zmiany percepcji i schematów zachowania. Integracja modeli neurokognitywnych z danymi molekularnymi może stanowić istotny krok w kierunku lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw skuteczności terapii psychodelicznej w leczeniu TRD.

10. Ograniczenia badawcze

Chociaż przeprowadzone badania dostarczyły cennych informacji na temat roli kanałów GIRK4 i ich potencjalnego związku z mechanizmami TRD, istnieje kilka kluczowych ograniczeń, które mogą wpływać na interpretację wyników i wskazują na obszary wymagające dalszych badań. Poniżej przedstawiono główne ograniczenia, które powinny być uwzględnione przy dalszym rozwoju badań w tym zakresie:

1. Brak badań pokazujących, na jakich typach neuronów znajdują się kanały GIRK4, wynikający z niespecyficzności przeciwciał. W badaniach nad kanałami GIRK4, kluczowym aspektem jest dokładna lokalizacja tych kanałów. Choć przeprowadzone badania wskazują na zwiększoną ekspresję *Kcnj5* w określonych obszarach mózgu, brak precyzyjnych danych dotyczących typów neuronów, na których znajdują się te kanały, stanowi istotne ograniczenie. Dalsze badania, z zastosowaniem specyficznych przeciwciał, pozwoliłyby na dokładniejszą identyfikację miejsc ekspresji GIRK4 i umożliwiłyby lepsze zrozumienie, jak zmiana w jego ekspresji wpływa na różne typy neuronów i ich funkcje.

2. Brak badań pokazujących interakcję GABA_B i GIRK4. Chociaż wcześniejsze badania sugerują, że GIRK4 może pełnić rolę w modulowaniu aktywności neuronalnej, brak jest wystarczających danych dotyczących interakcji między receptorami GABA_B a kanałami GIRK4. Receptory GABA_B są znane z tego, że regulują pobudliwość neuronalną poprzez aktywację kanałów potasowych, a interakcja z kanałami GIRK4 może odgrywać ważną rolę w hamowaniu synaptycznym oraz w regulacji równowagi pobudzeniowo-hamującej w mózgu. Brak badań pokazujących bezpośrednią interakcję między tymi dwoma elementami stanowi lukę w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za regulację emocji, odpowiedź na stres oraz efekty terapeutyczne psylocybiny. Aby dokładniej zrozumieć, jak te interakcje wpływają na aktywność neuronalną, konieczne będą eksperymenty z zastosowaniem antagonistów receptorów GABA_B oraz inhibitorów GIRK4, które pozwolą na bardziej precyzyjne zbadanie ich współdziałania w różnych regionach mózgu.

3. Brak sprawdzenia aktywności fosfatazy PP2A. Pomimo tego, że fosfataza PP2A odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności receptorów i kanałów, a jej aktywność jest powiązana z mechanizmami adaptacyjnymi mózgu, w przeprowadzonych badaniach brak jest dokładnych pomiarów aktywności tej fosfatazy. PP2A jest ważnym regulatorem szlaków sygnalizacyjnych, które kontrolują funkcje neuronalne. Brak sprawdzenia aktywności PP2A w kontekście

zmieniającej się ekspresji GIRK4 i innych receptorów w odpowiedzi na psylocybinę utrudnia pełne zrozumienie, jak te mechanizmy regulacyjne wpływają na efekty terapeutyczne tej substancji. Należy przeprowadzić eksperymenty oceniające aktywność fosfatazy PP2A w różnych obszarach mózgu i jej związek z procesami plastyczności neuronalnej i regulacji nastroju.

4. Brak badań proteomicznych wynikających z niewielkich rozmiarów jąder Hb. Kolejnym ograniczeniem jest brak badań proteomicznych, które mogłyby dostarczyć kompleksowego obrazu zmian w ekspresji białek w jądrach Hb, które mają kluczowe znaczenie w regulacji emocji i reakcji na stres. Hb jest stosunkowo małą strukturą mózgową, co utrudnia przeprowadzenie szczegółowych analiz proteomicznych w tym obszarze. Rozwój metod umożliwiających precyzyjną izolację białek z małych struktur mózgowych, takich jak jądra Hb, oraz zastosowanie zaawansowanych technik proteomicznych, może znacznie poszerzyć naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych leżących u podstaw działania psylocybiny i innych terapii farmakologicznych.

W przyszłych badaniach należy skupić się na: dokładnym określeniu lokalizacji kanałów GIRK4 w określonych typach neuronów, zbadaniu ich interakcji z receptorami GABA_B, ocenie aktywności fosfatazy PP2A oraz przeprowadzeniu zaawansowanych analiz proteomicznych jąder Hb. Takie podejście umożliwi pełniejsze zrozumienie mechanizmów działania psylocybiny w kontekście TRD.

11. Opublikowane prace naukowe

Praca naukowa zawierająca wyniki własne, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, została podkreślona.

1. **Korlatowicz A.**, Pabian P., Solich J., Kolasa M., Latocha K., Dziedzicka-Wasylewska M., Faron-Górecka A. (2023). Habenula as a Possible Target for Treatment-Resistant Depression Phenotype in Wistar Kyoto Rats. *Mol Neurobiol.* 60(2):643-654. 10.1007/s12035-022-03103-y
2. **Korlatowicz A.**, Kolasa M., Pabian P., Solich J., Latocha K., Dziedzicka-Wasylewska M., Faron-Górecka A. (2023). Altered Intracellular Signaling Associated with Dopamine D2 Receptor in the Prefrontal Cortex in Wistar Kyoto Rats. *Int J Mol Sci.* 24(6):5941. 10.3390/ijms24065941.
3. **Korlatowicz A.**, Kuśmider M., Szlachta M., Pabian P., Solich J., Dziedzicka-Wasylewska M., Faron-Górecka A. (2021). Identification of Molecular Markers of Clozapine Action in Ketamine-Induced Cognitive Impairment: A GPCR Signaling PathwayFinder Study. *Int J Mol Sci.* 22(22):12203. 10.3390/ijms222212203.
4. Solich J., Faron-Górecka A., Kolasa M., Pabian P., **Korlatowicz-Pasieka A.**, Dziedzicka-Wasylewska M. (2025). Differential Regulation of Proteins Related to the Blood-Brain Barrier in Stress-Resilient and Stress-Susceptible Mice. *J Neurochem.* 169(8):e70172. 10.1111/jnc.70172.
5. Kolasa M., Nikiforuk A., **Korlatowicz A.**, Solich J., Potasiewicz A., Dziedzicka-Wasylewska M., Bugno R., Hogendorf A., Bojarski A., Faron-Górecka A. (2025). Unraveling psilocybin's therapeutic potential: behavioral and neuroplasticity insights in Wistar-Kyoto and Wistar male rat models of treatment-resistant depression. *Psychopharmacology (Berl).* 242(7):1607-1625. 10.1007/s00213-024-06644-3.
6. Chruścicka-Smaga B., Sowa-Kućma M., Pańczyszyn-Trzewik P., Bobula B., **Korlatowicz A.**, Latocha K., Pabian P., Czechowska E., Lenda T., Faron-Górecka A., Stachowicz K. (2025). Evidence for functional interaction between the CB1 and the mGlu7 receptors mediated signaling in modulation of anxiety behavior and cognition. *Life Sci.* 361:123313. 10.1016/j.lfs.2024.123313.
7. Solich J., Kolasa M., Faron-Górecka A., Pabian P., Latocha K., **Korlatowicz A.**, Dziedzicka-Wasylewska M. (2024). Modulating Stress Susceptibility and Resilience:

-
- Insights from miRNA Manipulation and Neural Mechanisms in Mice. *Mol Neurobiol.* 61(9):6135-6147. 10.1007/s12035-024-03922-1.
8. Cieslik-Starkiewicz A., Noworyta K., Solich J., **Korlatowicz A.**, Faron-Górecka A., Rygula R. (2024). Identification of genes regulated by trait sensitivity to negative feedback and prolonged alcohol consumption in rats. *Pharmacol Rep.* 76(1):207-215. 10.1007/s43440-023-00563-4.
 9. Cieslik-Starkiewicz A., Noworyta K., Solich J., **Korlatowicz A.**, Faron-Górecka A., Rygula R. (2024). Trait sensitivity to positive feedback is a predisposing factor for several aspects of compulsive alcohol drinking in male rats: behavioural, physiological, and molecular correlates. *Psychopharmacology (Berl)*. 241(1):33-47. 10.1007/s00213-023-06460-1.
 10. Faron-Górecka A., Kuśmider M., Gruca P., Pabian P., **Korlatowicz A.**, Solich J., Kolasa M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2022). Pro-cognitive effect of acute imipramine administration correlates with direct interaction of BDNF with its receptor, Trk β . *Brain Res.* 1789:147948. 10.1016/j.brainres.2022.147948.
 11. Dziedzicka-Wasylewska M., Solich J., **Korlatowicz A.**, Faron-Górecka A. (2021). What Do the Animal Studies of Stress Resilience Teach Us? *Cells.* 10(7):1630. 10.3390/cells10071630.
 12. Kwapisz O., Górka J., **Korlatowicz A.**, Kotlinowski J., Waligórska A., Marona P., Pydyn N., Dobrucki J.W., Jura J., Miekus K. (2021). Fatty Acids and a High-Fat Diet Induce Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating TGF β and β -Catenin in Liver Cells. *Int J Mol Sci.* 22(3):1272. 10.3390/ijms22031272.
 13. Faron-Górecka A., **Korlatowicz A.**, Pabian P., Niemczyk M., Solich J., Dziedzicka-Wasylewska M. (2022). Czy dimery receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs) mogą stanowić nowy cel terapeutyczny? *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych.* Tom 70, Nr 4. https://doi.org/10.36921/kos.2022_2761
-

