

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

На правах рукописи

АЙРИЯНЦ КСЕНИЯ АРКАДЬЕВНА

**Влияние индуцированного воспаления и стресса в
ранний постнатальный период на выраженность
расстройств аутистического спектра у мышей линии
BTBR**

1.5.5. — Физиология человека и животных
(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
*канд. биол. наук.,
Бондарь Наталья Петровна*

Новосибирск - 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Расстройство аутистического спектра.....	13
1.2 Механизмы развития РАС.....	15
1.2.1 Связь воспалительных процессов с манифестацией РАС и усугублением его симптомов.....	20
1.2.2. Вовлеченность стресса в ранний период в патофизиологию РАС	21
1.3 Животные модели аутизма	22
1.3.1 Линия мышей BTBR T+tf/J	26
2. Методы.....	29
2.1 Животные	29
2.2 Дизайн экспериментов	29
2.3 Поведенческие тесты	32
2.3.1 Тест «Социальное взаимодействие»	32
2.3.2 Тест «Открытое поле»	33
2.3.3 Тест «Темная-светлая камера».....	33
2.3.4 Тест «Закапывание шариков»	33
2.3.5 Тестирование неонатальных рефлексов	34
2.4 Забор тканей и оценка органных индексов	34
2.5 Реакция обратной транскрипции.....	35
2.6 Полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).....	36
2.7 Анализ уровня кортикостерона.....	40
2.8 Общий анализ крови	40
2.9 Статистическая обработка данных.....	40
3. Результаты.....	42
3.1 Эксперимент 1 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках	42
3.1.1 Вес тела животных и индекс надпочечников	42
3.1.2 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение животных в ювенильный период.....	43
3.1.3 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение самцов в подростковом периоде	44
3.1.4 Анализ уровня кортикостерона в сыворотке животных	46
3.1.5 Анализ уровня экспрессии генов <i>c-Fos</i> и <i>Crh</i> в гипоталамусе	47

3.1.6 Анализ влияния опыта разделения с матерью в раннем постнатальном периоде на стресс-реактивность генов в надпочечниках.....	47
3.1.7 Влияние раннего постнатального стресса на нейровоспаление в гиппокампе и фронтальной коре мышей	49
3.2 Эксперимент 2 Влияние воспалительного стресса в раннем возрасте на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках	51
3.2.1 Влияние воспаления в ранний постнатальный период на вес тела и органные индексы селезенки и надпочечников.....	51
3.2.2 Изменение параметров общего анализа крови у самцов мышей линий B6 и BTBR после индукции воспаления в ранний постнатальный период	55
3.2.3 Оценка неонатальных рефлексов после индукции воспаления	58
3.2.4 Влияние индукции воспаления в ранний постнатальный период на индивидуальное и социальное поведение самцов мышей линий B6 и BTBR в ювенильный период жизни	60
3.2.5 Влияние индукции воспаления в ранний постнатальный период на индивидуальное и социальное поведение самцов мышей линий B6 и BTBR в подростковый период жизни	63
3.2.6 Оценка стереотипии взрослых самцов мышей линий B6 и BTBR после индукции воспаления в ранний постнатальный период.....	64
3.2.7 Оценка нейровоспаления в гиппокампе после раннего воспалительного стресса у молодых мышей B6 и BTBR.....	66
4. Обсуждение результатов	67
5. Заключение	86
6. Выводы	87
7. Список литературы:	89

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BDNF – brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга

c-Fos – ген, кодирующий белок протоонкоген Fos

Crh – ген, кодирующий белок кортикотропин

Cyp11a1 – ген, кодирующий фермент расщепления боковой цепи холестерина

Cyp11b1 – ген, кодирующий белок стероидной 11 β -гидроксилазы

FMR1 – ген, кодирующий белок, называемый ломким X-мессенджером рибонуклеопротеина

Aif1 – *allograft inflammatory factor 1* – аллотрансплантатный воспалительный фактор 1

Gfap – *glial fibrillary acidic protein* – ген, кодирующий глиальный фибриллярный кислый белок

GWAS – genome wide association studies – исследование полногеномных ассоциаций

Hsd11b1 – ген, кодирующий белок 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы типа 1

IgE – Immunoglobulin G – иммуноглобулины класса E

IgG – Immunoglobulin G – иммуноглобулины класса G

IL – interleukin – интерлейкин

LPS – lipopolysaccharides – липополисахариды

Mc2r – ген, кодирующий рецептор меланокортина (тип 2)

MECP2 – ген, кодирующий метил-CpG-связывающий белок 2

MS – maternal separation – разделение с матерью

NLGN – семейство генов, кодирующие белки белок клеточной адгезии на постсинаптической мембране

NRXN – семейство генов, кодирующие белки пресинаптической клеточной адгезии

Poly I:C – polyinosinic:polycytidylic acid – полиинозиновая:полицитидиловая кислота

PTCHD1 – ген, кодирующий мембранный белок с патч-доменом 1

SHANK – семейство генов, кодирующие богатые пролином белки, ассоциированные с синапсом

Star – ген, кодирующий стероидогенный острый регуляторный белок

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ДЖ – день жизни

РАС – расстройства аутистического спектра

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Расстройство аутистического спектра (РАС) в настоящее время является наиболее распространенным нарушением развития головного мозга, затрагивая каждого 100-го ребенка в мире (Zeidan et al., 2022). Кроме того, РАС диагностируется у мальчиков в 4 раза чаще, чем у девочек, однако это соотношение уменьшается при увеличении тяжести заболевания (Werling, Geschwind, 2013). Диагностика патологии основывается на обнаружении характерной триады аутизма: недостаток социальных взаимодействий, нарушение взаимной коммуникации и ограниченность интересов, выраженная в повторяющемся репертуаре поведения. Хотя диагноз ставится в возрасте около трех лет, первые признаки проявляются раньше, причем более ранняя манифестация связана с более тяжелым течением расстройства (Zwaigenbaum et al., 2016). Наблюдаемая в развитых странах тенденция к увеличению случаев заболевания – 0.66% в 2002 году против 1.5% в 2012 (Centers for Disease Control and Prevention, 2007, 2016), а также неполнота данных о его патогенезе актуализируют дальнейшие исследования РАС.

Разработанность темы исследования. В настоящее время считается, что к развитию болезни приводит сочетанное действие генетических предпосылок и негативных факторов внешней среды, как во время внутриутробного развития, так и в ранний период жизни ребенка. На настоящий момент выделяют две форма РАС: синдромальную и идиопатическую. Синдромальный РАС связан с определенными мутациями в локусах хромосом и, как правило, сопровождается различными сопутствующими патологиями (синдром Ретта, синдром Ангельмана и другие). Идиопатическая форма расстройства сопровождается нарушениями во множестве генов, при этом генетический фон заболевания различен от пациента к пациенту. И хотя конкретные генетические ассоциации выявлены только для синдромальных форм РАС, например, для синдрома Ретта

(Sandweiss et al., 2020); генетический фактор, по-видимому, играет важную роль в развитии идиопатического расстройства, на что указывает высокий уровень конкордантности заболевания у близнецов (60-90%) (Hallmayer et al., 2011; Ronald, Hoekstra, 2011). Кроме того, высокий риск развития РАС (в 25 раз по сравнению с общей популяцией) был обнаружен у сибсов больных детей (Lauritsen et al., 2005; Abrahams, Geschwind, 2008). Хотя уже было выявлено множество полиморфизмов, ассоциированных с идиопатическим РАС, вклад каждого из них не очень ясен. Кроме того, не ясно, когда возникает «критическая масса» изменений, приводящая к развитию расстройства. Такое разнообразие генетического фона приводит к тому, что фенотипические проявления болезни очень различны (спектр РАС может проявляться от тяжелой инвалидности до высоко функциональных состояний). На настоящий момент считается, что к развитию идиопатической формы расстройства приводит сочетание неблагоприятного генетического фона с негативными факторами внешней среды во время пренатального и постнатального периодов развития. Например, к таким факторам уже относят инфекционные заболевания матери, прием вальпроевой кислоты, курение, недостаток витамина D во время беременности и прочие (Bromley et al., 2008; Mawson et al., 2019; Siracusano et al., 2020; Hertz-Picciotto et al., 2022). Однако данные о способности средовых факторов влиять на развитие и степень выраженности идиопатического РАС всё ещё остаются неполными, а также имеются противоречивые данные об их вкладе в развитие заболевания (Wang et al., 2017). Это определяет актуальность исследований молекулярно-генетических предпосылок и механизмов развития РАС, в том числе при помощи животных моделей.

И хотя моделирование такого комплексного расстройства на животных имеет ряд очевидных сложностей (в том числе из-за отсутствия конкретных биомаркеров заболевания), в последнее время большие надежды исследователей связаны с инбредной линией мышей BTBR T+tf/J (BTBR),

которая на настоящий момент считается наиболее валидной моделью идиопатического аутизма. Мыши этой линии не только демонстрируют основную поведенческую триаду аутизма, но и имеют схожие с больными РАС нейроанатомические особенности – сниженный объем мозолистого тела и уменьшенную комиссуру гиппокампа (Silverman et al., 2010). Поскольку известно, что пациенты с РАС имеют нарушения в функционировании иммунной системы, склонность к воспалительным процессам (Zhao et al., 2021), то ещё одной примечательной чертой линии ВТВР можно считать обнаруженный аберрантный иммунный профиль (Heo et al., 2011). По сравнению с высоко социальными мышами C57Bl/6 (B6), которые, как правило, используются в качестве контроля, мыши ВТВР демонстрируют более высокие уровни IgG в сыворотке, повышенную экспрессию цитокинов и увеличенную долю микроглии, экспрессирующую гены главного комплекса гистосовместимости класса II (Hwang et al., 2015; Nadeem et al., 2017; Uddin et al., 2020). В головном мозге мышей этой линии также обнаруживаются депонированные IgG и IgE, повышенная экспрессия цитокинов, особенно IL-33, IL-18, и IL-1 β (Careaga et al., 2015). Измененный иммунный профиль мышей ВТВР и наблюдаемое у них нейровоспаление предполагают, что иммунный профиль может быть связан с их аберрантным поведением, как это было предложено для некоторых людей с аутизмом. Однако способность воспаления в ранний постнатальный период влиять на манифестацию и развитие РАС до сих пор не ясна.

Ещё один фактор, который может иметь пагубные последствия, увеличивая риск развития многих психопатологий (тревожное расстройство, шизофрения, большое депрессивное расстройство, биполярное расстройство), включая РАС (Pirkola S et al., 2005; Rosenberg et al., Heim C et al., 2008; 2007; Class QA et al., 2014; Singletary et al., 2015) – стресс в ранний постнатальный период. Одним из предполагаемых механизмов, который может участвовать в развитии РАС и других психопатологий под действием этого фактора,

считают дисрегуляцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) во время критических периодов развития. Одной из предпосылок такой связи считают факт, что у больных РАС наблюдается нетипичный ответ на социальный стресс (Corbett et al., 2019), дети с этим расстройством чаще страдают от тревожного расстройства и депрессии (Simonoff et al., 2008; Van Steensel et al., 2011) и, кроме того, имеют повышенную концентрацию кортизола в плазме и слюне в норме и после стресса (Spratt et al., 2012; Taylor, Corbett, 2014) по сравнению с нейротипичными сверстниками. Несмотря на это, количество работ, которые оценивают активность ГГНС у мышей линии BTBR, ограничено. Лишь отдельные работы показывают, что животные BTBR демонстрируют повышенный уровень кортикостерона в плазме (Frye, Llaneza, 2010), а также значительное его увеличение после стрессирования по сравнению с другими линиями (Gould et al., 2014). При этом повышенная реакция на острый стресс мышей линии BTBR может усугублять их поведенческий фенотип (Venno et al., 2009). Принимая во внимание тот факт, что ранний постнатальный период является важным возрастом, в котором могут манифестировать первые признаки РАС, а также то, что некоторые молекулярные особенности линии BTBR схожи с теми, что наблюдаются после воздействия раннего постнатального стресса, мы предположили, что ранний постнатальный стресс может оказывать влияние на степень выраженности РАС у этих животных. Ранее уже было показано, что ранний постнатальный стресс может усиливать аутизм-подобный фенотип на другой модели аутизма на мышах – гетерозиготном нокауте D2 рецептора дофамина (D2 +/-) (Lee, Han, 2019).

Цели и задачи исследования. Цель данного исследования – оценить влияние индуцированного воспаления и стресса в ранний постнатальный период на выраженность аутизм-подобного поведения у самцов мышей линии BTBR.

Основными задачами, поставленными в рамках данного исследования, являются:

1. Оценить влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в двух возрастных точках: в ювенильном и подростковом периоде;
2. Исследовать влияние введения провоспалительных агентов на социальное и индивидуальное поведение животных обеих линий в ювенильном, подростковом и взрослом периодах жизни, а также их влияние на развитие неонатальных рефлексов;
3. Оценить влияние раннего постнатального стресса на стресс-реактивность животных после предъявления острого стресса;
4. Проанализировать уровень экспрессии связанных со стрессом генов в гипоталамусе и надпочечниках животных в подростковом периоде после стресса в раннем постнатальном периоде;
5. Провести оценку уровня экспрессии генов, связанных с воспалением в префронтальной коре и гиппокампе животных в подростковом периоде после стресса и индукции воспаления в раннем постнатальном периоде.
6. Оценить возрастную динамику основных показателей крови в норме и после индукции воспаления в ранний постнатальный период.