12. Literatura

- Ables J. L., Park K., Ibañez-Tallon I. (2023). Understanding the habenula: A major node in circuits regulating emotion and motivation. *Pharmacol Res.* 190:106734. 10.1016/j.phrs.2023.106734
- Aby F., Lorenzo L.-E., Grivet Z., Bouali-Benazzouz R., Martin H., Valerio S., Whitestone S., Isabel D., Idi W., Bouchatta O., De Deurwaerdere P., Godin A.G., Herry C., Fioramonti X., Landry M., De Koninck Y., Fossat P. (2022). Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. *Sci. Adv.* 8(30):eabo0689. 10.1126/sciadv.abo0689
- Adamczyk I., Kukulova D., Just S., Giovannini R., Sigrist H., Amport R., Cuomo-Haymour N., Poggi G., Pryce C.R. (2021). Somatostatin Receptor 4 Agonism Normalizes Stress-Related Excessive Amygdala Glutamate Release and Pavlovian Aversion Learning and Memory in Rodents. *Biol Psychiatry Glob Open Sci.* 2(4):470–479. 10.1016/j.bpsgos.2021.11.006
- Aizawa H., Kobayashi M., Tanaka S., Fukai T., Okamoto H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol.* 520(18):4051–66. 10.1002/cne.23167
- Aleksandrova L. R., Wang Y. T., Phillips A. G. (2019). Evaluation of the Wistar-Kyoto rat model of depression and the role of synaptic plasticity in depression and antidepressant response. *Neurosci Biobehav Rev.* 105:1–23. 10.1016/j.neubiorev.2019.07.007
- Authement M.E., Langlois L.D., Shepard R.D., Browne C.A., Lucki I., Kassis H., Nugent F.S. (2018). A role for corticotrophin releasing factor signaling in the lateral habenula and its modulation by early life stress. *Sci Signal.* 11(520):eaan6480. 10.1126/scisignal.aan6480
- Azevedo J. A., Carter B. S., Meng F., Turner D. L., Dai M., Schatzberg A. F., Barchas J. D., Jones E. G., Bunney W. E., Myers R. M., Akil H., Watson S. J., Thompson R. C. (2017). The microRNA network is altered in anterior cingulate cortex of patients with unipolar and bipolar depression. *J Psychiatr Res.* 82:58–67. 10.1016/j.jpsychires.2016.07.012
- Bala P. A., Foster J., Carvelli L., Henry L. K. (2013). SLC6 Transporters: Structure, Function, Regulation, Disease Association and Therapeutics. *Mol Aspects Med.* 34(2-3):197–219. 10.1016/j.mam.2012.07.002
- Balakathiresan N. S., Chandran R., Bhomia M., Jia M., Li H., Maheshwari R. K. (2014). Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: fear correlation and biomarker potential. *J Psychiatr Res.* 57:65–73. 10.1016/j.jpsychires.2014.05.020
- Barmashenko G., Hefft S., Aertsen A., Kirschstein T., Kohling R. (2011). Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia.* 52:1570–1578. 10.1111/j.1528-1167.2011.03247.x
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2):281–97. 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Boehm S., Betz H. (1997). Somatostatin Inhibits Excitatory Transmission at Rat Hippocampal Synapses via Presynaptic Receptors. *J Neurosci.* 17(11):4066–4075. 10.1523/JNEUROSCI.17-11-04066.1997
- Bogenschutz M. P., Forcehimes A. A., Pommy J. A., Wilcox C. E., Barbosa P. C. R., Strassman R. J. (2015). Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study. *J Psychopharmacol.* 29(3):289–99. 10.1177/0269881114565144

-
- Bonislowski D.P., Schwarzbach E.P., Cohen A.S. (2007). Brain injury impairs dentate gyrus inhibitory efficacy. *Neurobiol Dis.* 25:163–169. doi: 10.1016/j.nbd.2006.09.002.
- Bruzos-Cidón C., Miguelez C, Rodríguez J. J., Gutiérrez-Lanza R., Ugedo L., Torrecilla M. (2014). Altered neuronal activity and differential sensitivity to acute antidepressants of locus coeruleus and dorsal raphe nucleus in Wistar Kyoto rats: a comparative study with Sprague Dawley and Wistar rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24(7):1112-22. 10.1016/j.euroneuro.2014.02.007
- Buchwalter G., Gross C., Wasylyk B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene.* 324:1-14. 10.1016/j.gene.2003.09.028.
- Bunda A., LaCarubba B., Bertolino M., Akiki M., Bath K., Lopez-Soto J., Lipscombe D., Andrade A. (2019). Cacna1b alternative splicing impacts excitatory neurotransmission and is linked to behavioral responses to aversive stimuli. *Mol Brain.* 12(1):81. 10.1186/s13041-019-0500-1.
- Cai L., Xu J., Liu J., Luo H., Yang R., Gui X, Wei L. (2024). miRNAs in treatment-resistant depression: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 51(1):638. 10.1007/s11033-024-09554-x
- Calder A. E., Hasler G. (2022). Towards an understanding of psychedelic-induced neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology.* 48(1):104–112. 10.1038/s41386-022-01389-z
- Caminski E..S, Antunes F.T.T., Souza I.A., Dallegrave E., Zamponi G.W. (2022). Regulation of N-type calcium channels by nociceptin receptors and its possible role in neurological disorders. *Mol Brain.* 15(1):95. 10.1186/s13041-022-00982-z
- Canovas B., Nebreda A.R. (2021). Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22(5):346–366. 10.1038/s41580-020-00322-w
- Carhart-Harris R. L. (2019). How do psychedelics work? *Curr Opin Psychiatry.* 32(1):16-21. doi: 10.1097/YCO.0000000000000467
- Carhart-Harris R. L., Friston K. J. (2019). REBUS and the Anarchic Brain: Toward a Unified Model of the Brain Action of Psychedelics. *Pharmacol Rev.* 2019 Jul;71(3):316–344. 10.1124/pr.118.017160
- Carhart-Harris R. L., Bolstridge M., Rucker J., Day C.M.J., Erritzoe D., Kaelen M., Bloomfield M., Rickard J.A., Forbes B., Feilding A., Taylor D., Pilling S., Curran V.H., Nutt D.J. (2016). Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. *Lancet Psychiatry.* 3(7):619-27. 10.1016/S2215-0366(16)30065-7
- Carhart-Harris, R. L., Bolstridge, M., Day, C. M. J., Rucker, J., Watts, R., Erritzoe, D. E., Kaelen, M., Giribaldi, B., Bloomfield, M., Pilling, S., Rickard, J. A., Forbes, B., Feilding, A., Taylor, D., Curran, H. V., Nutt, D. J. (2018). Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: six-month follow-up. *Psychopharmacology (Berl).* 235(2):399-408. doi: 10.1007/s00213-017-4771-x
- Carhart-Harris R. L., Giribaldi B., Watts R., Baker-Jones M., Murphy-Beiner A., Murphy R., Martell J., Blemings A., Erritzoe D., Nutt D.J. (2021). Trial of Psilocybin versus Escitalopram for Depression. *N Engl J Med.* 384(15):1402-1411. 10.1056/NEJMoa2032994
- Caspi A., Hariri A. R., Holmes A., Uher R., Moffitt T. E. (2010). Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry.* 167(5):509-27. 10.1176/appi.ajp.2010.09101452
- Chapman E. J., Carrington J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet.* 8(11):884-96. 10.1038/nrg2179
-

-
- Chen C., Wang M., Yu T., Feng W., Xu Y., Ning Y., Zhang B. (2024). Habenular functional connections are associated with depression state and modulated by ketamine. *J Affect Disord.* 345:177-185. 10.1016/j.jad.2023.10.136
- Chen R. J., Kelly G., Sengupta A., Heydendael W., Nicholas B., Beltrami S., Luz S., Peixoto L., Abel T., Bhatnagar S. (2015). MicroRNAs as biomarkers of resilience or vulnerability to stress. *Neuroscience.* 305:36-48. 10.1016/j.neuroscience.2015.07.045
- Chen T, Cheng L., Ma J., Yuan J., Pi C., Xiong L., Chen J., Liu H., Tang J., Zhong Y., Zhang X., Liu Z., Zuo Y., Shen H., Wei Y., Zhao L. (2023). Molecular mechanisms of rapid-acting antidepressants: New perspectives for developing antidepressants. *Pharmacol Res.* 194:106837. 10.1016/j.phrs.2023.106837
- Chen Y., Xu H., Zhu M., Liu K., Lin B., Luo R., Chen C., Li M. (2017). Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget.* 8(38):63247–63257. 10.18632/oncotarget.18780
- Colmenares-Aguilar M.G., Urbina M., Obregón F., Fazzino F., Lima L. (2017). Fluoxetine Treatment in Rats Increases the Rate of Taurine Transport in Mononuclear Cells. *Neuroimmunomodulation.* 24(3):132-142. 10.1159/000480733
- Cominski T. P., Jiao X., Catuzzi J. E., Stewart A. L., Pang K. C. (2014). The Role of the Hippocampus in Avoidance Learning and Anxiety Vulnerability. *Front Behav Neurosci.* 8:273. 10.3389/fnbeh.2014.00273
- Crispino M., Volpicelli F., Perrone-Capano C. (2020). Role of the Serotonin Receptor 7 in Brain Plasticity: From Development to Disease. *Int J Mol Sci.* 21(2):505. 10.3390/ijms21020505
- Dandekar M. P., Fenoy A.J., Carvalho A.F., Soares J. C., Quevedo J. (2018). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: an integrative review of preclinical and clinical findings and translational implications. *Mol Psychiatry.* 23(5):1094-1112. 10.1038/mp.2018.2
- Davoudian P. A., Shao L.-X., Kwan A. C. (2023). Shared and Distinct Brain Regions Targeted for Immediate Early Gene Expression by Ketamine and Psilocybin. *ACS Chem Neurosci.* 14(3):468-480. 10.1021/acscchemneuro.2c00637
- Daws R.E., Timmermann C., Giribaldi B., Sexton J.D., Wall M.B., Erritzoe D., Roseman L., Nutt D., Carhart-Harris R. (2022). Increased global integration in the brain after psilocybin therapy for depression. *Nat Med.* 28(4):844-851. 10.1038/s41591-022-01744-z
- De La Garza R., Mahoney J. J. (2004). A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline and in response to acute stress: implications for animal models of anxiety and depression. *Brain Res.* 1021(2):209-18. 10.1016/j.brainres.2004.06.052
- Dean J., Keshavan M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr.* 27:101-111. 10.1016/j.ajp.2017.01.025
- Detke M. J., Lucki J. J. (1997). Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* 5(2):107-12. 10.1037//1064-1297.5.2.107
- Dinis-Oliveira R. J. (2017). Metabolism of psilocybin and psilocin: clinical and forensic toxicological relevance. *Drug Metab Rev.* 49(1):84-91. 10.1080/03602532.2016.1278228
-

EMA – European Medicines Agency. Esketamine Nasal Spray Summary of Product Characteristics 2021. Dostępny online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spravato> (dostęp 6.11.2024)

Farinha-Ferreira M., Magalhães D. M., Neuparth-Sottomayor M., Rafael H., Miranda-Lourenço C., Sebastião A. M. (2024). Unmoving and uninflamed: Characterizing neuroinflammatory dysfunction in the Wistar-Kyoto rat model of depression. *J Neurochem.* 168(9):2443-2460. 10.1111/jnc.16083

Faron-Gorecka A., Kusmider M., Kolasa M., Zurawek D., Szafran-Pilch K., Gruca P., Pabian P., Solich J., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2015). Chronic mild stress alters the somatostatin receptors in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl).* 233:255–266. 10.1007/s00213-015-4103-y

Fazzino F., Obregón F., Morles M., Rojas A., Arocha L., Mata S., Lima L. (2009). Taurine transporter in lymphocytes of patients with major depression treated with venlafaxine plus psychotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 643:217-24. 10.1007/978-0-387-75681-3_22

FDA – Food and Drug Administration. Spravato Prescribing Information 2019. Dostępny online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211243lbl.pdf. (dostęp 6.11.2024)

Funk D., Araujo J., Slassi M., Lanthier J., Atkinson J., Feng D., Lau W., Lê A., Higgins G.A. (2024). Effect of a single psilocybin treatment on Fos protein expression in male rat brain. *Neuroscience.* 539:1-11. 10.1016/j.neuroscience.2024.01.001

Gackière F., Vinay L. (2014). Serotonergic modulation of postsynaptic inhibition and locomotor alternating pattern in the spinal cord. *Front Neural Circuits.* 2014;8:102. 10.3389/fncir.2014.00102

Gattuso J. J., Perkins D., Ruffell S., Lawrence A. J., Hoyer D., Jacobson L. H., Timmermann C., Castle D., Rossell S. L., Downey L. A., Pagni B. A., Galvão-Coelho N. L., Nutt D., Sarris J. (2022). Default Mode Network Modulation by Psychedelics: A Systematic Review. *Int J Neuropsychopharmacol.* 26(3):155-188. 10.1093/ijnp/pyac074

Gilardi C., Martins H. C., Levone B. R., Lo Bianco A., Bicker S., Germain P.-L., Gross F., Sungur A. Ö., Kisko T. M., Stein F., Meinert S., Schwarting R. K. W., Wöhr M., Dannlowski U., Kircher T., Schrat G. (2025). miR-708-5p is elevated in bipolar patients and can induce mood disorder-associated behavior in mice. *EMBO Rep.* 10.1038/s44319-025-00410-y

Goodwin, G. M., Aaronson, S. T., Alvarez, O., Arden, P. C., Baker, A., Bennett, J. C., Bird, C., Blom, R. E., Brennan, C., Brusch, D., Burke, L., Campbell-Coker, K., Carhart-Harris, R., Cattell, J., Daniel, A., DeBattista, C., Dunlop, B. W., Eisen, K., Feifel, D., Forbes, M., Haumann, H. M., Hellerstein, D. J., Hoppe, A. I., Husain, M. I., Jelen, L. A., Kamphuis, J., Kawasaki, J., Kelly, J. R., Key, R. E., Kishon, R., Knatz Peck, S., Knight, G., Koolen, M. H. B., Lean, M., Licht, R. W., Maples-Keller, J. L., Mars, J., Marwood, L., McElhiney, M. C., Miller, T. L., Mirow, A., Mistry, S., Mletzko-Crowe, T., Modlin, L. N., Nielsen, R. E., Nielson, E. M., Offerhaus, S. R., O'Keane, V., Páleníček, T., Printz, D., Rademaker, M. C., van Reemst, A., Reinholdt, F., Repantis, D., Rucker, J., Rudow, S., Ruffell, S., Rush, A. J., Schoevers, R. A., Seynaeve, M., Shao, S., Soares, J. C., Somers, M., Stansfield, S. C., Sterling, D., Strockis, A., Tsai, J., Visser, L., Wahba, M., Williams, S., Young, A. H., Ywema, P., Zisook, S., Malievskaia, E. (2022). Single-Dose Psilocybin for a Treatment-Resistant Episode of Major Depression. *N Engl J Med.* 387(18):1637-1648. 10.1056/NEJMoa2206443

Griebel G., Cohen C., Perrault D., Sanger D.J. (1999). Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in Wistar-Kyoto rats. *Physiol Behav.* 67(3):315-20. 10.1016/s0031-9384(98)00298-4

-
- Griffiths R. R., Johnson M. W., Carducci M. A., Umbricht A., Richards W. A., Richards B. D., Cosimano M. P., Klinedinst M. A. (2016). Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial. *J Psychopharmacol.* 30(12):1181-1197. 10.1177/0269881116675513.
- Groos D., Helmchen F. (2024). The lateral habenula: A hub for value-guided behavior. *Cell Rep.* 43(4):113968. 10.1016/j.celrep.2024.113968.
- Guo Y., Zhang L., Zhang J., Lv S.X., Du C.X., Wang T., Wang H.S., Xie W., Liu J. (2021). Activation and Blockade of Serotonin-4 Receptors in the Lateral Habenula Produce Antidepressant Effects in the Hemiparkinsonian Rat. *Neuropsychobiology.* 80:52–63. 10.1159/000508680
- 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.* 48:492–502. 10.1016/j.neuropharm.2004.11.015
- Hagena H., Manahan-Vaughan D. (2017). The serotonergic 5-HT₄ receptor: A unique modulator of hippocampal synaptic information processing and cognition. *Neurobiol Learn Mem.* 138:145-153. 10.1016/j.nlm.2016.06.014
- Han L.N., Zhang L., Sun Y.N., Du C.X., Zhang Y.M., Wang T., Zhang J., Liu J. (2016). Serotonin₇ receptors in the lateral habenular nucleus regulate depressive-like behaviors in the hemiparkinsonian rats. *Brain Res.* 1644:79-87. 10.1016/j.brainres.2016.05.016
- Haridy R. (2023). Australia to prescribe MDMA and psilocybin for PTSD and depression in world first. *Nature.* 619(7969):227-228. 10.1038/d41586-023-02093-8
- Hartogsohn I. (2016). Set and setting, psychedelics and the placebo response: an extra-pharmacological perspective on psychopharmacology. *J. Psychopharmacol.* 30, 1259–1267. 10.1177/0269881116677852
- He J.-R., Zhang Y., Lu W.-J., Liang H.-B., Tu X.-Q., Ma F.-Y., Yang G.-Y., Zeng L.-L. (2017). Age-Related Frontal Periventricular White Matter Hyperintensities and miR-92a-3p Are Associated with Early-Onset Post-Stroke Depression. *Front Aging Neurosci.* 9:328. 10.3389/fnagi.2017.00328
- Heerlein K., Perugi G., Otte C., Frodl T., Degraeve G., Hagedoorn W., Oliveira-Maia A. J., Perez Sola V., Rathod S., Rosso G., Sierra P., Malynn S., Morrens J., Verrijcken C., Gonzalez B., Young A. H. (2021). Real-world evidence from a European cohort study of patients with treatment resistant depression: Treatment patterns and clinical outcomes. *J Affect Disord.* 290:334-344. 10.1016/j.jad.2021.03.073
- Hewitt S.A., Wamsteeker J.I., Kurz E.U., Bains J.S. (2009). Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. *Nat Neurosci.* 12:438–443. 10.1038/nn.2274
- Hibicke M., Kramer H.M., Nichols C.D. (2023). A single administration of psilocybin persistently rescues cognitive deficits caused by adolescent chronic restraint stress without long-term changes in synaptic protein gene expression in a rat experimental system with translational relevance to depression. *Psychedelic Med.* 1:54–67. 10.1089/psymed.2022.0012
- Hibicke M., Landry A.N., Kramer H.M., Talman Z.K., Nichols C.D. (2020). Psychedelics, but Not Ketamine, Produce Persistent Antidepressant-like Effects in a Rodent Experimental System for the Study of Depression. *ACS Chem Neurosci.* 11(6):864-871. 10.1021/acscchemneuro.9b00493
-