Научная новизна работы. В данной работе впервые комплексно исследовано влияние двух различных стрессовых факторов – воспаления и стресса в ранний период – на поведение, функционирование ГГНС, иммунные изменения в динамике у мышей линий BTBR и B6. Кроме того, была проведена оценка изменения паттернов экспрессии генов у мышей под действием данных стрессоров. Ранее исследования животных линии BTBR были сосредоточены на взрослом возрасте, в то время как данные, полученные в нашем исследовании получены, преимущественно, в ювенильном и

подростковом периодах, что существенно расширяет описание особенностей линии ВТBR. В поставленных экспериментах мы впервые оценили поведенческие изменения у мышей ВТBR в норме и после воздействия различными стрессовыми факторами, и провели анализ механизмов, потенциально вовлеченных в их патогенез. Поставленные в работе задачи по исследованию влияния стресса и воспаления в ранний период на двух линиях мышей, как на молекулярном, так и на поведенческом уровнях, являются новым и актуальным направлением для данной области исследований. Изучение взаимодействий ген-среда является одним из наиболее перспективных направлений в контексте исследования патогенетических причин РАС.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о способности стрессовых факторов в ранний постнатальный период влиять на патогенез РАС. Исследование дополнит имеющиеся в литературе данные о связи между перенесенным опытом стресса в критический период развития и психопатологией. Полученные данные имеют, в первую очередь, существенную фундаментальную ценность, однако в дальнейшем они могут иметь и прикладную значимость. Исследование позволяет выявить потенциальные негативные факторы, которые могут вносить вклад в более раннюю манифестацию и усугубление симптомов РАС. Это позволит включить новые диагностические критерии заболевания в клиническую практику неврологов, психотерапевтов, нейрофизиологов и смежных с ними специалистов.

Методология и методы исследования. В диссертационной работе были применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ литературы, экспериментальные методы исследования и анализ полученных данных. Методологическую основу настоящего исследования составляют современные методы исследования: полимеразная цепная реакция

в реальном времени, поведенческие тесты для оценки развития (неонатальные рефлексы) и поведения животных (тест «Социальное взаимодействие», тест «Темная-светлая камера», тест «Открытое поле»), иммуноферментный анализ, общий анализ крови, а также методы статистического анализа данных. Методическая база для проведения исследований соответствует поставленным задачам.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Аутизм-подобный фенотип развивается у самцов линии BTBR уже в подростковый период жизни, при этом опыт стресса или воспаления в ранний постнатальный период не способен усугублять наблюдаемые поведенческие аномалии;

2. Самцы мышей линии BTBR, по сравнению с линией C57Bl/6, демонстрируют повышенную стресс-реактивность в ответ на острый стресс, при этом опыт раннего постнатального стресса усиливает наблюдаемую у них гиперреакцию, но не оказывает влияние на базальное функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы;

3. Ранний постнатальный стресс у самцов мышей линии BTBR, но не у C57Bl/6, разнонаправленно модулирует реакцию на острый стресс на уровне микроглии: снижая экспрессию гена *Aif1* во фронтальной коре и повышая в вентральном гиппокампе.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты являются достоверными, поскольку получены на большой выборке животных с применением адекватных молекулярно-генетических методов исследования и статистической обработки полученных данных. Апробация диссертационной работы проведена на международных и всероссийских конференциях, среди которых: конференция «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» – BGRS/SB-2022 (2022 год, Россия, Новосибирск), VIII молодежная школа-конференция по молекулярной

биологии и генетическим технологиям (2022 год, Россия, Санкт-Петербург), XIX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии (2022 год, Россия, Владивосток), XVIII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии (2021 год, Россия, Владивосток). По теме диссертации опубликовано 3 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе цитирования WoS.

Структура и объем работы. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (259 источников). Общий объем составляет 121 страницы, в том числе 1 таблица и 18 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям и наставникам: канд. биол. наук Бондарь Наталье Петровне и Решетникову Василию Владимировичу за помощь в освоении методов исследования и за большой вклад в дизайн диссертационной работы. Автор выражает благодарность заведующей лабораторией доктору биол. наук Меркуловой Татьяне Ивановне за ценные рекомендации. Автор благодарит Павлова Константина Сергеевича и Рябушкину Юлию Андреевну в получении и обработке данные поведенческого тестирования животных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Расстройство аутистического спектра

Аутизм впервые был диагностирован в 1941 году Лео Каннером во время серии наблюдений за детьми в возрасте от двух до восьми лет. Большинство из этих детей имели серьезные трудности в общении, в межличностных отношениях и эмоциональности, а также в игровой деятельности (повторяющееся и стереотипная деятельность). До 1970-х годов аутизм в основном рассматривался как психиатрическая патология, известная как «детская шизофрения», при этом основной вклад в развитие заболевания, считалось, вносит психопатологическое поведение родителей и, главным образом, матери по отношению к ребенку (Bettelheim, 1967). Впоследствии, благодаря лучшему пониманию биологических механизмов и развитию генетики, аутизм был переклассифицирован в отдельную патологию. В настоящее время считается, что РАС – это группа заболеваний развития нервной системы со сложным патогенезом, характеризующиеся дефицитом коммуникации, социального взаимодействия и репертуаром стереотипных действий, при этом, видимо, формирующееся под действием генетических предпосылок и негативного средового фактора. Окончательный диагноз, как правило, ставят детям в возрасте около трех лет, однако первые признаки могут проявляться и в более раннем возрасте. Клиническая картина проявления РАС может сопровождаться эпилепсией (от 10 до 60% случаев) и/или нарушением умственного развития (70% случаев), а также ещё некоторыми неврологическими и психическими расстройствами (Geschwind, 2009; Mazzone et al., 2018; Rosen et al., 2018). РАС разделяют на два типа: синдромальный и идиопатический, и это различие основано исключительно на клинических критериях. Термин «синдромальный» относится к состояниям, при которых РАС возникает в сочетании с дополнительными фенотипами и/или дисморфическими признаками. Для этих состояний этиология в большинстве случаев известна и может включать хромосомные аномалии, субмикроскопические вариации числа копий и мутации в одном гене,

например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта, синдром дубликации MECP2, комплекс туберозного склероза и синдром макроцефалии. Термин «несиндромальный» обычно относится к «классическому аутизму», при котором отсутствуют какие-либо дополнительные симптомы. Для большинства несиндромальных случаев РАС этиология неизвестна, и в качестве альтернативы используется термин «идиопатический аутизм». Несмотря на далеко не полное понимание развития идиопатического РАС, многочисленные исследования указывают на то, что к его развитию приводит сочетание генетической компоненты с негативными факторами внешней среды (Wang et al., 2023).

Помимо выраженных поведенческих особенностей, у больных РАС наблюдается ряд нейрохимических и нейроанатомических особенностей. К ним относятся специфические для региона изменения объема структур, определяемые количественно с помощью магнитно-резонансной томографии, специфические изменения в сером или белом веществе, изменения в связях различных областей мозга, как это было установлено в исследованиях диффузионно-тензорной томографии, а также мелкие микроструктурные или клеточные изменения, обнаруженные в посмертной ткани головного мозга (Donovan, Basson, 2017). Кроме того, у больных сниженный объем центральной комиссуры; причём была показана достоверная положительная корреляция между снижением её площади и тяжестью симптомов РАС (Prigge et al., 2012). Считается, что центральная комиссура является ключевой структурой, ответственной за межполушарную связь, и снижение её объема так же связано с недостаточностью обработки сложной информации, в том числе речи, а также снижением объема рабочей памяти (Koshino et al., 2005; Alexander et al., 2007; Anderson et al., 2011). Многочисленные работы указывают и на нарушение в обмене нейромедиаторов, гормонов и нейрохимических веществ в головном мозге таких больных, например, гамма-аминомасляной кислоты и глутамата, серотонина, дофамина, N-

ацетиласпартата, окситоцина и аргинин-вазопрессина, мелатонина, витамине D, орексина, эндогенных опиоидов, ацетилхолина и прочих (Marotta et al., 2020).

В последние десятилетия в развитых странах наблюдается увеличение числа людей с РАС (Centers for Disease Control and Prevention, 2007, 2016). Отчасти это связано с улучшением критериев для постановки диагноза, однако не ясно какой вклад в общее увеличение случаев вносит прогресс в диагностике патологии. Кроме того, вопрос о роли негативной внешней среды в манифестацию РАС, а также в степень выраженности его симптомов до сих пор остается открытым.

1.2 Механизмы развития РАС

Несмотря на высокую распространенность заболевания данные о молекулярно-генетических механизмах его развития до сих пор весьма неполные. Во многом сложность поиска конкретных генетических маркеров аутизма также связана с фенотипической гетерогенностью данного расстройства, и, соответственно, генетического фона. Помимо разнообразия симптомов больные РАС индивидуумы имеют повышенный риск коморбидности с другими психологическими расстройствами, что также осложняет определение конкретных механизмов этого заболевания.

Манифестация заболевания, как правило, происходит в возрасте до трех лет – в период интенсивного синаптогенеза (Huttenlocher, Dabholkar, 1997). Считается, что синаптическая дисфункция может быть вовлечена в патогенез некоторых случаев РАС. Распространенные мутации одного гена, наблюдаемые при синдромальных формах расстройства, сопряжённого с умственной отсталостью – синдром ломкой X-хромосомы (*FMR1*), синдромом Ретта (*MECP2*), синдром Фелана-Макдермида (*SHANK3*) (Jamain et al. 2003) – происходят в генах, которые влияют на различные аспекты синапсов, включая их пластичность (Zoghbi, Bear, 2012).

За последние несколько десятилетий были предложены несколько многообещающих генов-кандидатов, ассоциированных с синдромальным РАС.

Одним из основных таких маркеров является измененный синтез нейрексинов, кодируемых у человека тремя генами *NRXN*. Нейрексины представляют собой белки клеточной поверхности, которые функционируют как молекулы и рецепторы клеточной адгезии. Они опосредуют образование синапсов через взаимодействия с нейролигинами, трансмембранными белками нейронов с богатыми лейцином повторами и дельта-2 глутаматного рецептора; и действуют как в глутаматергических, так и в ГАМК-ергических синапсах (Siddiqui et al., 2010; Uemura et al., 2010). Считается, что из-за своей роли в передаче сигналов нейрексины играют ключевую роль в способности мозга обрабатывать информацию; поэтому нарушения в их синтезе способны приводить к развитию различных психопатологий. Однако ассоциация между различными мутациями гена *NRXN* с РАС была показана лишь относительно недавно, в 2006 году, когда Feng с соавторами (Feng et al., 2006) показал на более чем 300 пациентах с РАС, что мутации гена *NRXN1* ассоциированы с предрасположенностью к развитию аутизма. В дальнейшем связь между делециями, а также другими мутациями и нарушениями в гене *NRXN1* с предрасположенностью к РАС была показана ещё в ряде исследований (Kim et al., 2008; Glessner et al., 2009; Guilmatre et al., 2009; Gauthier et al., 2011; Sanders et al., 2011; Soysal et al., 2011; Hedges et al., 2012; Liu et al., 2012). Одно из наиболее крупных исследований за последнее время провел Dabell с соавторами, где было показано на более чем 30000 пациентах, что делеция, включающая экзон, в участке 2p16.3 гена *NRXN1* связана с предрасположенностью к аутизму. При анализе поведенческих аномалий, РАС был обнаружен у 43% носителей этой делеции (Dabell et al., 2013). Хотя многочисленные исследования показали значительно более высокую частоту нарушений в гене *NRXN1* у пациентов с РАС по сравнению с условно-

здоровыми индивидуумами, изменения в этом гене также были идентифицированы у условно-здоровых индивидуумов (Sanders et al., 2011; Gai et al., 2012; Hedges et al., 2012; Schaaf et al., 2012). Кроме того, нарушения в этом гене также могут приводить к тяжелому фенотипу заболевания, включающих тяжелую умственную отсталость, отсутствие речи, стереотипию и аутизм, сопровождающийся эпилепсией в некоторых случаях (Zweier et al., 2009; Duong et al., 2012; Woodbury-Smith, Scherer, 2018).

Еще одним геном-кандидатом, ассоциированным с РАС, является *patched domain containing 1 (PTCHD1)*. Хотя точная функция этого гена на сегодняшний день неизвестна, белок PTCHD1 преимущественно локализуется на клеточной мембране и может функционировать в сигнальном пути Hedgehog. В недавней работе было показано, что у людей с РАС наблюдается повышенная частота встречаемости делеции в *PTCHD1*, приводящей к потере функции (Ross et al., 2020); при этом такие случаи РАС, как правило, сопровождаются и тяжелой формой умственной отсталости (Noor et al., 2010). Ещё одни белки, нарушения в экспрессии которых наблюдаются у больных с РАС – нейролигины, ответственные за постсинаптическую клеточную адгезию. Выявленные у пациентов с РАС несколько полиморфизмов в генах *NLGN3* и *NLGN4* хорошо охарактеризованы на настоящее время. Полиморфизмы в этих генах приводят к нарушению формирования и стабилизации синапсов, необходимых для коммуникативных процессов (Jamain et al., 2003). Полиморфизмы в обоих генах вносят вклад в формирование X-сцепленного аутизма, который также характеризуется относительно тяжелым фенотипическим проявлением (Nakanishi et al., 2017).