-
- Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90(1):291-366. 10.1152/physrev.00021.2009
- Higgins G.A., Carroll N.K., Brown M., MacMillan C., Silenieks L.B., Thevarkunnel S., Izhakova J., Magomedova L., DeLannoy I., Sellers E.M. (2021). Low Doses of Psilocybin and Ketamine Enhance Motivation and Attention in Poor Performing Rats: Evidence for an Antidepressant Property. *Front Pharmacol.* 12:640241. 10.3389/fphar.2021.640241
- Hones V. I., Mizumori S. J. Y. (2022). Response Flexibility: The Role of the Lateral Habenula. *Front Behav Neurosci.* 16:852235. 10.3389/fnbeh.2022.852235
- Huang L., Xi Y., Peng Y., Yang Y., Huang X., Fu Y., Tao Q., Xiao J., Yuan T., An K., Zhao H., Pu M., Xu F., Xue T., Luo M., So K-F., Ren C. (2019). A Visual Circuit Related to Habenula Underlies the Antidepressive Effects of Light Therapy. *Neuron.* 102(1):128-142.e8. 10.1016/j.neuron.2019.01.037
- Huang L., Xiao D., Sun H., Qu Y., Su X. (2022). Behavioral tests for evaluating the characteristics of brain diseases in rodent models: Optimal choices for improved outcomes. *Mol Med Rep.* 25(5):183. 10.3892/mmr.2022.12699
- Imaizumi Y., Furutachi S., Watanabe T., Miya H., Kawaguchi D., Gotoh Y. (2020). Role of the imprinted allele of the *Cdkn1c* gene in mouse neocortical development. *Sci Rep.* 10:1884. 10.1038/s41598-020-58629-9
- Jaster A. M., de la Fuente Revenga M., González-Maeso J. (2021). Molecular targets of psychedelic-induced plasticity. *J Neurochem.* 162(1):80–88. 10.1111/jnc.15536
- Jastrzębska J., Frankowska M., Szumiec Ł., Sadakierska-Chudy A., Haduch A., Smaga I., Bystrowska B., Daniel W. A., Filip M. (2015). Cocaine self-administration in Wistar-Kyoto rats: a behavioral and biochemical analysis. *Behav Brain Res.* 293:62-73. 10.1016/j.bbr.2015.06.040.
- Jefsen, O. H., Elfving, B., Wegener, G., Müller, H. K. (2021). Transcriptional regulation in the rat prefrontal cortex and hippocampus after a single administration of psilocybin. *J Psychopharmacol.* 35(4):483-493. 10.1177/0269881120959614
- Jhou T.C., Fields H.L., Baxter M.G., Saper C.B., Holland P.C. (2009). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron.* 61(5):786-800. 10.1016/j.neuron.2009.02.001
- Ji X., Zhao Z. (2023). Exposure to enriched environment ameliorated chronic unpredictable mild stress-induced depression-like symptoms in rats via regulating the miR-92a-3p/kruppel-like factor 2 (KLF2) pathway. *Brain Res Bull.* 195:14-24. 10.1016/j.brainresbull.2023.01.002
- Jiao X., Paré W. P., Tejani-Butt S. (2003). Strain differences in the distribution of dopamine transporter sites in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27(6):913-9. 10.1016/S0278-5846(03)00150-7
- Jimenez-Sanchez L., Campa L., Auberson Y. P., Adell A. (2014). The role of GluN2A and GluN2B subunits on the effects of NMDA receptor antagonists in modeling schizophrenia and treating refractory depression. *Neuropsychopharmacology.* 39:2673–2680. 10.1038/npp.2014.123
- Johnson M. W., Garcia-Romeu A., Cosimano M. P., Griffiths R. R. (2014). Pilot study of the 5-HT_{2A}R agonist psilocybin in the treatment of tobacco addiction. *J Psychopharmacol.* 28(11):983-92. 10.1177/0269881114548296
-

-
- Jurkiewicz M., Moser D., Koller A., Yu L., Chen E. I., Bennett D. A., Canli T. (2020). Integration of postmortem amygdala expression profiling, GWAS, and functional cell culture assays: neuroticism-associated synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) gene is regulated by miR-133a and miR-218. *Transl Psychiatry*. 10:297. 10.1038/s41398-020-00966-4
- Kadam S.D., Hegarty S. V. (2024). Development of KCC2 therapeutics to treat neurological disorders. *Front Mol Neurosci*. 17:1503070. 10.3389/fnmol.2024.1503070
- Kahle K. T., Deeb T. Z., Puskarjov M., Silayeva L., Liang B., Kaila K., Moss S. J. (2013). Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends Neurosci*. 36(12):726-737. 10.1016/j.tins.2013.08.006
- Kaurani L. (2024). Clinical Insights into MicroRNAs in Depression: Bridging Molecular Discoveries and Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci*. 25(5):2866. 10.3390/ijms25052866
- Kavuran Buran I., Onalan Etem E., Tektemur A. (2022). Inhibition of TRPC1, TRPM4 and CHRNA6 ion channels ameliorates depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res*. 423:113765. 10.1016/j.bbr.2022.113765
- Kim U., Lee T. (2012). Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. *Eur J Neurosci*. 35(8):1253-69. 10.1111/j.1460-9568.2012.08030.x
- Kim U., Chang S.Y. (2005). Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J Comp Neurol*. 483:236–250. 10.1002/cne.20410
- Kimmey B.A., Ostroumov A., Dani J.A. (2019). 5-HT_{2A} receptor activation normalizes stress-induced dysregulation of GABAergic signaling in the ventral tegmental area. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116(52):27028–34. 10.1073/pnas.1911446116
- Kolasa M., Faron-Górecka A. (2023). Preclinical models of treatment-resistant depression: challenges and perspectives. *Pharmacol Rep*. 75(6):1326-1340. 10.1007/s43440-023-00542-9
- Kolasa M., Nikiforuk A., Korlatowicz A., Solich J., Potasiewicz A., Dziedzicka-Wasylewska M., Bugno R., Hogendorf A., Bojarski A., Faron-Górecka A. (2024). Unraveling psilocybin's therapeutic potential: behavioral and neuroplasticity insights in Wistar-Kyoto and Wistar male rat models of treatment-resistant depression. 10.1007/s00213-024-06644-3
- Korlatowicz A., Kolasa M., Pabian P., Solich J., Latocha K., Dziedzicka-Wasylewska M., Faron-Górecka A. (2023). Altered Intracellular Signaling Associated with Dopamine D2 Receptor in the Prefrontal Cortex in Wistar Kyoto Rats. *Int J Mol Sci*. 24(6):5941. 10.3390/ijms24065941
- Koromina M., Ravi A., Panagiotaropoulou G., Schilder B.M., Humphrey J., Braun A., Bidgeli T., Chatzinakos C., Coombes B.J., Kim J., Liu X., Terao C., O'Connell K.S., Adams M.J., Adolfsson R., Alda M., Alfredsson L., Andlauer T.F.M., Andreassen O.A., Antoniou A., Baune B.T., Bengesser S., Biernacka J., Boehnke M., Bosch R., Cairns M.J., Carr V.J., Casas M., Catts S., Cichon S., Corvin A., Craddock N., Dafnas K., Dalkner N., Dannlowski U., Degenhardt F., Di Florio A., Dikeos D., Fellendorf F.T., Ferentinos P., Forstner A.J., Forty L., Frye M., Fullerton J.M., Gawlik M., Gizer I.R., Gordon-Smith K., Green M.J., Grigoriou-Serbanescu M., Guzman-Parra J., Hahn T., Henskens F., Hillert J., Jablensky A.V., Jones L., Jones I., Jonsson L., Kelsoe J.R., Kircher T., Kirov G., Kittel-Schneider S., Kogevinas M., Landén M., Leboyer M., Lenger M., Lissowska J., Lochner C., Loughland C., MacIntyre
-