Кроме того, РАС относятся к группе условных заболеваний «шанкопатии» (Shankopathies). Этот термин обозначает заболевания нервной системы, такие как расстройства аутистического спектра, умственная отсталость и шизофрения, вызванные делецией или мутациями генов *SHANK*. Три гена семейства *SHANK* (*SHANK1*, *SHANK2* и *SHANK3*) кодируют

постсинаптические белки скаффолда, основной функцией которых является регуляция передачи глутаматергического сигналинга, что играет важную роль в процессах синаптической пластичности. Как и многие другие синаптические гены, мутации в генах семейства *SHANK* сильно связаны с РАС и различными формами умственной отсталости (Verpelli and Sala, 2012; Guilmatre et al., 2014). Впервые об этом было заявлено в 2001, когда сразу в двух работах была показана связь между мутацией в гене *SHANK* и синдромом Фелана – Макдермида, который характеризуется тяжелой формой умственной отсталости и, в 80% случаев - РАС (Bonaglia et al., 2001; Phelan et al., 2001; Betancur and Vuxbaum, 2013). Кроме того, в дальнейшем во множестве исследований было показано, что делеции, дупликации и мутации в трех генах *SHANK* были описаны у многих пациентов с РАС (Berkel et al., 2010; Pinto et al., 2010; Jiang and Ehlers, 2013; Sala et al., 2015). Однако при анализе больших выборок людей с РАС, было обнаружено, что мутации или нарушения в семействе генов *SHANK* составляют ~ 1% всех пациентов с РАС (Leblond et al., 2014).

С помощью полногеномного исследования ассоциаций (Genome wide association studies, GWAS) было выявлено более 400 значимых полиморфных вариантов в более чем 100 генах (Betancur, 2011), однако вклад каждого отдельного полиморфного варианта в развитие болезни остается малозаметным, особенно для идиопатических форм заболевания. Кроме того, при полногеномных исследованиях сложно выделить подгруппы РАС, неотягощенные прочими психопатологиями (Anney et al., 2017; Grove et al., 2019).

Важно отметить, что конкретные генетические ассоциации выявлены только для синдромальных форм заболевания, но не для идиопатического РАС, в развитие которого, скорее всего, вносят вклад нарушения в различных комбинациях генов, меняющиеся от пациента к пациенту.

Кроме того, до сих пор не ясна роль негативной внешней среды в развитии РАС. Известно, что стрессовые жизненные события могут как вносить вклад в усугубление психопатологий, так и усиливать уже имеющиеся их симптомы (Green et al., 2010). В ряде исследований уже было показано, что стресс, особенно в ранний период жизни, является фактором риска развития аутизма (Singletary, 2016; Kuenzel et al., 2021). Кроме того, высокий уровень материнской заботы в раннем возрасте снижает вероятность клинического проявления РАС у людей с генетическими предпосылками его развития (Shin et al., 2021). Однако, относительно недавнее крупное исследование не подтвердило связи между негативными стрессовыми событиями в ранний период жизни ребенка и риском РАС (Rai et al., 2012). Имеющиеся в литературе противоречия обуславливают дальнейшее изучение вовлеченности этого негативного воздействия в патофизиологию РАС.

Развитие аутизма у детей связывают также с различными воздействиями на плод во время беременности. Один из таких негативных факторов – прием матерью вальпроевой кислоты, известного противоэпилептического агента (Owens, Nemeroff, 2003). Исследование, проведенное в 2005 году, показало, что среди детей, подвергавшихся воздействию вальпроата натрия до рождения, аутизм был диагностирован у 8,9 % (Rasalam et al., 2005), что в 6 раз чаще, чем в общей популяции. Считается, что вальпроевая кислота ингибирует гистондеацетилазу, и, таким образом может увеличить риск РАС через эпигенетические механизмы (Phiel et al., 2001; Barrett et al., 2017).

Ещё один негативный фактор, имеющий связь с повышенной встречаемостью РАС у детей – материнская инфекция. Одни из самых ранних исследований, подтверждающих эту гипотезу, были проведены в 70-е годы прошлого века; где было показана повышенная частота рождения детей с аутизмом у матерей, пострадавших во время пандемии краснухи в 1964 году. По оценкам, процент детей с РАС у таких матерей составлял 8-13% против 0,05% в контрольной группе (Chess, 1971; 1977). Сейчас выявлена ассоциация

между высоким риском возникновения РАС и многочисленными типами инфекционных агентов, включая не только вирусные, но также бактериальные и паразитарные инфекции (Patterson, 2011). Интересно, что временное окно воздействия инфекции имеет решающее значение для ассоциации с РАС и различается в зависимости от возбудителя. Первый триместр был определен как критический для вирусных инфекций, тогда как с бактериальными инфекциями был связан второй триместр (Atladóttir et al., 2010). По-видимому, материнская инфекция действует как этиологический фактор окружающей среды, который нарушает определенные геномные механизмы раннего развития, повышая риск возникновения РАС (Lombardo et al., 2018).

1.2.1 Связь воспалительных процессов с манифестацией РАС и усугублением его симптомов

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что иммунные процессы играют ключевую роль в патофизиологии РАС: обширные изменения иммунной функции описаны как у детей, так и у взрослых больных, включая нейровоспаление в образцах головного мозга, повышенный профиль провоспалительных цитокинов в спинномозговой жидкости и крови, повышенное количество специфичных для головного мозга аутоантител и изменение функции иммунных клеток (Onore et al., 2011; Robinson-Agramonte et al., 2022). Было обнаружено, что у детей с аутизмом наблюдается как периферическое, так и центральное воспаление, на что указывают повышенные уровни провоспалительных цитокинов, а также микроглиальная активация (Onore et al., 2012; Hsiao, 2013; Rossignol, Frye, 2014, Liao et al., 2020). В последнее время многие исследователи отмечают у людей с РАС нарушение состава микробиома кишечника и измененный иммунный статус (Roussin et al., 2020). У значительного числа пациентов с этим расстройством наблюдаются желудочно-кишечные дисфункции (Horvath, Perman, 2002), при этом тяжесть этих нарушений, по-видимому, сильно коррелируют с тяжестью неврологических нарушений (Adamsetal., 2011).

1.2.2. Вовлеченность стресса в ранний период в патофизиологию РАС

Одним из предполагаемых механизмов, который может участвовать в развитии РАС под действием стресса в ранний постнатальный период, считают дисрегуляцию ГГНС во время критических периодов развития. Например, в фазе гипореактивного периода стресса, в котором наблюдается низкая базальная секреция кортикостерона и неспособность ГГНС индуцировать явный ответ в ответ на легкие и средние стрессоры. Этот период требуется для завершения нормальных процессов нейро- и синаптогенеза и развития мозга (Sapolsky et al., 1985). У грызунов он протекает с 2 по 15 день жизни (ДЖ) (Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2007; Enthoven et al., 2010), а у человека подобный период соответствует первому году жизни (Gunnar MR, Donzella B, 2002). Воздействие стресса в этот период развития может иметь многочисленные долгоиграющие последствия для ГГНС во взрослом возрасте, влияя как на ее базальную, так и на стресс-индуцированную активность. Кроме того, негативные события в этот период могут вносить вклад в развитие нейровоспаления, абберантного нейрогенеза и ангиогенеза, что приводит к развитию предрасположенности к заболеваниям головного мозга во взрослом периоде жизни (Salmina et al., 2021).

Нарушения функционирования ГГНС как на базальном уровне, так и под действием стрессовых факторов наблюдаются у больных РАС. Так, нетипичный ответ на социальный стресс наблюдается у детей с этим расстройством (Corbett et al., 2019). Некоторые исследователи связывают это с повышенной чувствительностью больных РАС к стрессу из-за гиперреактивности ГГНС (Spratt et al., 2012). Так, в некоторых исследованиях было обнаружено, что у больных РАС повышена концентрация периферического кортизола в плазме по сравнению с нейротипичными сверстниками (Gao et al., 2022). Что касается циркадного ритма кортизола, то у детей с РАС было продемонстрировано притупленное суточное снижение с утра до вечера и более высокие вечерние значения кортизола, по сравнению с

нейротипичными детьми (Tomarken et al., 2015; Muscatello, Corbett, 2018). При этом данные, полученные в исследованиях, противоречивы и характеризуются большой гетерогенностью. Так, в ряде работ не наблюдалось различий в функционировании ГГНС людей с РАС и контрольными группами (Makris et al., 2022). Расхождения в результатах разных исследований могут быть связаны с несколькими факторами: различия в возрасте участников или уровне их развития, тяжесть нарушений, наличие или отсутствие терапии, сопутствующие заболевания, размер групп выборки, используемые методы исследования, тип стрессоров (Taylor, Corbett, 2014). При этом не ясно, способен ли стресс в ранний постнатальный период приводить к усилению наблюдаемой дисрегуляции ГГНС у детей с РАС или нет. Имеющиеся данные неполные и носят противоречивый характер, что обуславливает дальнейшее изучение функционирования ГГНС на базальном уровне, после стрессовых воздействий, а также после воздействия дополнительными стрессами в различных возрастных периодах.

Несмотря на многочисленные исследования, направленные на выявление молекулярно-генетических механизмов развития РАС, на данный момент патогенез заболевания остается слабо изучен, а гены-кандидаты выявлены преимущественно для тяжелых форм расстройства. Кроме того, картина влияния негативных средовых факторов, в том числе раннего постнатального стресса и воспалительного стресса, на развитие заболевания остается неясной; что обуславливает дальнейшие исследования патогенеза РАС, в том числе при помощи животных моделей.

1.3 Животные модели аутизма

Исследование многогранных психопатологий с широким спектром поведенческих аномалий на грызунах имеет ряд естественных ограничений и трудностей. При разработке линий животных для моделирования аутизма наибольшая сложность заключается в отсутствии конкретных биомаркеров заболевания, что приводит к тому, что отбор строится только на

фенотипическом проявлении животными аутизм-подобного поведения. Кроме того, некоторые критерии и признаки, которые являются важными для постановки диагноза, не могут быть воспроизведены на грызунах (Silverman et al., 2010).

Помимо этого, возможно, РАС представляет собой набор поведенческих расстройств с разными причинами и, соответственно, с различным патогенезом (Constantino, 2011); что ещё больше осложняет разработку валидной животной модели заболевания.

Не смотря на сложности, поскольку человеческий мозг имеет низкую доступность для исследований, в последние десятилетия исследователями было предложено несколько линий грызунов, демонстрирующих аутизм-подобное поведение, связанное с основной диагностической триадой аутизма: 1) снижение социального взаимодействия, 2) дефицит общения, а также 3) склонность к стереотипии и повторяющемуся поведенческому репертуару.

У части существующих животных моделей индуцируется проявление аутизм-подобного поведения за счет внешних факторов, воздействия которых ассоциировано с повышенной частотой возникновения аутизма у человека.

Одна из наиболее широко используемых моделей в области исследований аутизма является животная модель расстройства аутистического спектра, индуцированного пренатальным воздействием вальпроевой кислоты. Создание её берёт начало в 1996 году, когда Rodier с соавторами подверг крысиных эмбрионов разовому воздействию вальпроевой кислотой в дозе 350 мг/кг (Rodier et al., 1996). Однократная инъекция вальпроевой кислоты беременным крысам приводит к поведенческим аномалиям, связанных с РАС, у их потомства: усилению стереотипного/повторяющегося поведения, снижению социального взаимодействия, изменению чувствительности к сенсорным стимулам,

повышенной тревожности и нарушению обучения (Schneider et al., 2008; Patterson, 2009).

Ещё одной моделью, применяемой для исследования РАС, является модель материнской инфекции. Для индукции воспаления животным вводят один из агентов: 1) полиинозиновую:полицитидиловую кислоту (Poly I:C) – синтетическую двуцепочечную РНК, которая вызывает противовирусную иммунную реакцию; или 2) липополисахарид, который вызывает антибактериальную иммунную реакцию. Потомство таких животных демонстрирует поведение, аналогичное основным симптомам аутизма: дефицит социального взаимодействия и общения и повышенное повторяющееся/стереотипное моторное поведение (самоочищение и закапывание стеклянных шариков, повторение одной и той же реакции в водном лабиринте) (Patterson, 2009), а также демонстрируют ряд других форм поведения, обнаруживаемых у подгрупп пациентов с РАС, таких как неофобия, повышенная тревожность и повышенная частота моргания (Dammann, Meyer, 2011).

Однако воспроизведение животных моделей, демонстрирующих аутизм-подобный фенотип, с помощью различных внешних воздействий вызывает ряд сложностей, например, что поведенческие нарушения сильно варьируются от продолжительности и силы воздействия (Hsiao et al., 2011). Поэтому большей валидностью обладают генетические модели, в которые существующие модификации приводят к развитию аутизма или его отдельных симптомов. Однако при этом моногенные модели, могут включать помимо основных симптомов аутизма и целый ряд других серьезных состояний (например, опухоли, физические пороки и т. д.), которые не встречаются при РАС (Patterson, 2011). На настоящее время существует множество моделей данного заболевания на мышах, однако широко используются лишь некоторые из них.

Например, одной из таких моделей является мыши, нокаутные по гену *Fmr1*, которые демонстрируют некоторые основные поведенческие особенности аутизма, в том числе нарушение социального взаимодействия и повторяющееся поведение; и считаются валидной моделью тяжелой формы РАС – синдрома ломкой X-хромосомы. Нокаутные животные демонстрируют гиперчувствительность к раздражителям (Rotschafer, Razak, 2013), склонность к повторяющемуся поведению и высокие уровни тревоги, что соответствует симптоматике, наблюдаемой у людей (Kazdoba et al., 2014). Однако нокаутные мыши демонстрируют различную степень выраженности аутизм-подобных симптомов в зависимости от их генетического фона (Spencer et al., 2011), что может создавать трудности при работе с ними.

Синдром Ретта – ещё одно моногенное заболевание, относящиеся к РАС, а также успешно моделируемое на животных. Мутации, вызывающие заболевание, находятся в гене *MeCP2* (*метил-CpG-связывающий белок 2*). Поведенческие нарушения у мышей, мутантных по этому гену, включают повышенную тревогу в открытом поле, меньшее строительство гнезд и абберантные социальные взаимодействия; а также сниженную способность к обучению (Chahrouh, Zoghbi, 2007). У мышей со сверхэкспрессией *MeCP2* также развивается прогрессирующее неврологическое расстройство с, что удивительно, улучшением навыков моторного и контекстного обучения в возрасте от 10 до 20 недель, а в более старшем возрасте – гипоактивностью, судорогами и аномальным сжиманием передних конечностей, что схоже с симптомами синдрома Ретта у человека (Chahrouh, Zoghbi, 2007). Хотя такое развитие определенно указывает на регресс, он не совпадает по временным рамкам с проявлением регрессивной формы аутизма или синдрома Ретта (Patterson, 2011). Примечательно, что восстановление экспрессии *MeCP2* в модели условного нокаута у незрелых и даже у зрелых мышей приводит к восстановлению нормального фенотипа (Cobb et al., 2010).

И хотя моделирование такого комплексного расстройства на животных в последние десятилетия продвинулось вперед, разнообразие форм заболевания стимулирует исследователей на разработку новых животных моделей. Одной из последних разработанных линий являются мыши BTBR T+tf/J, которые не только демонстрируют основную поведенческую триаду аутизма, но и имеют схожие с больными РАС биохимические маркеры.

1.3.1 Линия мышей BTBR T+tf/J

В последние несколько лет внимание исследователей сосредоточено на крайне перспективной для исследования механизмов РАС линии мышей BTBR T+tf/J (BTBR) (Семенова и др., 2019). Эта инбредная линия демонстрирует высокую валидность заболевания, проявляя характерную поведенческую триаду РАС: снижение социальных предпочтений (Moy et al., 2007; Yang et al., 2007; McFarlane et al., 2008; Pobbe et al., 2010), аномалии в ультразвуковой вокализации (Scattoni et al., 2008; Scattoni et al., 2011; Wöhr et al., 2011) и повторяющееся поведение (Silverman et al., 2010; Amodeo et al., 2012). Генетические различия между BTBR и C57Bl/6 (линия C57Bl/6 обычно используется в качестве высокосоциального «контроля» для исследований, связанных с аутизмом, в которых используются мыши BTBR) были выявлены более десяти лет назад, когда McFarlane с соавторами обнаружил несколько однонуклеотидных полиморфизмов у мышей линии BTBR (McFarlane et al., 2008). Большой интерес у исследователей вызывает несинонимичный полиморфизм в кодирующей области гена *Kmo*, кодирующего фермент, регулирующий обмен кинуренина – кинуренин 3-гидроксилазу; который приводит к повышенным уровням кинурениновой кислоты в префронтальной коре мышей этой линии (McTighe et al. 2013). Недавние исследования показали также пониженную экспрессию некоторых генов и белков в префронтальной коре и гиппокампе у мышей линии BTBR, в том числе мозгового нейротрофического фактора BDNF (Stephenson et al. 2011; Scattoni et al. 2013; Wei et al., 2016). Помимо изменений экспрессии генов в структурах мозга, у

мышей этой линии были выявлены эпигенетические изменения в мозжечке, которые соответствовали изменениям, наблюдаемым при постмортальном анализе мозга у пациентов с РАС (Shpyleva et al., 2014). Кроме того, мыши линии BTBR характеризуются некоторыми структурными изменениями в головном мозге по сравнению с линией C57Bl/6. Так, в исследовании Dodero с соавторами при помощи магнитно-резонансной томографии было выявлено уменьшение у мышей этой линии объема серого вещества во фронтальной, затылочной и таламической областях и значительное уменьшение толщины кортикального слоя (Dodero et al., 2013). В нашем исследовании было выявлено, что у мыши BTBR на 43 день жизни демонстрировали уменьшенные объемы всего мозга, коры и дорсального гиппокампа; уменьшение толщины моторной коры; и увеличенный объем вентрального гиппокампа по сравнению с мышами C57Bl/6 (Reshetnikov et al., 2021). В то же самое время в исследовании Dodero с соавторами у взрослых мышей BTBR в медиальной префронтальной и островковой коре наблюдалось увеличение объема и толщины серого вещества (Dodero et al., 2013), что схоже с данными, полученными при исследовании магнитно-резонансной томографией детей с РАС (Ecker et al., 2015).

Ещё одной специфической особенностью мышей линии BTBR можно считать наличие измененного иммунного профиля. Так, в исследовании Neo с соавторами (Neo et al., 2011) было показано, что мыши линии BTBR обладают aberrантным иммунным профилем: относительно мышей C57Bl/6 они демонстрировали более высокое количество сывороточных IgG и IgE, IgG анти-мозговых антител, а также IgG и IgE, депонированных в головном мозге, повышенную экспрессию цитокинов, особенно IL-33, IL-18, и IL-1 β , в головном мозге и также увеличенную долю микроглии, экспрессирующей ГКГ класса II (Careaga et al., 2015). Кроме того, макрофаги, полученные из костного мозга данной линии, демонстрировали более сильный воспалительный ответ при культивировании в среде, содержащей LPS по сравнению с аналогично

полученной культурой макрофагов от линии мышей C57Bl/6 (Onore et al., 2013). При этом обнаруженная гиперреактивность иммунной системы мышей BTBR коррелировала со стереотипным поведением мышей этой линии (Onore et al., 2013). Совсем недавняя работа Schwartzer с соавторами, в которой была проведена трансплантация костного мозга C57Bl/6 животным линии BTBR, показала, что после пересадки мыши BTBR демонстрировали улучшение социального поведения. В то же время мыши C57Bl/6 после переноса им костного мозга животных BTBR показывали достоверное увеличение стереотипии (Schwartzer et al., 2017). Сейчас предполагают, что генетические варианты BTBR вносят вклад в измененную чувствительность хроматина к провокации эндотоксином, что приводит к гиперчувствительности врожденного иммунитета BTBR (Ciernia et al., 2020).

Кроме того, в некоторых исследованиях предполагают, что развитие и проявление уникального аутизм-подобного фенотипа BTBR может быть следствием их стресс-реактивного фенотипа. Эта линия демонстрирует повышенную тревожность (коморбидные когнитивные и эмоциональные нарушения при расстройствах аутистического спектра) по сравнению с контрольной линией C57Bl/6 (Pobbe et al. 2011; Langley et al. 2015; Chao et al. 2018). Кроме того, несколько исследований выявили повышенный уровень кортикостерона в плазме крови этих животных во взрослом возрасте (Benno et al., 2009; Frye and Llaneza 2010) и значительное увеличение этого показателя после стресса по сравнению с другими линиями мышей (Gould et al. 2014). Эти наблюдения могут указывать на дисфункцию ГГНС и чувствительность к стрессу у мышей линии BTBR, но точные механизмы наблюдаемой высокой стрессовой реактивности до сих пор неясны.

Таким образом, данная линия мышей является перспективной моделью для исследования механизмов развития расстройств аутистического спектра.

2. Методы

2.1 Животные

Эксперименты проводились на самцах и самках мышей линий C57Bl/6 (B6) и BTBR T+tf/J (BTBR) в разных возрастных периодах. Животные содержались в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН при свободном доступе к воде и корму. Каждая экспериментальная группа содержала от 8 до 10 животных. Условия содержания животных и протоколы работы с ними утверждены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН и соответствуют Директиве Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22.09.2010 г.

2.2 Дизайн экспериментов

Для оценки влияние стресса и воспаления в ранний постнатальный период на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках нами были проведены два эксперимента.

Эксперимент 1 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках

В чистую клетку ссаживали одного самца и три самки одной линии. По истечении 19 дней самок рассаживали по отдельным клеткам. День родов был обозначен как 0 день жизни (ДЖ). Пометы случайным образом разделялись на экспериментальные группы, подвергавшиеся стрессу разлучения с матерью на 3 часа в день со второго по 15 дни жизни (maternal separation, MS) и контрольные, которая стрессу не подвергались. Во время процедуры отделения каждый детеныш был помещен в индивидуальный контейнер для предотвращения контакта с сородичами. С целью исключения переохлаждения детенышей в контейнере во время процедуры отделения от матери поддерживался уровень температуры 30-32⁰С при помощи теплового коврика.

Таким образом, животные разделились на четыре группы: 1) контрольная группа В6 без стресса в ранний постнатальный период В6-NC; 2) группа В6 со стрессом в ранний постнатальный период В6-MS; 3) контрольная группа BTBR без стресса в ранний постнатальный период BTBR-NC и 4) группа BTBR со стрессом в ранний постнатальный период BTBR-MS. Оценка социального и индивидуального поведения животных всех групп была проведена с помощью тестов «Социальное взаимодействие», «Темная-светлая камера» и «Открытое поле» (Рис. 1). Животные на 23 ДЖ случайным образом разделялись внутри на две подгруппы. Первая подгруппа тестировалась в «Социальное взаимодействие» (23 ДЖ), а вторая – в тесте «Открытое поле» (23 ДЖ), «Социальное взаимодействие» (37 ДЖ) и «Темная-светлая камера» (38 ДЖ). На 41 день животные второй подгруппы были подвергнуты острому стрессу - рестрикции (1 час). Непосредственно после рестрикции животные были выведены из эксперимента быстрой декапитацией для забора тканей.

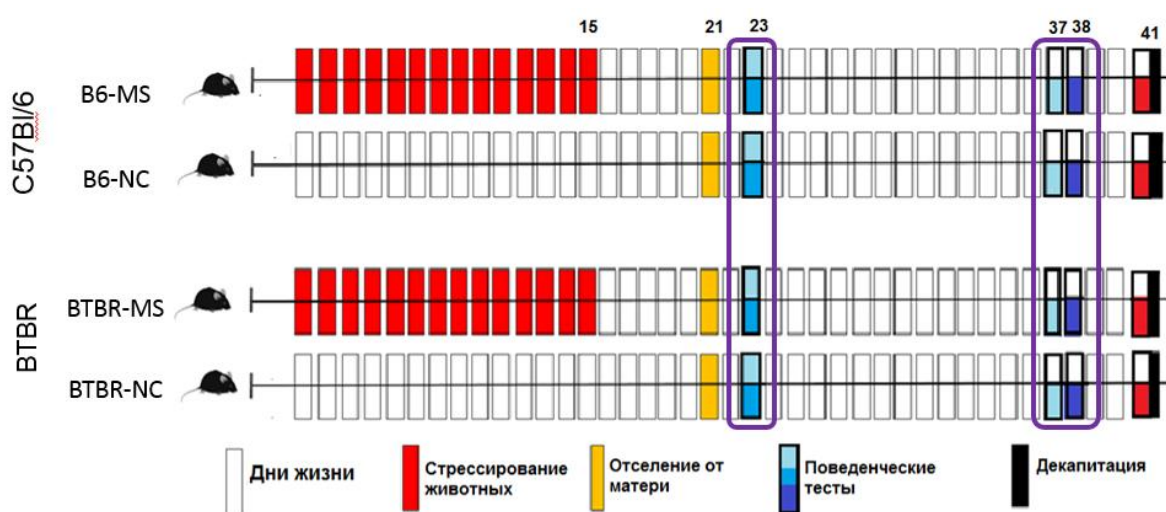


Рисунок 1. Схема проведения эксперимента 1.

Эксперимент 2 Влияние воспалительного стресса в раннем возрасте на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках

Аналогично первому эксперименту для получения детенышей нужного возраста в чистую клетку ссаживали одного самца и три самки одной линии.

По истечении 19 дней самок рассаживали по отдельным клеткам. День родов был обозначен как 0 ДЖ. Пометы случайным образом разделялись на экспериментальные группы. Мышам экспериментальных групп на 3й и 5й ДЖ вводили либо отдельно липополисахарид (миметик бактериальной инфекции, 50мкг/кг) или полиинозиновую:полицитидиловую кислоту (миметик вирусной инфекции, 10 мкг/кг), либо их сочетание. Контрольная группа получала эквивалентный объем физиологического раствора. Таким образом, животные каждой линии разделились на 4 группы: контрольная (S), группа с введением липополисахарида (LPS, L), группа с введением полиинозиновой:полицитидиловой кислоты (Poly I:C, P) и группа с сочетанным введением (LPS+Poly I:C, L+P). На 5 и 8 дни жизни была проведена оценка формирования рефлексов (отрицательный геотаксис, хватательный рефлекс и рефлекс избегания обрыва). Оценка индивидуального и социального поведения была проведена с использованием тестов «Темная-светлая камера» (23 и 39 ДЖ) и «Социальное взаимодействие» (24 и 40 ДЖ), а стереотипия была оценена в тесте «Закапывание шариков» во взрослом возрасте (55 ДЖ). В трех возрастных точках (на 24, 40 и 60 дни жизни) было проведено выведение животных из эксперимента быстрой декапитацией для забора тканей, а также крови для общего анализа.