-
- D.J., Martin N.G., Maratou E., Mathews C.A., Mayoral F., McElroy S.L., McGregor N.W., McIntosh A., McQuillin A., Michie P., Mitchell P.B., Moutsatsou P., Mowry B., Müller-Myhsok B., Myers R.M., Nenadić I., Nievergelt C.M., Nöthen M.M., Nurnberger J., O'Donovan M., O'Donovan C., Ophoff R.A., Owen M.J., Pantelis C., Pato C., Pato M.T., Patrinos G.P., Pawlak J.M., Perlis R.H., Porichi E., Posthuma D., Ramos-Quiroga J.A., Reif A., Reininghaus E.Z., Ribasés M., Rietschel M., Schall U., Schofield P.R., Schulze T.G., Scott L., Scott R.J., Serretti A., Smoller J.W., Świątkowska B., Soler Artigas M., Stein D.J., Streit F., Toma C., Tooney P., Vawter M.P., Vieta E., Vincent J.B., Waldman I.D., Weickert C.S., Weickert T., Witt S.H., Hong K.S., Ikeda M., Iwata N., Won H.H., Edenberg H.J., Ripke S., Raj T., Coleman J.R.I., Mullins N. (2025). Fine-mapping genomic loci refines bipolar disorder risk genes. 28(7):1393–1403. 10.1038/s41593-025-01998-z
- Kutzsche J., Guzman G.A., Willuweit A., Kletke O., Wollert E., Gering I., Jürgens D., Breikreutz J., Stark H., Beck-Sickinger A.G., Klöcker N., Hidalgo P., Willbold D. (2024). An orally available Cav2.2 calcium channel inhibitor for the treatment of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 181(12):1734-1756. 10.1111/bph.16309
- Kyeremanteng C., James J., Mackay J., Merali Z. (2012). A study of brain and serum brain-derived neurotrophic factor protein in Wistar and Wistar-Kyoto rat strains after electroconvulsive stimulus. *Pharmacopsychiatry.* 45(6):244-9. 10.1055/s-0032-1306278
- Kyeremanteng C., MacKay J. C., James J. S., Kent P., Cayer C., Anisman H., Merali Z. (2014). Effects of electroconvulsive seizures on depression-related behavior, memory and neurochemical changes in Wistar and Wistar-Kyoto rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 54:170-8. 10.1016/j.pnpbp.2014.05.012
- Lahmame A., Armario A. (1996). Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? *Psychopharmacology (Berl).* 123(2):191-8. 10.1007/BF02246177
- Lahmame A., del Arco C., Pazos A., Yritia M., Armario A. (1997). Are Wistar-Kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants. *Eur J Pharmacol.* 337(2-3):115-23. 10.1016/s0014-2999(97)01276-4
- Lai C.-Y., Lee S.-Y., Scarr E., Yu Y.-H., Lin Y.-T., Liu C.-M., Hwang T.-J., Hsieh M. H., Liu C.-C., Chien Y.-L., Udawela M., Gibbons A. S., Everall I. P., Hwu H.-G., Dean B., Chen W. J. (2016). Aberrant expression of microRNAs as biomarker for schizophrenia: from acute state to partial remission, and from peripheral blood to cortical tissue. *Transl Psychiatry.* 6(1):e717. 10.1038/tp.2015.213
- Lambert G., Johansson M., Agren H., Friberg P. (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 57(8):787-93. 10.1001/archpsyc.57.8.787
- Lazaridis I., Tzortzi O., Weglage M., Martin A., Xuan Y., Parent M., Johansson Y., Fuzik J., Fürth D., Fenno L. E., Ramakrishnan C., Silberberg G., Deisseroth K., Carlén M., Meletis K. (2019). A hypothalamus-habenula circuit controls aversion. 24(9):1351-1368. 10.1038/s41380-019-0369-5
- Lecca S., Pelosi A., Tchenio A., Moutkine I., Lujan R., Hervé D., Mameli M. (2016). Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nat Med.* 22(3):254-61. 10.1038/nm.4037
-

-
- Lee M. Y., Baxter D., Scherler K., Kim T.-K., Wu X., Abu-Amara D., Flory J., Yehuda R., Marmar C., Jett M., Lee I., Wang K., Hood L. (2019). Distinct Profiles of Cell-Free MicroRNAs in Plasma of Veterans with Post-Traumatic Stress Disorder. *J Clin Med.* 8(7):963. 10.3390/jcm8070963
- Lei Y., Yaroslavsky I., Tejani-Butt S. M. (2009). Strain differences in the distribution of N-methyl-d-aspartate and gamma (γ)-aminobutyric acid-A receptors in rat brain. *Life Sci.* 85(23-26):794-9. 10.1016/j.lfs.2009.10.010
- Lemos J. C., Zhang G., Walsh T., Kirby L. G., Akanwa A., Brooks-Kayal A., Beck S. G. (2010). Stress-Hyperresponsive WKY Rats Demonstrate Depressed Dorsal Raphe Neuronal Excitability and Dysregulated CRF-Mediated Responses. *Neuropsychopharmacology.* 36(4):721–734. 10.1038/npp.2010.200
- Li G., Bo B., Wang P., Qian P., Li M., Li Y., Tong C., Zhang K., Zhang B., Jiang T., Liang Z., Duan X. (2023). Instantaneous antidepressant effect of lateral habenula deep brain stimulation in rats studied with functional MRI. *Elife.* 12:e84693. 10.7554/eLife.84693
- Li J., Kang S., Fu R., Wu L., Wu W., Liu H., Gregor D., Zuo W., Bekker A., Ye J.-H. (2017). Inhibition of AMPA receptor and CaMKII activity in the lateral habenula reduces depressive-like behavior and alcohol intake in rats. *Neuropharmacology* 126, 108–120. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.035
- Li J., Zhang L., Xu C., Lin Y.-H., Zhang Y., Wu H.-Y., Chang L., Zhang Y.-D., Luo C.-X., Li F., Zhu D.-Y. (2020). Prolonged use of NMDAR antagonist develops analgesic tolerance in neuropathic pain via nitric oxide reduction-induced GABAergic disinhibition. *Neurotherapeutics.* 17(3):1016-1030. 10.1007/s13311-020-00883-w
- Li L., Chen S.-R., Chen H., Wen L., Hittelman W.N., Xie J.-D., Pan H.-L. (2016). Chloride homeostasis critically regulates synaptic NMDA receptor activity in neuropathic pain. *Cell Rep.* 15(7):1376-1383. 10.1016/j.celrep.2016.04.039
- Li Q.-Q., Chen J., Hu P., Jia M., Sun J.-H., Feng H.-Y., Qiao F.-C., Zang Y.-Y., Shi Y.-Y., Chen G., Sheng N., Xu Y., Yang J.-J., Xu Z., Shi Y.S. (2022). Enhancing GluN2A-type NMDA receptors impairs long-term synaptic plasticity and learning and memory. *Mol Psychiatry.* 27(8):3468-3478. 10.1038/s41380-022-01579-7
- Li X.-T. (2024). The involvement of K⁺ channels in depression and pharmacological effects of antidepressants on these channels. *Transl Psychiatry.* 14(1):411. 10.1038/s41398-024-03069-6
- Li Y. J., Xu M., Gao Z. H., Wang Y. Q., Yue Z., Zhang Y. X., Li X. X., Zhang C., Xie S. Y., Wang P. Y. (2013). Alterations of Serum Levels of BDNF-Related miRNAs in Patients with Depression. *PLoS One.* 8(5):e63648. 10.1371/journal.pone.0063648
- Li Y., Li S., Yan J., Wang D., Yin R., Zhao L., Zhu Y., Zhu X. (2016). miR-182 (microRNA-182) suppression in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 65:96-103. 10.1016/j.pnpbp.2015.09.004
- Liao X., Li Y. (2020). Genetic associations between voltage-gated calcium channels and autism spectrum disorder: a systematic review. *Mol Brain.* 13:96. 10.1186/s13041-020-00634-0
- Liu Q., Zhu L., Liu X., Zheng J., Liu Y., Ruan X., Cao S., Cai H., Li Z., Xue Y. (2020). TRA2A-induced upregulation of LINC00662 regulates blood-brain barrier permeability by affecting ELK4 mRNA stability in Alzheimer's microenvironment. *RNA Biol.* 17(9):1293-1308. 10.1080/15476286.2020.1756055
-