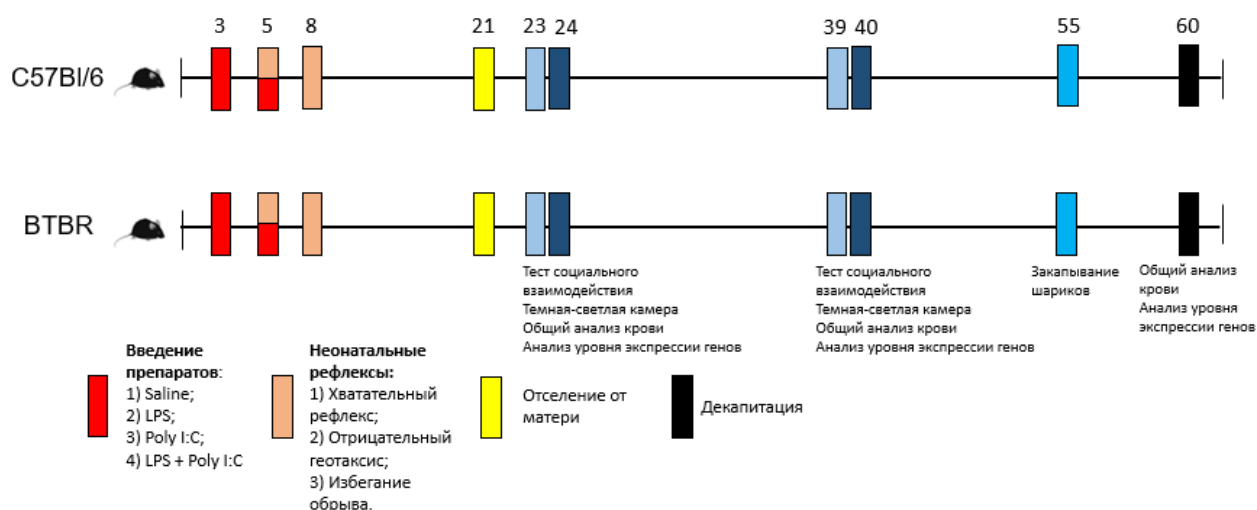


Рисунок 2. Схема проведения эксперимента 2.

2.3 Поведенческие тесты

Поведенческие тесты были проведены на территории SPF вивария ИЦиГ СО РАН во время темной фазы с 15:00 до 19:00 часов дня. Для анализа полученных данных использовалось программное обеспечение EthoStudio (тест «Открытое поле» и тест «Социальное взаимодействие») и BORIS (тест «Темная-светлая камера»). Пройденный путь в центре и на периферии в тесте «Открытое поле» анализировался отдельно в лаборатории экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов, Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины (НИИФФМ) Павловым Константином Сергеевичом с использованием программного обеспечения the Ethovision 10.0 software (Noldus Information Technology, the Netherlands). Тест «Закапывание шариков», неонатальные рефлекс, а также некоторые параметры теста «Темная-светлая камера» были обработаны вручную.

2.3.1 Тест «Социальное взаимодействие»

Для оценки социального поведения животных в ювенильный и подростковый периоды был проведен тест «Социальное взаимодействие». Площадь для взаимодействия животных представляла собой ящик 40x40x25 см. Короб с перфорациями (10x10x10), содержащий незнакомую мышь, размещался посередине одной из стен. Область взаимодействия животных оценивалась как область ≤ 5 см от короба. Тест состоял из двух последовательных испытаний продолжительностью 5 минут каждое. В первом, чтобы мышь привыкла к новым условиям, животное помещали в центр арены, при этом перфорированный ящик был пуст. Во втором испытании социальный стимул (животное того же пола и линии, что и испытуемая мышь) помещали в перфорированную коробку, после чего испытуемое животное снова помещали в арену. Во время обоих испытаний измерялось время, проведенное в зоне взаимодействия. Для оценки социального поведения использовался индекс социального взаимодействия,

который рассчитывался как $(100\% \times (\text{время в зоне взаимодействия в испытании 2}) / (\text{время в зоне взаимодействия в испытании 1}))$.

2.3.2 Тест «Открытое поле»

В эксперименте 1 на 21 день жизни животных поведение было оценено в тесте «Открытое поле». Животное помещалось в центр круглой арены диаметром 40 см и высотой стенок 25 см. Пространство внутри было разделено на «центр» (20 см диаметра) и «периферию» (пространство от центра арены и стен). Тестовая сессия состояла из 5 минутного нахождения мыши на территории арены. В тесте были оценены пройденное расстояние на периферии и в центре (двигательная активность), а также время, проведенное в центре (тревожность).

2.3.3 Тест «Темная-светлая камера»

Оценка тревожности и двигательной активности животных была проведена в тесте «Светлая-темная камера». Установка состояла из короба, разделенного на светлую и темную камеру (20x20x25 см каждая). Отсеки были соединены небольшим (7x7x7 см) проходом для перемещения мыши между ними. Животное помещалось в темный отсек, после чего производилась оценка его поведения в последующие пять минут. Были оценены следующие параметры: количество входов в светлый отсек; общее время, проведенное в светлом отсеке; среднее время, проведенное в светлом отсеке, а также количество подъемов на задние лапы и частота подъемов на задние лапы.

2.3.4 Тест «Закапывание шариков»

Для оценки стереотипии животных в эксперименте 2 на 55 ДЖ был проведен тест «Закапывание шариков». В клетку (Optimice, Animal Care Systems, Inc.) на 4 см заполненную подстилом складывали 18 стеклянных шариков (1 см диаметр). Тестируемую мышь помещали в центр клетки, закрывали крышкой и оставляли на 30 минут. После 30 минут животное возвращали в домашнюю клетку. Производили подсчет количества закопанных шариков. Шарик считали закопанным на 100%, если был

полностью закопан в подстил, на 95% -- видно "верхушку", на 75% -- когда закопан на 3/4, на 50% когда закопан наполовину, если шарик закопан меньше чем на 50% он считается незакопанным. После каждого животного шарики промывали небольшим количеством 75% этанола и высушивали.

2.3.5 Тестирование неонатальных рефлексов

Тестирование всех неонатальных рефлексов проводилось дважды: на 5 и 8 дни жизни.

Хватательный рефлекс. Мышь аккуратно захватывается вертикально. На лапу мыши помещается тонкая металлическая проволока (диаметр 0.5 мм). При смещении проволоки вверх по лапе животное, при наличии рефлекса, производит её захват. Если захвата не происходило, то фиксировалось отсутствие рефлекса.

Избегание обрыва. Мышь помещалась на край плоской поверхности с острым краем (незакругленный, 90°). При этом передние лапы и мордочка животного выдвигаются на 2-3 мм над обрывом. При сформированном рефлексе животное делает разворот на 180°, после чего начинает отползать от края. Если животное не делало разворот или начинало движение вперед, то фиксировалось отсутствие рефлекса.

Отрицательный геотаксис. Мышь помещают в центр решетчатой поверхности, наклоненной под углом 45°, головой вниз. Животное удерживают в течение 5 секунд, чтобы предоставить возможность зафиксироваться. Если рефлекс сформирован, то мышь разворачивается на 180° и начинает движение вверх. Тест повторяют три раза для каждого животного. Если ни в одной из попыток в течение 2 минут не происходило поворота, то рефлекс считался несформированным.

2.4 Забор тканей и оценка органных индексов

Мыши были подвергнуты быстрой декапитации в обоих экспериментах, после чего был произведен забор отделов мозга (гипоталамус, фронтальная

кора), плазмы крови, надпочечников и селезенки. Цельный мозг был заморожен в жидком азоте с использованием специальной среды (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek USA). Все образцы замораживались в жидком азоте и потом хранились на -80°C до последующего анализа. Из цельного мозга в дальнейшем были выделены дорсальный и вентральный гиппокамп на криотоме. Аликвота для общего анализа крови не замораживалась, сразу после выведения животных из эксперимента передавалась на гемоанализатор.

2.5 Реакция обратной транскрипции

РНК экстрагировали из замороженной ткани с помощью PureZol (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя. Полученные образцы РНК очищали на магнитных частицах Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, Германия) и разбавляли бидистиллированной водой. Качество и количество РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000. Образцы, в которых количество РНК было ниже 50 нг/мкл выбраковывались.

Для оценки уровня экспрессии генов с помощью ПЦР в реальном времени, необходимо было получить кДНК. Для этого с очищенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции. Для проведения реакции использовали реагенты для ревертирования из набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», Литва).

Для реакции к 1 мкг РНК добавляли 1.0 мкл 100 μM гексануклеотидных праймеров, доводили бидистиллированной водой до общего объема 12.5 мкл. Полученную смесь инкубировали при 65°C 5 минут, затем 5 минуты держали на льду. Далее к образцам добавляли 5-кратный реакционный буфер – 4 мкл, ингибитор РНКаз (20 U/мкл) – 0.5 мкл, 2.0 мкл 10 mM dNTP Mix, 1.0 мкл фермента Revert Aid (200 U/мкл) и бидистиллированную воду до объема 20 мкл. Полученный раствор суспендировали и инкубировали при 25°C 5 минут, затем 42°C 60 минут и далее 5 минут при 70°C . После реакции все образцы разводили в 5 раз и проводили ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

2.6 Полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

ПЦР в реальном времени проводили с помощью готового коммерческого набора Мастер микс BioMaster HS-qPCR («Biolabmix», Россия) в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 10 мкл 2X BioMaster HS-qPCR, 2 мкл образца кДНК, 10 pmol (2 мкл раствора, содержащего 5 pmol) TaqMan зонда («ДНК-Синтез», Москва), по 10 pmol (2 мкл раствора, содержащего 5 pmol) прямого (for) и обратного (rev) праймеров («Биоссет», Новосибирск, таблица 1), 2 мкл бидистиллированной воды.

Реакцию проводили с предварительной денатурацией при 95 °С в течение 5 мин с последующими 39 циклами амплификации, включающими денатурацию при 95 °С в течение 5 секунд, отжиг праймеров и элонгация при 60 °С в течение 20 секунд. Съём флюоресценции в реальном времени проводили в конце каждого цикла на стадии элонгации. Реакцию для каждой пробы проводили в трех повторях.

Для оценки уровня экспрессии проводили нормализацию на референсные гены *Pik3c3* (белковый продукт - фосфатидилинозитол-3-киназная каталитическая субъединица, III) и *Rab22a1* (белковый продукт - RAS-родственный белок Rab 22A). Оценку относительного уровня экспрессии генов проводили с использованием значений пороговых циклов Ct по методу $\Delta\Delta Ct$.

Для оценки нейровоспаления в отделах головного мозга животных мы провели анализ генов *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein, маркера реактивных астроцитов), *Aif1* (маркера активированной микроглии). Астроциты, наиболее распространенный тип клеток в центральной нервной системе, участвуют в ряде важнейших физиологических функций, включая поддержание целостности гематоэнцефалического барьера путем формирования астроцитарных концевых ножек вокруг эндотелиальных клеток, регуляцию роста аксонов и миелинизацию (Kiray et al., 2016). Повреждение ткани

приводит к увеличению реактивности астроцитов (Sofroniew, Vinters, 2010) с изменениями морфологии, повышенной экспрессией *Gfap* (Pekny et al., 2016). Микроглия – это основные иммунные эффекторные клетки головного мозга, которые активируются при неблагоприятных нервных воздействиях или травмах. Во время гомеостаза, микроглия регулирует гибель клеток и нейрогенез, активно поглощает синаптический материал и играет важную роль в элиминации избыточных синапсов во время постнатального развития (Paolicelli et al., 2011). При активации они участвуют в фагоцитозе, представляют антигены Т-клеткам и высвобождают цитокины/хемокины, последние обеспечивают клеткам способность взаимодействовать друг с другом и управлять сложными многоклеточными процессами (Becher et al., 2017).

Синтез глюкокортикоидов запускается, прежде всего, выработкой кортикотропин-рилизинг гормона (*Crh*), которые опосредует выработку адренкортикотропного гормона. В клетках коры надпочечников адренкортикотропный гормон связывается с меланокортиновым рецептором 2 типа (*Mc2r*). Запускаемый каскад реакций приводит к фосфорилированию стероидогенного белка острой регуляции (*StAR*) (Walker et al., 2015). Непосредственный синтез глюкокортикоидов происходит посредством преобразования холестерина под действием *Cyp11a1* (Manna et al., 2009). Было установлено, что быстрая реакция на стресс опосредована активностью *StAR*, в то время как хроническое воздействие на ГГНС приводит к изменению активности ферментов стероидогенеза (Xing et al., 2010). Для оценки активности изменений активности ГГНС мы оценили экспрессию *Crh* в гипоталамусе животных, а также *StAR*, *Cyp11b1*, *Cyp11a1* и *Had11b1* в надпочечниках.