-
- Loizeau V., Durieux L., Mendoza J., Wiborg O., Barbelivien A., Lecourtier L. (2024). Behavioural characteristics and sex differences of a treatment-resistant depression model: Chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat. *Behav Brain Res.* 457:114712. 10.1016/j.bbr.2023.114712
- Lundbye C.J., Toft A.K.H., Banke T.G. (2018). Inhibition of GluN2A NMDA receptors ameliorates synaptic plasticity deficits in the *Fmr1*^{-/-} mouse model. *J Physiol.* 596(20):5017–5031. 10.1113/JP276304
- Luo H., de Velasco E. M. F., Wickman K. (2022). Neuronal G protein-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 323(2):C439–C460. 10.1152/ajpcell.00102.2022
- Ma J., Shang S., Wang J., Zhang T., Nie F., Song X., Zhao H., Zhu C., Zhang R., Hao D. (2018). Identification of miR-22-3p, miR-92a-3p, and miR-137 in peripheral blood as biomarker for schizophrenia. 265:70-76. 10.1016/j.psychres.2018.03.080.
- MacKenzie G., Jamie Maguire. (2015). Chronic stress shifts the GABA reversal potential in the hippocampus and increases seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 0:13-27. 10.1016/j.epilepsyres.2014.10.003
- Madsen M. K., Fisher P. M., Burmester D., Dyssegaard A., Stenbæk D. S., Kristiansen S., Johansen S. S., Lehel S., Linnet K., Svarer C., Erritzoe D., Ozenne B., Knudsen G. M. (2019). Psychedelic effects of psilocybin correlate with serotonin 2A receptor occupancy and plasma psilocin levels. *Neuropsychopharmacology.* 44(7):1328-1334. 10.1038/s41386-019-0324-9
- Marabita F., de Candia P., Torri A., Tegnér J., Abrignani S., Rossi R. L. (2016). Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 17:204–212. 10.1093/bib/bbv056
- Mayo S., Gomez-Manjon I., Marco-Hernandez A.V., Fernandez-Martinez F.J., Camacho A., Martinez F. (2023). N-Type Ca Channel in Epileptic Syndromes and Epilepsy: A Systematic Review of Its Genetic Variants. *Int J Mol Sci.* 24(7):6100. 10.3390/ijms24076100
- McDonnell C. W., Dunphy-Doherty F., Rouine J., Bianchi M., Upton N., Sokolowska E., Prenderville J. A. (2021). The Antidepressant-Like Effects of a Clinically Relevant Dose of Ketamine Are Accompanied by Biphasic Alterations in Working Memory in the Wistar Kyoto Rat Model of Depression. *Front Psychiatry.* 11:599588. 10.3389/fpsy.2020.599588
- McIntyre, R. S., Rosenblat, J. D., Nemeroff, C. B., Sanacora, G., Murrough, J. W., Berk, M., Brietzke, E., Dodd, S., Gorwood, P., Ho, R., Iosifescu, D. V., Lopez Jaramillo, C., Kasper, S., Kratiuk, K., Lee, J. G., Lee, Y., Lui, L. M. W., Mansur, R. B., Papakostas, G. I., Subramaniapillai, M., Thase, M., Vieta, E., Young, A. H., Zarate Jr, C. A., Stahl, S. (2021). Synthesizing the Evidence for Ketamine and Esketamine in Treatment-Resistant Depression: An International Expert Opinion on the Available Evidence and Implementation. *Am J Psychiatry.* 178(5):383-399. 10.1176/appi.ajp.2020.20081251
- Meng H., Wang Y., Huang M., Lin W., Wang S., Zhang B. (2011). Chronic deep brain stimulation of the lateral habenula nucleus in a rat model of depression. *Brain Res.* 1422:32-8. 10.1016/j.brainres.2011.08.041
- Meye F. J., Lecca S., Valentinova K., Mameli M. (2013). Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front Hum Neurosci.* 7:860. 10.3389/fnhum.2013.00860
- Millard S.J., Lum J.S., Fernandez F., Weston-Green K., Newell K.A. (2021). The effects of perinatal fluoxetine exposure on emotionality behaviours and cortical and hippocampal glutamatergic receptors
-

in female Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 108:110174. 10.1016/j.pnpbp.2020.110174

Millard S.J., Lum J.S., Fernandez F., Weston-Green K., Newell K.A. (2019). Perinatal exposure to fluoxetine increases anxiety- and depressive-like behaviours and alters glutamatergic markers in the prefrontal cortex and hippocampus of male adolescent rats: A comparison between Sprague-Dawley rats and the Wistar-Kyoto rat model of depression. *J Psychopharmacol*. 33(2):230-243. 10.1177/0269881118822141

Mitten E.H., Souders A., Fernandez de Velasco E.M., Aguado C., Lujan R., Wickman K. (2025). Chronic ethanol exposure in mice evokes pre- and postsynaptic deficits in GABAergic transmission in ventral tegmental area GABA neurons. *Br J Pharmacol*. 182(1):69-86. 10.1111/bph.17335

Moliner R., Giryh M., Brunello C. A., Kovaleva V., Biojone C., Enkavi G., Antenucci L., Kot E. F., Goncharuk S. A., Kaurinkoski K., Kuutti M., Fred S. M., Elsilä L. V., Sakson S., Cannarozzo C., Diniz C. R. A. F., Seiffert N., Rubiolo A., Haapaniemi H., Meshi E., Nagaeva E., Öhman T., Róg T., Kankuri E., Vilar M., Varjosalo M., Korpi E. R., Permi P., Mineev K. S., Saarma M., Vattulainen I., Casarotto P. C., Castrén E. (2023). Psychedelics promote plasticity by directly binding to BDNF receptor TrkB. *Nat Neurosci*. 26(6):1032-1041. 10.1038/s41593-023-01316-5

Monteggia L. M., Heimer H., Nestler E. J. (2018). Meeting Report: Can We Make Animal Models of Human Mental Illness? *Biol Psychiatry*. 84(7):542-545. 10.1016/j.biopsych.2018.02.010

Munoz-Llanos M., Garcia-Perez M. A., Xu X., Tejos-Bravo M., Vidal E. A., Moyano T. C., Gutierrez R. A., Aguayo F. I., Pacheco A., Garcia-Rojo G., Aliaga E., Rojas P. S., Cidlowski J. A., Fiedler J. L. (2018). MicroRNA Profiling and Bioinformatics Target Analysis in Dorsal Hippocampus of Chronically Stressed Rats: Relevance to Depression Pathophysiology. *Front Mol Neurosci*. 11:251. 10.3389/fnmol.2018.00251

Murphy J. A., Sarris J., Byrne G. J. (2017). A Review of the Conceptualisation and Risk Factors Associated with Treatment-Resistant Depression. *Depress Res Treat*. 2017:4176825. 10.1155/2017/4176825

Nagasawa M., Otsuka T., Yasuo S., Furuse M. (2015). Chronic imipramine treatment differentially alters the brain and plasma amino acid metabolism in Wistar and Wistar Kyoto rats. *Eur J Pharmacol*. 762:127-35. 10.1016/j.ejphar.2015.05.043

Nam H., Clinton S. M., Jackson N. L., Kerman I. A. (2014). Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. *Front Behav Neurosci* 8:109. 10.3389/fnbeh.2014.00109

Nelson T.D., Rosen J.D., Bhupathy M., McNamara J., Sowa M.J., Rush C., Crocker L.S. (2003). Tetrabenzyl pyrophosphate organic syntheses (major reference works). Dostępny online: <https://onlinelibrary.wiley.com/>. pp 219–226

Nemoto T., Mano A., Shibasaki T. (2013). miR-449a Contributes to Glucocorticoid-Induced CRF-R1 Downregulation in the Pituitary During Stress. *Mol Endocrinol*. 27(10):1593–1602. 10.1210/me.2012-1357

Novick A., Yaroslavsky I., Tejani-Butt S. (2008). Strain differences in the expression of dopamine D1 receptors in Wistar-Kyoto (WKY) and Wistar rats. *Life Sci*. 83(1-2):74-8. 10.1016/j.lfs.2008.05.006

-
- Nuno-Perez A., Mondoloni S., Tchenio A., Lecca S., Mameli M. (2021). Biophysical and synaptic properties of NMDA receptors in the lateral habenula. *Neuropharmacology*. 196:108718. 10.1016/j.neuropharm.2021.108718
- Okamoto K., Aoki K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 27:282-93. 10.1253/jcj.27.282
- Oliveira-Maia A. J., Bobrowska A., Constant E., Ito T., Kambarov Y., Luedke H., Mulhern-Haughey S., von Holt C. (2023). Treatment-Resistant Depression in Real-World Clinical Practice: A Systematic Literature Review of Data from 2012 to 2022. *Adv Ther*. 41(1):34–64. 10.1007/s12325-023-02700-0
- Papp E., Rivera C., Kaila K., Freund T.F. (2008). Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*. 154:677–689. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.072
- Papp M., Gruca P., Faron-Górecka A., Kusmider M., Willner P. (2019). Genomic Screening of Wistar and Wistar-Kyoto Rats Exposed to Chronic Mild Stress and Deep Brain Stimulation of Prefrontal Cortex. *Neuroscience*. 423:66-75. 10.1016/j.neuroscience.2019.10.015
- Paxinos G., Watson C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. International Standard Book Number: 0–12–547617–5. Academic Press, Cambridge
- Pena-Bautista C., Tarazona-Sanchez A., Braza-Boils A., Balaguer A., Ferre-Gonzalez L., Canada-Martinez A. J., Baquero M., Chafer-Pericas C. (2022). Plasma microRNAs as potential biomarkers in early Alzheimer disease expression. *Sci Rep*. 12:15589. 10.1038/s41598-022-19862-6
- Petković A., Chaudhury D. (2022). Encore: Behavioural animal models of stress, depression and mood disorders. *Front Behav Neurosci*. 16:931964. 10.3389/fnbeh.2022.931964
- Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29:e45. 10.1093/nar/29.9.e45
- Phan N.N., Wang C.Y., Chen C.F., Sun Z., Lai M.D., Lin Y.C. (2017). Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett*. 14(2):2059-2074. 10.3892/ol.2017.6457
- Pouyan, N., Halvaei Khankahdani, Z., Younesi Sisi, F., Lee, Y., Rosenblat, J. D., Teopiz, K. M., Lui, L. M. W., Subramaniapillai, M., Lin, K., Nasri, F., Rodrigues, N., Gill, H., Lipsitz, O., Cao, B., Ho, R., Castle, D., McIntyre, R. S. (2022). A Research Domain Criteria (RDoC)-Guided Dashboard to Review Psilocybin Target Domains: A Systematic Review. *CNS Drugs*. 36(10):1031–1047. 10.1007/s40263-022-00944-y
- Prevot T.D., Gastambide F., Viollet C., Henkous N., Martel G., Epelbaum J., Beracochea D., Guillou J.-L. (2017). Roles of Hippocampal Somatostatin Receptor Subtypes in Stress Response and Emotionality. *Neuropsychopharmacology*. 42(8):1647–1656. 10.1038/npp.2016.281
- Proulx C.D., Hikosaka O., Malinow R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neuro sci*. 17(9):1146–52. 10.1038/nn.3779
- Ramaker M. J., Dulawa S. C. (2017). Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Mol Psychiatry*. 22(5):656-665. 10.1038/mp.2017.36
-

-
- Ranft K., Dobrowolny H., Krell D., Biela H., Bogerts B., Bernstein H. G. (2010). Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. *Psychol Med.* 40(4):557-67. 10.1017/S0033291709990821
- Ray TS. (2010). Psychedelics and the human receptorome. *PLoS One.* 5(2):e9019. 10.1371/journal.pone.0009019
- Redei E. E., Udell M. E., Solberg Woods L. C., Chen H. (2023). The Wistar Kyoto Rat: A Model of Depression Traits. *Curr Neuropsychopharmacol.* 21(9):1884–1905. 10.2174/1570159X21666221129120902
- Redei E.E., Solberg L.C., Kluczynski J. M., Pare W. P. (2001). Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology.* 24(6):632-9. 10.1016/S0893-133X(00)00229-3
- Reisi P., Eidelkhani N., Rafiee L., Kazemi M., Radahmadi M., Alaei H. (2017). Effects of doxepin on gene expressions of Bcl-2 family, TNF- α , MAP kinase 14, and Akt1 in the hippocampus of rats exposed to stress. *Res Pharm Sci.* 12(1):15–20. 10.4103/1735-5362.199042
- Réus G. Z., de Moura A. B., Borba L. A., Abelaira H. M., Quevedo J. (2019). Strategies for Treatment-Resistant Depression: Lessons Learned from Animal Models. *Mol Neuropsychiatry.* 5(4):178–189. 10.1159/000500324
- Rittenhouse P. A., López-Rubalcava C., Stanwood G. D., Lucki I. (2002). Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology.* 27(3):303-18. 10.1016/s0306-4530(01)00052-x
- Robinson S. L., Thiele T. E. (2020). A Role for the Neuropeptide Somatostatin in the Neurobiology of Behaviors Associated with Substances Abuse and Affective Disorders. *Neuropharmacology.* 167:107983. 10.1016/j.neuropharm.2020.107983
- Ross S., Bossis A., Guss J., Agin-Liebes G., Malone T., Cohen B., Mennenga S. E., Belser A., Kalliontzis K., Babb J., Su Z., Corby P., Schmidt B. L. (2016). Rapid and sustained symptom reduction following psilocybin treatment for anxiety and depression in patients with life-threatening cancer: a randomized controlled trial. *J Psychopharmacol.* 30(12):1165-1180. 10.1177/0269881116675512
- Rubin R. T., Phillips J.J., Sadow T. F., McCracken J. T. (1995). Adrenal gland volume in major depression. Increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 52(3):213-8. 10.1001/archpsyc.1995.03950150045009
- Russo S. J., Nestler E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.* 14(9):609–25
- Saegusa H., Kurihara T., Zong S., Kazuno A., Matsuda Y., Nonaka T., Han W., Toriyama H., Tanabe T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *Embo j.* 20(10):2349–56. 10.1093/emboj/20.10.2349
- Sakurai K. (2024). Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain. *J Biochem.* 175(4):377-381. 10.1093/jb/mvad110
- Sarkar J., Wakefield S., Mackenzie G., Moss S.J., Maguire J. (2011). Neurosteroidogenesis Is Required for the Physiological Response to Stress: Role of Neurosteroid-Sensitive GABAA Receptors. *J Neurosci.* 31:18198–18210. 10.1523/JNEUROSCI.2560-11.2011
-

-
- Sartorius A., Kiening K. L., Kirsch P., von Gall C. C., Haberkorn U., Unterberg A. W., Henn F. A., Meyer-Lindenberg A. (2010). Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol Psychiatry*. 67(2):e9-e11. 10.1016/j.biopsych.2009.08.027
- Scheich B., Gaszner B., Kormos V., Laszló K., Adori C., Borbely E., Hajna Z., Tekus V., Bolcskei K., Abraham I., Pintér E., Szolcsanyi J., Helyes Z. (2016). Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 101:204-15. 10.1016/j.neuropharm.2015.09.021
- Schwartz J., Murrough J. W., Iosifescu D. V. (2016). Ketamine for treatment-resistant depression: recent developments and clinical applications. *Evid Based Ment Health*. 19(2):35–38. 10.1136/eb-2016-102355
- Seillier L., Cechova B., Seillier A., Slamberova R. (2025). Psilocybin has a narrow therapeutic window as an antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 138:111368. 10.1016/j.pnpbp.2025.111368
- 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. 10.1016/j.neuron.2021.06.008
- She Y., Xu J., Duan Y., Su N., Sun Y., Cao X., Lao L., Zhang R., Xu S. (2015). Possible antidepressant effects and mechanism of electroacupuncture in behaviors and hippocampal synaptic plasticity in a depression rat model. *Brain Res*. 1629:291-7. 10.1016/j.brainres.2015.10.033
- Shi J., Xin H., Shao Y., Dai S., Tan N., Li Z., Fei F., Wu D., Wang Y., Ping Y., Chen Z. (2023). CRISPR-based KCC2 upregulation attenuates drug-resistant seizure in mouse models of epilepsy. *Ann. Neurol*. 94(1):91-105. 10.1002/ana.26656
- Shirota O., Hakamata W., Goda Y. (2003). Concise large-scale synthesis of psilocin and psilocybin, principal hallucinogenic constituents of magic mushroom. *J Nat Prod*. 66(6):885-7. 10.1021/np030059u
- Siedlecki-Wullich D., Catala-Solsona J., Fabregas C., Hernandez I., Clarimon J., Lleo A., Boada M., Saura C. A., Rodriguez-Alvarez J., Minano-Molina A. J. (2019). Altered microRNAs related to synaptic function as potential plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 11(1):46. 10.1186/s13195-019-0501-4
- 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. 10.1016/j.neuropharm.2020.108248
- Ślifirski G., Król M., Turło J. (2021). 5-HT Receptors and the Development of New Antidepressants. *Int J Mol Sci*. 22(16):9015. 10.3390/ijms22169015
- Solberg L. C., Olson S. L., Turek F. W., Redei E. (2001). Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281(3):R786-94. 10.1152/ajpregu.2001.281.3.R786
- Stamatakis A. M., Stuber G. D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci*. 15(8):1105–1107. 10.1038/nn.3145
- Stampone E., Caldarelli I., Zullo A., Bencivenga D., Mancini F.P., Della Ragione F., Borriello A. (2018). Genetic and Epigenetic Control of CDKN1C Expression: Importance in Cell Commitment and
-

Differentiation, Tissue Homeostasis and Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 19(4):1055. 10.3390/ijms19041055

Su T., Lu Y., Fu C., Geng Y., Chen Y. (2023). GluN2A mediates ketamine-induced rapid antidepressant-like responses. *Nat Neurosci.* 26(10):1751-1761. 10.1038/s41593-023-01436-y

Sullivan B.J., Kipnis P.A., Carter B.M., Shao L.-R., Kadam S.D. (2021). Targeting ischemia-induced KCC2 hypofunction rescues refractory neonatal seizures and mitigates epileptogenesis in a mouse model. *Sci. Signal.* 14(708):eabg2648. 10.1126/scisignal.abg2648

Sylwestrak E. L., Jo Y., Vesuna S., Wang X., Holcomb B., Tien R. H., Kim D. K., Fenno L., Ramakrishnan C., Allen W. E., Chen R., Shenoy K. V., Sussillo D., Deisseroth K. (2022). Cell-type-specific population dynamics of diverse reward computations. *Cell.* 185(19):3568-3587.e27. 10.1016/j.cell.2022.08.019

Szumliński KK, Ary AW, Lominac KD. (2008). Homers regulate drug-induced neuroplasticity: implications for addiction. *Biochem Pharmacol.* 75(1):112–33. 10.1016/j.bcp.2007.07.031

Taguchi Y.-H., Wang H. (2018). Exploring MicroRNA Biomarkers for Parkinson's Disease from mRNA Expression Profiles. *Cells.* 7(12):245. 10.3390/cells7120245

Tejani-Butt S.M., Kluczynski J.M., Paré W.P. (2003). Strain-dependent modification of behavior following antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27(1):7-14. 10.1016/s0278-5846(02)00308-1

Tokarski K., Kusek M., Hess G. (2011). 5-HT₇ receptors modulate GABAergic transmission in rat hippocampal CA1 area. *J Physiol Pharmacol.* 62(5):535-40