Ещё одним геном, который реагирует на стресс является ген быстрого ответа *c-Fos*. Белок *c-Fos* является маркером активации нейронов. Чем дольше повторяется стресс, тем меньше идет активация гена *c-Fos* в ответ на него

(Nishi et al., 2012; Horii-Hayashi et al., 2013). При этом наличие опыта разделения с матерью приводит к повышенной активации нейронов после нового дополнительного стрессирования (Rivarola, Suárez, 2009; Fóscolo et al., 2022). Однако имеются работы, в которых опыт раннего постнатального стресса не всегда приводит к изменению экспрессии *c-Fos* в ответ на острый стресс, а лишь меняет паттерн его экспрессии в мозге (Troakes, Ingram, 2009). В нашей работе мы оценили уровень экспрессии гена *c-Fos* в гипоталамусе, дорсальном и вентральном гиппокампе, фронтальной коре, а также в надпочечниках животных.

Таблица 1. Последовательности прямого и обратного праймеров для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательность 5'→3'	
<i>Mc2r</i>	For	CTTGCCGAGAAAGATCCTAC
	Rev	GCCTTGAAGCAGCAGAATC
	Probe	/56-ROXN/CTGAAGCCAGCAAGCCTGCC/3BHQ_2/
<i>Hsd11b1</i>	For	GCTGAAGCAGAGCAATGGCAG
	Rev	GTGATGGACACGTTGACCTTGG
	Probe	/56-ROXN/CCTTGGCTGGGAAAATGACCC/3BHQ_2/
<i>Star</i>	For	AAACTCACTTGGCTGCTCAGTA
	Rev	TGCGATAGGACCTGGTTGAT
	Probe	/56-ROXN/TGAAGGGGTGGCTGCCGAAG/3BHQ_2/
<i>Cyp11b1</i>	For	GCAGAGGCAGAGATGATGC
	Rev	ACAGGCCTGAAAGTGAGGAG
	Probe	56-ROXN/CACCATGTGCTGAAATCCTTCC/3BHQ_2/
<i>c-Fos</i>	For	CGGGTTTCAACGCCGACTA
	Rev	TTGGCACTAGAGACGGACAGA
	Probe	/56-ROXN/AGTCCTGTGTGTTGACAGG/3BHQ_2/
<i>Pik3c3</i>	For	GGATTGGCTGGACAGATT
	Rev	CTCCTTGTCATCGCACTT
	Probe	HEX-ACTTGATGGTTGAGTTTCGCTGTGT-BHQ1
<i>Rab22a</i>	For	GATACGGGTGTGGGTAAATC
	Rev	CTGGACAGTCTTGGTCATAAA
	Probe	Cy5-AGCATCGTGTGGCGGTTTGTG-BHQ2
<i>Aif1</i>	For	GCTTTTGGACTGCTGAAGGC
	Rev	GAAGGCTTCAAGTTTGGACG
	Probe	ROX-AGAGAGGCTGGAGGGGATC-BHQ2
<i>Gfap</i>	For	CCTGAGAGAGATTTCGCACTC
	Rev	GACTCCAGATCGCAGGTCAAG
	Probe	ROX-GCAAGAGACAGAGGAGTGG-BHQ-2

2.7 Анализ уровня кортикостерона

Цельную кровь животных, полученную после декапитации, центрифугировали в течение 10 минут на 3000 g, отбирали супернатант. Процедуру повторяли дважды. Далее сыворотку крови хранили при -70°C . Измерение уровня кортикостерона было проведено при помощи коммерческого набора Corticosterone HS (High Sensitivity) Competitive enzyme immunoassay (EIA), AC-15F1, («Immunodiagnostic systems», USA) согласно инструкции, предлагаемой производителем. Оценка уровня флуоресценции была выполнена на планшетном спектрофотометре VICTOR3 («Perkin Elmer», США).

2.8 Общий анализ крови

После забоя животных кровь отбиралась в 1.5 мл пробирки (Eppendorf, Germany), содержащие 100 мкл ЭДТА. После этого осуществлялось перемешивание крови с ЭДТА пипетированием. Дальнейшая пробоподготовка для анализа осуществлялась сотрудником ЦКП «SPF виварий» Понамаревой Светланой Борисовной. Общий анализ крови производился с помощью гемоанализатора BC-2800 Vet (Mindray auto hematology analyzer). Анализ состава популяции лимфоцитов проводился на проточном цитометре BD FACSCanto™ II с использованием антител: anti mouse CD45-PE/Cy7, anti mouse CD19-FITC, anti mouse CD4-FITC, anti mouse CD8-PE/Cy7, anti mouse CD3-PE.

2.9 Статистическая обработка данных

Статистический анализ был выполнен с использованием программы Statistica 6.0. Нормальность распределения оценивалась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова, а критерий Левена - для оценки равенства дисперсий. В целом поведенческие данные были распределены нормально. Статистический анализ выполняли с помощью ANOVA (ранний постнатальный стресс/воспаление, линия животных и острый стресс служили факторами) и теста Фишера (LSD) в качестве апостериорного анализа.

Различия между группами мышей считали статистически значимыми при $p < 0,05$; незначительный тренд предполагался при $p < 0,1$. Для анализа неонатальных рефлексов использовался хи-квадрат для межгруппового сравнения. Данные по весу в обоих экспериментах анализировались при помощи ANOVA для повторных измерений. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

3. Результаты

3.1 Эксперимент 1 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках

3.1.1 Вес тела животных и индекс надпочечников

При анализе веса тела (Рис. 3А) самцов мышей обеих линий мы обнаружили эффект взаимодействия факторов «День x Линия» [$F(2,94) = 95.009$, $p < 0.001$]. Самцы линии BTBR имели достоверно ($p < 0.001$ для всех точек измерения) больший вес тела по сравнению с животными линии B6 в 16, 21, 31 и 41 ДЖ.

Анализ индекса надпочечников самцов мышей (Рис. 3Б) выявил значительное влияние фактора «Линия» [$F(1,75) = 44.535$, $p < 0.001$] и взаимодействия факторов «Стресс x Линия» [$F(3,72) = 4.309$, $p = 0.041$] на этот параметр. Так, у животных линии BTBR был значительно ($p < 0.001$) снижен индекс надпочечников по сравнению с линией B6. *Post hoc* анализ выявил, что относительный вес надпочечников в группе B6-MS с опытом раннего постнатального стресса был достоверно ниже ($p = 0.032$) по сравнению с группой B6-NC.

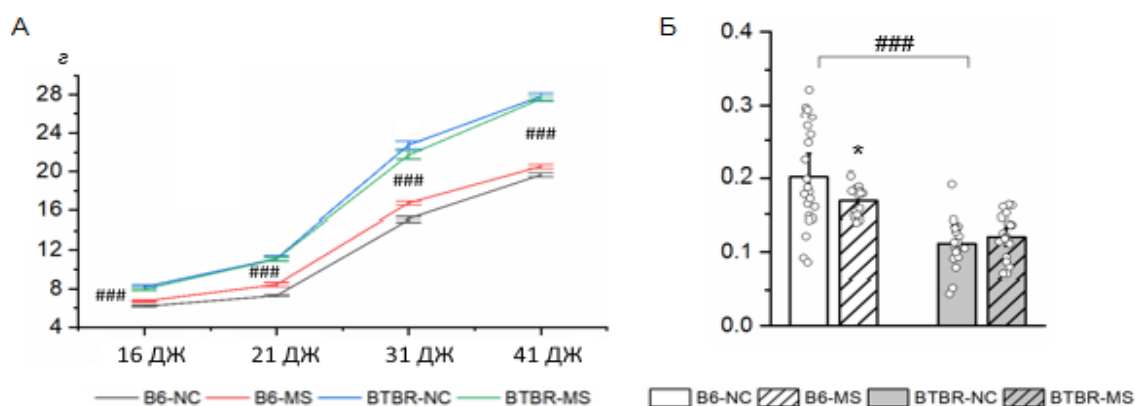


Рисунок 3. Динамика веса тела (А) и индекс надпочечников (Б) самцов мышей обеих линий. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- B6-MS vs. B6-NC; # -- BTBR vs. B6. * $p < 0.05$; ### $p < 0.001$

3.1.2 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение животных в ювенильный период

На 23 ДЖ была произведена оценка социального поведения ювенильных животных с опытом и без опыта раннего постнатального стресса (Рис. 4А). При анализе двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA поведения самцов мышей не было обнаружено влияние фактора «Линии» на индекс социального взаимодействия [$F(1,68) = 3.10, p = 0.082$]. У самцов линии ВТBR наблюдалась тенденция к снижению индекса социального взаимодействия, однако, наблюдаемые различия не достигали достоверности.

Кроме того, на 23 ДЖ в тесте «Открытое поле» было проанализировано влияние раннего постнатального стресса на тревожное поведение (время нахождения в центре) и двигательную активность животных обеих линий (пройденный путь). Так, мы не обнаружили ($p > 0.05$) влияние ни одного из факторов на тревожное поведение животных в тесте «Открытое поле» (данные не приводятся). При анализе двигательной активности в этом тесте было выявлено, что на этот параметр теста влиял фактор «Стресс» [$F(1,38) = 6.22, p = 0.015$]. Так, самцы линии ВТBR с опытом раннего постнатального стресса демонстрировали достоверное увеличение двигательной активности по сравнению с нестрессированным контролем (ВТBR-MS vs. ВТBR-NC $p < 0.001$). У животных линии В6 не было отмечено аналогичного влияния раннего постнатального стресса на двигательную активность. Кроме того, было обнаружено, что на этот тип поведения также влияет фактор «Линия» [$F(1,38) = 37.55, p < 0.001$]. Так, самцы линии ВТBR демонстрировали достоверно ($p < 0.001$) повышенную двигательную активность относительно животных линии В6. При более детальной оценке двигательной активности животных в тесте «Открытое поле» мы обнаружили, что фактор «Линия» оказывал влияние на этот параметр как при оценке пути, пройденного в центре [$F(1,38) = 11.35, p = 0.001$], так пути, пройденного на периферии [$F(1,38) = 21.79, p < 0.001$]. Так, мыши линии ВТBR демонстрировали достоверное (центр: $p = 0.001$;

периферия: $p < 0.001$) увеличение пройденного пути в обеих частях арены по сравнению с мышами В6. Однако на путь, пройденный на периферии, достоверное влияние ещё оказывал фактор «Стресс» [$F(1,38) = 4.56, p = 0.039$]. Самцы линии VTBR с опытом MS достоверно ($p = 0.035$) больше двигались на периферии по сравнению со своим нестрессированным контролем.

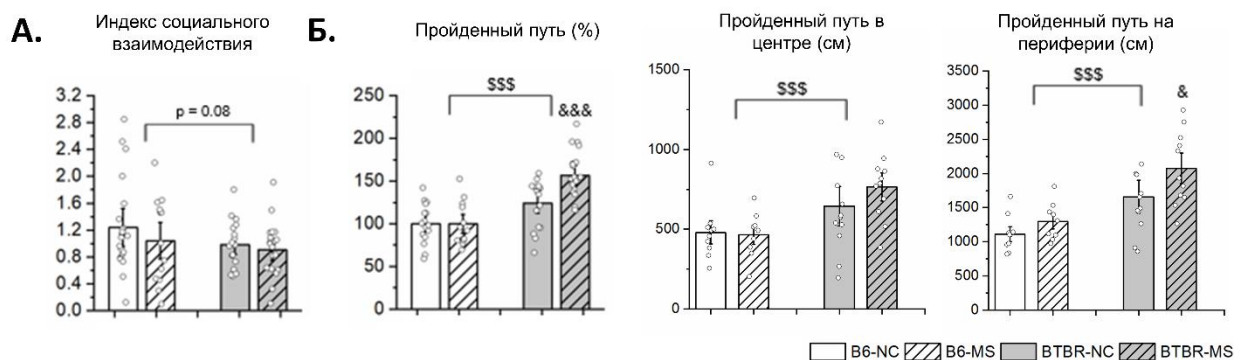


Рисунок 4. А – индекс социального взаимодействия в тесте «Социальное взаимодействие»; Б – пройденный путь в тесте «Открытое поле». Данные представлены как среднее значение \pm SEM, & -- VTBR-MS vs. VTBR-NC; \$ -- VTBR vs. B6. & $p < 0.05$; &&& $p < 0.001$; \$\$\$ $p < 0.001$

3.1.3 Влияние раннего постнатального стресса на социальное и индивидуальное поведение самцов в подростковом периоде

Поведение животных было оценено на 38 день жизни в тесте «Светлая-темная камера» (Рис. 5Б). При анализе поведения был обнаружен эффект фактора «Линия» на латентное время до первого выхода в светлую зону [$F(1,43) = 7.72, p = 0.008$], а также на количество выглядываний в светлую зону [$F(1,43) = 22.06, p < 0.001$]. Так, самцы мышей линии VTBR больше времени ждали до выхода в светлый отсек, при этом опыт раннего постнатального стресса у группы VTBR-MS приводил к достоверному ($p=0.045$) снижению латентного времени по сравнению со своим нестрессированным контролем. Кроме того, был обнаружен значительный эффект фактора «Стресс» на общее время в светлой камере [$F(1,43) = 5.88, p = 0.019$], а также на среднюю продолжительность каждого такого выхода [$F(1,43) = 5.49, p = 0.024$], но не на количество выходов в светлый отсек. Так, самцы B6-MS демонстрировали повышенное общее и среднее время нахождения в светлой части камеры относительно их нестрессированного контроля B6-NC. У самцов линии VTBR

аналогичного эффекта не наблюдалось. Так же фактор «Стресс» оказывал влияние и на продолжительность сидения на пороге [$F(1,43) = 8.00, p = 0.007$]: животные обеих линий с опытом MS достоверно меньше времени проводили между перегородками двух камер по сравнению со своими нестрессированными контролями ($p < 0.05$). Ещё один параметр теста, на который оказал влияние фактор «Стресс» — частота подъемов на задние лапы [$F(1,43) = 4.30, p = 0.044$]: наличие опыта разделения с матерью в ранний постнатальный период приводило к снижению этого параметра у самцов линии B6, но не у VTBR.