Vidal R., Castro E., Pilar-Cuellar F., Pascual-Brazo J., Díaz A., Rojo M.L., Linge R., Martín A., Valdizán E.M., Pazos A. (2014). Serotonin 5-HT₄ receptors: A new strategy for developing fast acting antidepressants? *Curr Pharm Des.* 20:3751–3762. 10.2174/13816128113196660734

Vidal R., Valdizán E.M., Vilaró M.T., Pazos A., Castro E. (2010). Reduced signal transduction by 5-HT₄ receptors after long-term venlafaxine treatment in rats. *Br J Pharmacol.* 161:695–706. 10.1111/j.1476-5381.2010.00903.x

Vinod K. Y., Xie S., Psychoyos D., Hungund B. L., Cooper T. B., Tejani-Butt S. M. (2012). Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats. *PLoS One.* 7(5):e36743. 10.1371/journal.pone.0036743

Voineskos D, Daskalakis Z. J., Blumberger M. (2020). Management of Treatment-Resistant Depression: Challenges and Strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 16:221–234. 10.2147/NDT.S198774

Vreeburg S. A., Hoogendijk W. J. G., van Pelt J., Derijk R. H., Verhagen J. C. M., van Dyck R., Smit J. H., Zitman F. G., Penninx B. W. J. H. (2009). Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch Gen Psychiatry.* 66(6):617-26. 10.1001/archgenpsychiatry.2009.50

Wang C. K., Kim G., Aleksandrova L. R., Panenka W. J., Barr A. M. (2024). A scoping review of the effects of mushroom and fungus extracts in rodent models of depression and tests of antidepressant activity. *Front Pharmacol.* 15:1387158. 10.3389/fphar.2024.1387158

-
- Wang F., Zhou H., Tian Y., Wang X., Huang Y., Tu Y., Li L., Zhen H. (2025). ELK4 induced upregulation of HOMER3 promotes the proliferation and metastasis in glioma via Wnt/ β -catenin/EMT signaling pathway. *Biol Direct.* 20(1):48. 10.1186/s13062-025-00643-w
- Wang Z., Jiang C., Guan L., Zhao L., Fan T., Wang J., Cai X., Zhang Y., Yao C., Peng B., Wang F., Hu C., Cui Z., Tu Y., Li L. (2024). Deep brain stimulation of habenula reduces depressive symptoms and modulates brain activities in treatment-resistant depression. *Nat. Mental Health.* 2, 1045–1052. 10.1038/s44220-024-00286-2
- Webster J. F., Lecca S., Wozny C. (2021). Inhibition Within the Lateral Habenula-Implications for Affective Disorders. *Front Behav Neurosci.* 15:786011. 10.3389/fnbeh.2021.786011
- Weigl L.G., Schreibmayer W. (2001). G protein-gated inwardly rectifying potassium channels are targets for volatile anesthetics. *Mol Pharmacol.* 60(2):282-9. 10.1124/mol.60.2.282
- Weissbourd B., Ren J., DeLoach K. E., Guenther C. J., Miyamichi K., Luo L. (2014). Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron.* 83(3):645–662. 10.1016/j.neuron.2014.06.024
- Wesołowska A., Tatarczyńska E., Nikiforuk A., Chojnacka-Wojcik E. (2007). Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol.* 555:43–47. 10.1016/j.ejphar.2006.10.001
- Willner P. (2016). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 6:78-93. 10.1016/j.ynstr.2016.08.002
- Willner P., Belzung C. (2015). Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? *Psychopharmacology (Berl).* 232(19):3473-95. 10.1007/s00213-015-4034-7
- Willner P., Gruca P., Lason M., Tota-Glowczyk K., Litwa E., Niemczyk M., Papp M. (2019). Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. *Behavioural Pharmacology.* 30(2 and 3):p 239-250. 10.1097/FBP.0000000000000431
- Witkin, J. M., Martin, A. E., Golani, L. K., Xu, N. Z., Smith, J. L. (2019). Rapid-acting antidepressants. *Adv Pharmacol.* 86:47-96. 10.1016/bs.apha.2019.03.002
- Wojtas A., Gołębiowska K. (2023). Molecular and Medical Aspects of Psychedelics. *Int J Mol Sci.* 25(1):241. 10.3390/ijms25010241
- World Health Organization. Depressive disorder (depression). Dostępny online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (dostęp 5.11. 2024)
- Wu G.-F., Ren S., Tang R.-Y., Xu C., Zhou J.-Q., Lin S.-M., Feng Y., Yang Q.-H., Hu J.-M., Yang J.-C. (2017). Antidepressant effect of taurine in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Sci Rep.* 7(1):4989. 10.1038/s41598-017-05051-3
- Xie G., Zuo W., Wu L., Li W., Wu W., Bekker A., Ye J.H. (2016). Serotonin modulates glutamatergic transmission to neurons in the lateral habenula. *Sci Rep.* 6:23798. 10.1038/srep23798
- Xiu J., Li J., Liu Z., Wei H., Zhu C., Han R., Liu Z., Zhu W., Shen Y., Xu Q. (2022). Elevated BICD2 DNA methylation in blood of major depressive disorder patients and reduction of depressive-like behaviors in hippocampal Bicd2-knockdown mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 119(30):e2201967119. 10.1073/pnas.2201967119
-

-
- Yamada M., Kawahara Y., Kaneko F., Kishikawa Y., Sotogaku N., Poppinga W. J., Folgering J. H. A., Dremencov E., Kawahara H., Nishi A. (2013). Upregulation of the dorsal raphe nucleus-prefrontal cortex serotonin system by chronic treatment with escitalopram in hyposerotonergic Wistar-Kyoto rats. *Neuropharmacology*. 72:169-78. 10.1016/j.neuropharm.2013.04.044
- Yang H., Yuan Y., Yang K., Wang N., Li X. (2024). ELK4 ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation induced by obstructive sleep apnea. *Brain Res Bull.* 216:111054. 10.1016/j.brainresbull.2024.111054
- Yang Y., Cui Y., Sang K., Dong Y., Ni Z., Ma S., Hu H. (2018). Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature*. 554, 317–322. 10.1038/nature25509
- Yang Y., Wang H., Hu J., Hu H. (2018). Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Curr Opin Neurobiol.* 48:90-96. 10.1016/j.conb.2017.10.024
- Yaroslavsky I., Colletti M., Jiao X., Tejani-Butt S. (2006). Strain differences in the distribution of dopamine (DA-2 and DA-3) receptor sites in rat brain. *Life Sci.* 79(8):772-6. 10.1016/j.lfs.2006.02.030.
- Zhang J., Wang Y., Sun Y. N., Li L. B., Zhang L., Guo Y., Wang T., Yao L., Chen L., Liu J. (2019). Blockade of calcium-permeable AMPA receptors in the lateral habenula produces increased antidepressant-like effects in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats compared to sham-lesioned rats. *Neuropharmacology* 157:107687. 10.1016/j.neuropharm.2019.107687
- Zhang Y., Cheng L., Chen Y., Yang G.-Y., Liu J., Zeng L. (2016). Clinical predictor and circulating microRNA profile expression in patients with early onset post-stroke depression. *J Affect Disord.* 193:51-8. 10.1016/j.jad.2015.12.061
- Zhao F., Cheng Z., Piao J., Cui R., Li B. (2022). Dopamine Receptors: Is It Possible to Become a Therapeutic Target for Depression? *Front Pharmacol.* 13:947785. 10.3389/fphar.2022.947785
- Zhao Y., Shang P., Wang M., Xie M., Liu J. (2020). Neuroprotective Effects of Fluoxetine Against Chronic Stress-Induced Neural Inflammation and Apoptosis: Involvement of the p38 Activity. *Front Physiol.* 11:351. 10.3389/fphys.2020.00351
- Zhao Y.-w., Pan Y.-q., Tang M.-m., Lin W.-j. (2018). Blocking p38 Signaling Reduces the Activation of Pro-inflammatory Cytokines and the Phosphorylation of p38 in the Habenula and Reverses Depressive-Like Behaviors Induced by Neuroinflammation. *Front Pharmacol.* 9:511. 10.3389/fphar.2018.00511
- Zheng Y.-B., Sheng X.-M., Jin X., Guan W. (2024). MiR-182-5p: A Novel Biomarker in the Treatment of Depression in CSDS-Induced Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 27(1):pyad064. 10.1093/ijnp/pyad064
- Zhou Y., Niimi K., Li W., Takahashi E. (2015). Role of Cav2.2-mediated signaling in depressive behaviors. *Integr Mol Med.* 10.15761/IMM.1000170.
- Zhu Y., Wang R., Fan Z., Luo D., Cai G., Li X., Han J., Zhuo L., Zhang L., Zhang H., Li Y., Wu S. (2022). Taurine Alleviates Chronic Social Defeat Stress-Induced Depression by Protecting Cortical Neurons from Dendritic Spine Loss. *Cell Mol Neurobiol.* 43(2):827–840. 10.1007/s10571-022-01218-3
- Zurawek D., Kusmider M., Faron-Gorecka A., Gruca P., Pabian P., Solich J., Kolasa M., Papp M., Dziedzicka-Wasylewska M. (2016). Reciprocal MicroRNA Expression in Mesocortical Circuit and Its Interplay with Serotonin Transporter Define Resilient Rats in the Chronic Mild Stress. *Mol Neurobiol.* 54(8):5741–5751. 10.1007/s12035-016-0107-9
-