На 37 день жизни животных был проведен тест «Социальное взаимодействие» для оценки влияния раннего постнатального стресса на социальное поведение животных (Рис. 5Б). При анализе поведения самцов в этом тесте мы обнаружили только влияние фактора «Линия» на этот тип поведения [$F(1,68) = 8.70, p < 0.005$]. Так, самцы линии VTBR обладали достоверно ($p < 0.01$) сниженным социальным поведением по сравнению с животными линии B6.

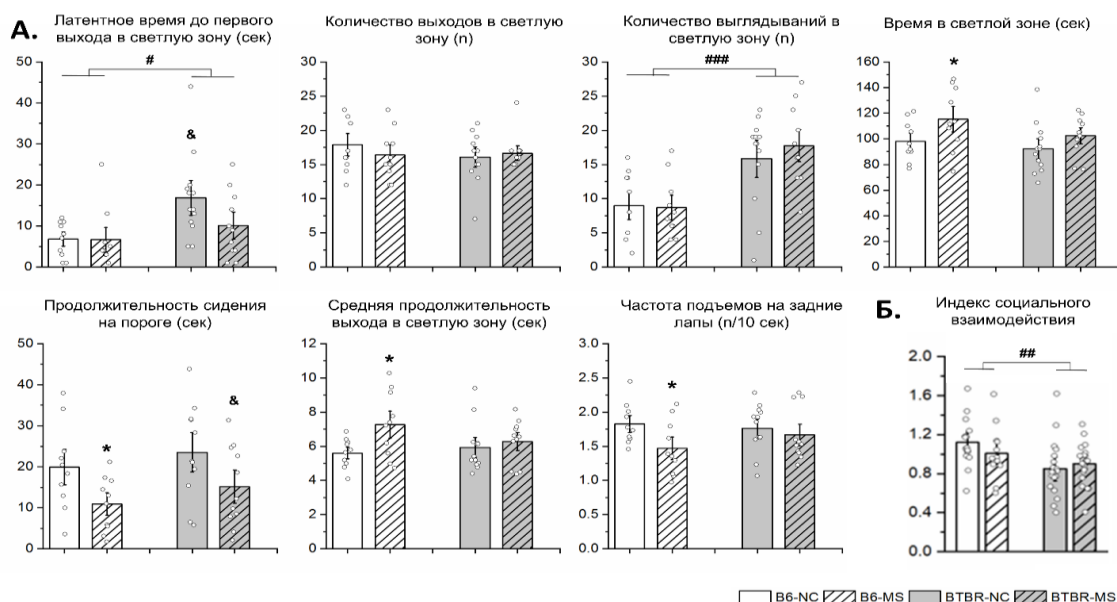


Рисунок 5. А – поведение животных в тесте «Темная-светлая камера», Б – индекс социального взаимодействия в тесте «Социальное взаимодействие». Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- B6-MS vs. B6-NC; & -- VTBR-MS vs. VTBR-NC; # -- VTBR vs. B6. * $p < 0.05$; & $p < 0.05$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

3.1.4 Анализ уровня кортикостерона в сыворотке животных

Уровень кортикостерона в плазме самцов оценивался на 41 день жизни во всех группах, как без стресса, так и после острого стресса. На этот анализируемый параметр мы выявили влияние нескольких факторов, а также их взаимодействия: «Линия» [$F(1,75) = 32.769, p < 0.001$], «Стресс» [$F(1,75) = 5.842, p = 0.018$], «Рестрикция» [$F(1,75) = 588.990, p < 0.001$], «Линия x Рестрикция» [$F(3,72) = 36.272, p < 0.001$] и «Стресс x Рестрикция» [$F(3,72) = 5.338, p = 0.023$] (Рис. 6А). Так наибольший эффект на этот параметр оказало острое стрессирование животных. Во всех группах наблюдалось достоверное ($p < 0.001$) увеличение уровня кортикостерона в плазме по сравнению с нестрессированными животными. Однако, при сравнении линий В6 и ВТВР было выявлено, что животные линии ВТВР демонстрируют достоверно ($p < 0.001$) большее увеличение кортикостерона в ответ на рестрикцию. Примечательно, что мыши линии В6-MS, которые имели опыт стресса в раннем постнатальном периоде, демонстрировали меньшее увеличение кортикостерона в ответ на острый стресс по сравнению с контрольной группой В6-NC ($p = 0.001$); аналогичный эффект не наблюдался у линии ВТВР.

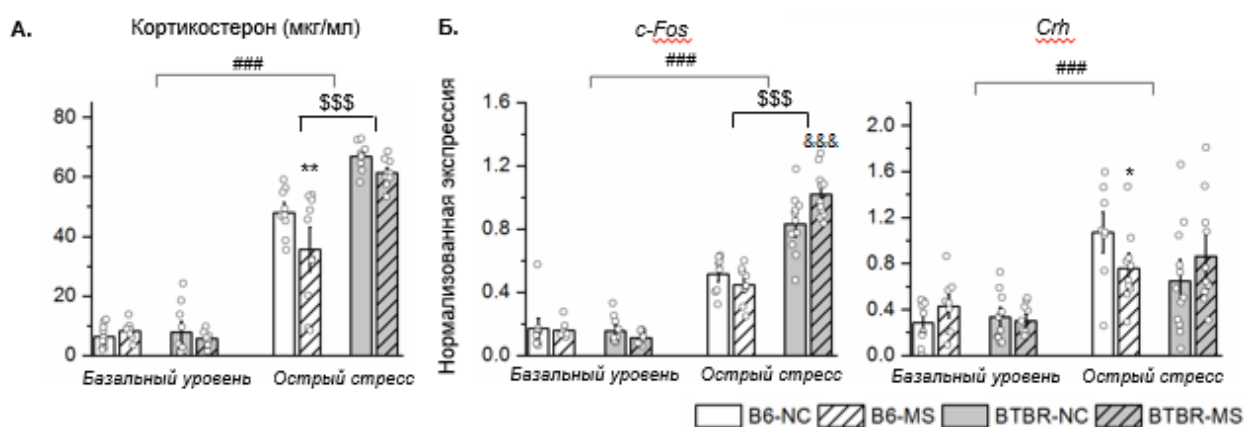


Рисунок 6. А – уровень кортикостерона в плазме животных с опытом и без опыта раннего стресса на базальном уровне и после предъявления острого стресса; Б – уровень экспрессии генов *c-Fos* и *Crh* в гипоталамусе животных. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- B6-MS vs. B6-NC; & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; \$ -- BTBR vs. B6; # -- базальный уровень vs. острый стресс. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$; \$\$\$ $p < 0.001$; ### $p < 0.001$

3.1.5 Анализ уровня экспрессии генов *c-Fos* и *Crh* в гипоталамусе

На уровень экспрессии гена *c-Fos* оказали влияние факторы «Линия» [$F(1,68) = 51.067, p < 0.001$], «Рестрикция» [$F(1,68) = 363.495, p < 0.001$], а также взаимодействие факторов «Стресс x Рестрикция» [$F(3,67) = 66.830, p < 0.001$] и «Линия x Стресс x Рестрикция» [$F(5,65) = 6.227, p = 0.015$] (Рис. 6Б). Так, острое стрессирование мышей рестрикцией вызывает достоверное ($p < 0.001$) увеличение уровня мРНК *c-Fos* в гипоталамусе животных как с опытом раннего постнатального стресса, так и без него. Однако, мыши линии ВТВР демонстрировали достоверно ($p < 0.001$) более высокие уровни экспрессии мРНК после острого стресса по сравнению с животными линии В6. Кроме того, опыт раннего стресса у животных линии ВТВР оказывал влияние на экспрессию *c-Fos*: так, животные группы ВТВР-MS демонстрировали достоверно ($p < 0.001$) больший подъем уровня мРНК после острого стресса рестрикции по сравнению с ВТВР-НС.

Для оценки реактивности ГГНС на центральном уровне регуляции мы проанализировали уровень мРНК *Crh* в гипоталамусе. Было выявлено, что на этот исследуемый параметр оказывает только фактор «Рестрикция» [$F(1,72) = 45.733, p < 0.001$], а также взаимодействие факторов «Линия x Стресс x Рестрикция» [$F(1,72) = 5.685, p = 0.019$]. Так, все группы животных ответили достоверным подъёмом мРНК этого гена после острого стресса рестрикции ($p < 0.001$). Однако животные линии В6-MS продемонстрировали меньшую ($p = 0.049$) стресс-реактивность: у них наблюдался меньший подъем *Crh* после острого стресса по сравнению с группой В6-НС. У животных линии ВТВР опыт раннего постнатального стресса не приводил к изменению стресс-реактивности ГГНС на уровне центрального звена.

3.1.6 Анализ влияния опыта разделения с матерью в раннем постнатальном периоде на стресс-реактивность генов в надпочечниках

На уровень экспрессии генов *Cyp11b1* и *Cyp11a1* было выявлено влияние нескольких факторов: так, на них обоих достоверное влияние

оказывали факторы «Линия» [*Cyp11b1*: $F(1,67) = 4.997$, $p = 0.028$; *Cyp11a1*: $F(1,60) = 10.974$, $p = 0.001$], «Рестрикция» [*Cyp11b1*: $F(1,67) = 99.735$, $p < 0.001$; *Cyp11a1*: $F(1,60) = 22.225$, $p < 0.001$], а также их взаимодействие «Линия x Рестрикция» [*Cyp11b1*: $F(3,65) = 7.211$, $p = 0.009$; *Cyp11a1*: $F(3,58) = 5.236$, $p = 0.025$]. Так, *post hoc* анализ выявил, что воздействие острым стрессом достоверно (*Cyp11b1*: $p < 0.001$; *Cyp11a1*: $p < 0.001$) увеличивало уровень мРНК обоих генов в надпочечниках.

При анализе экспрессии генов *Mc2r* и *Star* был обнаружен достоверный эффект только для фактора «Рестрикция» [*Mc2r*: $F(1,67) = 19.808$, $p < 0.001$; *Star*: $F(1,67) = 81.841$, $p < 0.001$]. Острое стрессирование животных рестрикцией приводило к достоверному (*Mc2r*: $p < 0.001$; *Star*: $p < 0.001$) увеличению мРНК этих генов в надпочечниках животных как с опытом раннего постнатального стресса, так и без него.

Оценка изменений мРНК *c-Fos* в надпочечниках животных выявила, что на этот параметр достоверное влияние оказывали факторы «Линия» [$F(1,59) = 40,329$, $p < 0.001$], «Рестрикция» [$F(1,59) = 45,535$, $p < 0.001$], а также взаимодействия «Линия x Рестрикция» [$F(3,57) = 34,367$, $p < 0.001$] и «Линия x Рестрикция x Стресс» [$F(5,55) = 4,956$, $p = 0.029$]. *Post hoc* анализ выявил, что рестрикция приводила к достоверному ($p < 0.001$) увеличению уровня мРНК *c-Fos* в надпочечниках всех групп животных. Однако, линия ВТВР демонстрировала достоверно ($p < 0.001$) большую стресс реактивность относительно аналогичных групп В6. Кроме того, на уровень мРНК этого гена у линии ВТВР оказывал влияние опыт раннего постнатального стресса: животные ВТВР-MS демонстрировали достоверно ($p < 0.05$) больший подъем *c-Fos* в ответ на острый стресс по сравнению с нестрессированным контролем ВТВР-НС.

На уровень экспрессии гена *Hsd11b1* мы обнаружили влияние только фактора «Линия» [$F(1,59) = 10,162$, $p = 0.002$]. Так, у животных линии ВТВР

после предъявления острого стресса было достоверно ($p = 0.021$) меньшее повышение уровня мРНК анализируемого гена, чем у В6.

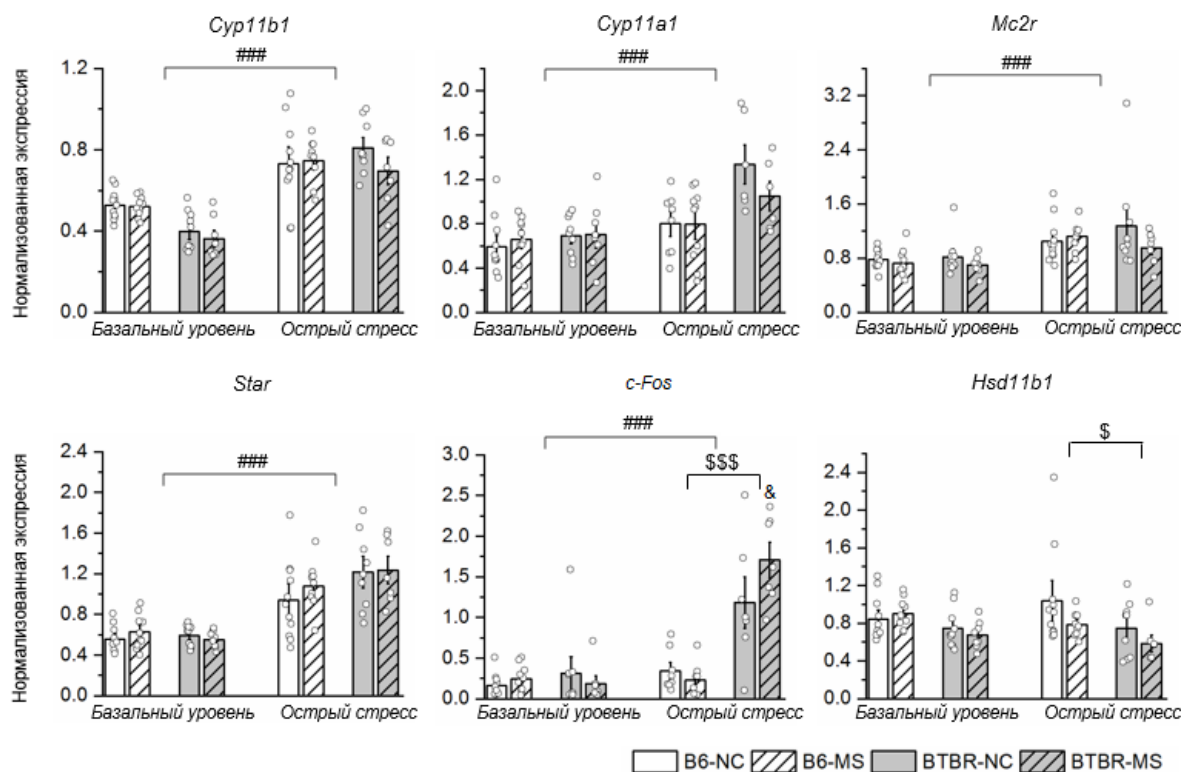


Рисунок 7. Уровень экспрессии ключевых стресс-реактивных генов в надпочечниках животных с опытом и без опыта раннего стресса на базальном уровне и после предъявления острого стресса. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; \$ -- BTBR vs. B6; # -- базальный уровень vs. острый стресс. \$ $p < 0.05$; \$\$\$ $p < 0.001$; & $p < 0.05$; ### $p < 0.001$.

3.1.7 Влияние раннего постнатального стресса на нейровоспаление в гиппокампе и фронтальной коре мышей

При оценке уровня экспрессии гена *c-Fos* в структурах мозга самцов мышей мы обнаружили, что во фронтальной коре, дорсальном и вентральном гиппокампе на этот параметр достоверное влияние оказывали фактор «Рестрикция» [фронтальная кора: $F(1,38) = 13,958$, $p < 0.001$; дорсальный: $F(1,38) = 16,710$, $p < 0.001$; вентральный: $F(1,38) = 22,948$, $p < 0.001$]. Кроме того, в дорсальном и вентральном гиппокампе на уровень экспрессии гена *c-Fos* также достоверно влияло взаимодействие факторов «Линия x Рестрикция» [дорсальный: $F(3,35) = 16,474$, $p < 0.001$; вентральный: $F(3,35) = 12,519$, $p =$

0.001] (Рис. 8). Так, у животных обеих линий независимо от отсутствия или наличия опыта раннего постнатального стресса острый стресс рестрикции приводил к достоверному ($p < 0.001$) увеличению уровня мРНК гена *c-Fos* как во фронтальной коре, так и в обоих отделах гиппокампа. При этом в дорсальном ($p = 0.002$) и вентральном ($p = 0.007$) отделе гиппокампа у самцов мышей линии ВТВР наблюдаемое повышение экспрессии этого гена было достоверно более выраженным, чем у мышей линии В6, независимо от опыта MS. При этом во фронтальной коре *post hoc* сравнение между группами не выявило аналогичного более выраженного подъема уровня экспрессии в ответ на рестрикцию у всех мышей линии ВТВР, а только у группы ВТВР-MS относительно ее нестрессированного контроля ВТВР-NC ($p=0.040$).

На уровень экспрессии гена *Aif1* в фронтальной коре оказали влияние факторы «Линия» [$F(1,38) = 7,756, p = 0.009$], «Рестрикция» [$F(1,38) = 16,152, p < 0.001$], «Стресс» [$F(1,38) = 5,910, p = 0.022$], а также взаимодействие факторов «Линия x Рестрикция» [$F(3,36) = 5,182, p = 0.031$]. Так, уровень мРНК этого гена достоверно ($p < 0.001$) повышался у самцов мышей обеих линий после острого стресса рестрикции, независимо от опыта раннего стресса. При этом у самцов ВТВР наблюдаемое повышение в ответ на острый стресс было достоверно ($p = 0.001$) менее выраженным при сравнении с мышами линии В6: кроме того, опыт MS у ВТВР приводил к еще меньшему подъему по сравнению с группой ВТВР-NC ($p < 0.001$). В вентральном гиппокампе при анализе уровня *Aif1* было обнаружено влияние факторов «Стресс» [$F(1,38) = 4,802, p = 0.037$] и «Рестрикция» [$F(1,38) = 7,980, p = 0.008$]. Так, острый стресс рестрикции приводил к снижению уровня мРНК *Aif1* в вентральном гиппокампе у мышей обеих линий. Однако наличие опыта MS у мышей линии ВТВР приводила к достоверно ($p = 0.015$) менее выраженному снижению мРНК этого гена в ответ на рестрикцию по сравнению с группой ВТВР-NC. В дорсальном гиппокампе не было выявлено влияния исследуемых факторов на уровень *Aif1* ($p > 0.05$).

На уровень экспрессии гена *Gfap* не было выявлено влияние факторов «Линия», «Рестрикция», «Стресс» или их взаимодействия во всех трех структурах головного мозга самцов мышей линий В6 и ВТВР.

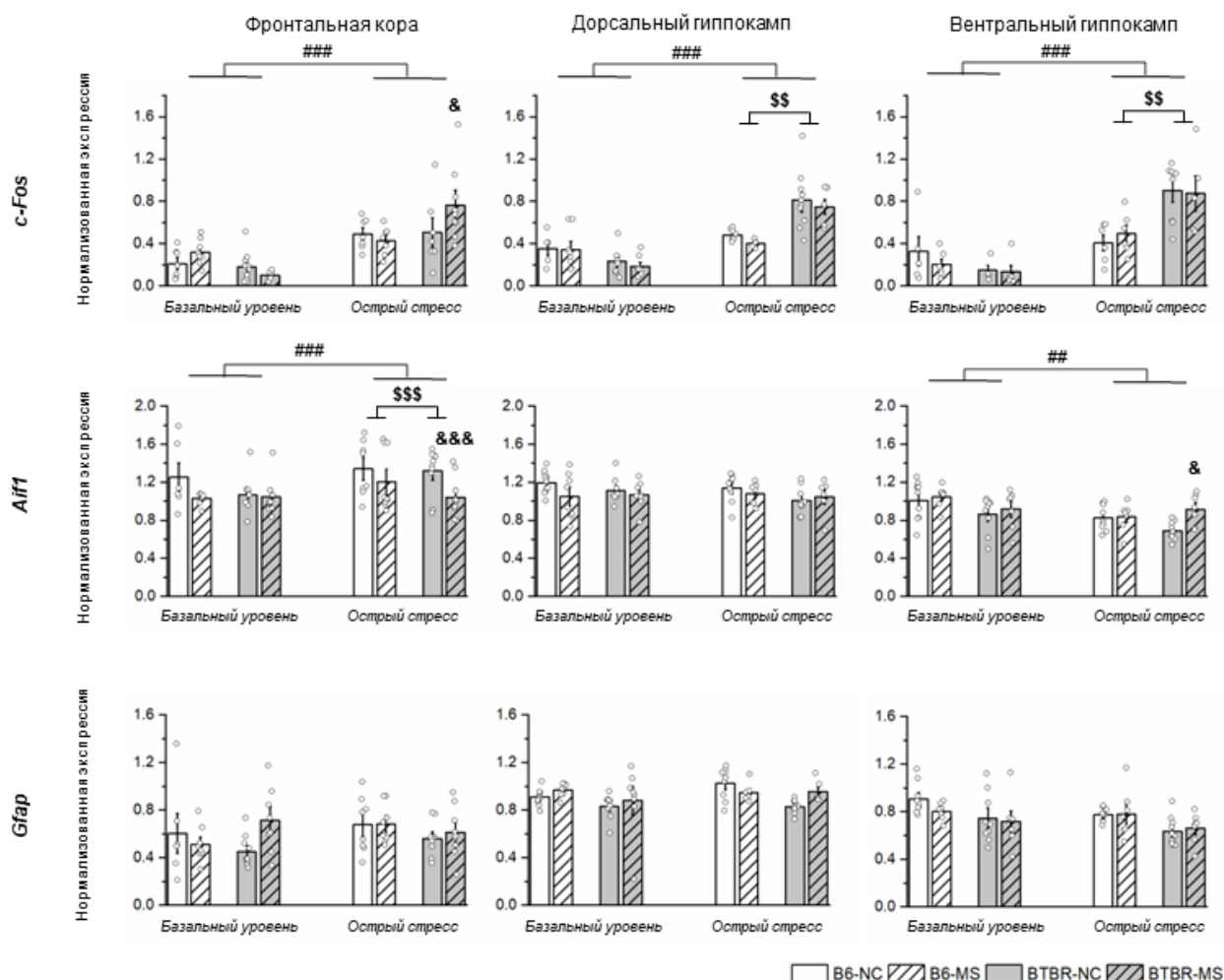


Рисунок 8. Уровень экспрессии генов в фронтальной коре, дорсальном и вентральном гиппокампе животных с опытом и без опыта раннего стресса на базальном уровне и после предъявления острого стресса. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; \$ -- BTBR vs. B6; # -- базальный уровень vs. острый стресс. & p < 0.05; &&& p < 0.001; \$\$ p < 0.01; \$\$\$ p < 0.001; ## p < 0.01; ### p < 0.001

3.2 Эксперимент 2 Влияние воспалительного стресса в раннем возрасте на социальное и индивидуальное поведение мышей линий C57Bl/6 и BTBR в различных возрастных точках

3.2.1 Влияние воспаления в ранний постнатальный период на вес тела и органные индексы селезенки и надпочечников

При анализе веса тела с 3 по 21 дни жизни (Рис. 9А) самцов мышей обеих линий мы выявили, что на этот показатель повлияли факторы «День» [F(4,956)

= 5931,618, $p < 0.001$], «День x Группа» [$F(12,956) = 3,425$, $p < 0.001$] и «День x Линия» [$F(4,956) = 453,448$, $p < 0.001$]. У мышей В6 введение препаратов не оказывало достоверного влияние на вес тела с 3 по 8 ДЖ, но на 16 ДЖ мы обнаружили, что у группы LPS вес был достоверно ниже, чем у всех остальных групп введения (S vs. LPS $p = 0.034$, Poly vs. LPS $p = 0.004$, LPS+Poly vs. LPS $p = 0.016$), что сохранилось и к 21 ДЖ (S vs. LPS $p < 0.001$, Poly vs. LPS $p = 0.007$, LPS+Poly vs. LPS $p = 0.037$). Кроме того, на 21 ДЖ и группа с сочетанным введением LPS+Poly демонстрировала достоверно меньший вес по сравнению с контрольной группой (S vs. LPS+Poly $p = 0.024$). У мышей линии BTBR межгрупповые различия начали проявляться раньше: так, уже на 5 ДЖ вес группы с сочетанным введением препаратов был на уровне тенденции ($p = 0.054$) ниже, чем у группы с моноведением Poly, что сохранилось и на 8 ДЖ ($p = 0.069$). Кроме того, на 8 ДЖ вес группы LPS+Poly был так же на уровне тенденции ($p = 0.064$) ниже, чем у контрольной группы. К 16 ДЖ вес в группах с введением препаратов у самцов мышей линии BTBR стал достоверно ниже, чем в контрольной группе (S vs. LPS $p = 0.001$, S vs. Poly $p = 0.023$, S vs. LPS+Poly $p = 0.032$). При этом данная тенденция сохранилась и к 21 ДЖ: так, контрольная группа с введением физраствора была больше по весу, чем остальные группы (S vs. LPS $p = 0.007$, S vs. LPS+Poly $p = 0.014$); кроме группы с введением Poly, которая к 21 ДЖ прибавила в весе и стала достоверно тяжелее, чем группы с введением LPS и LPS+Poly (Poly vs. LPS $p = 0.014$, Poly vs. LPS+Poly $p = 0.024$).

Анализ веса тела на 24, 40 и 60 ДЖ выявил во всех возрастах значительный эффект фактора «Линия» на этот параметр [24 ДЖ: $F(1,98) = 337.104$, $p < 0.001$; 40 ДЖ: $F(1,87) = 256.914$, $p < 0.001$; 60 ДЖ: $F(1,78) = 792.626$, $p < 0.001$]. Так, самцы мышей линии BTBR имели достоверно больший вес, чем животные линии В6 ($p < 0.001$ для 24, 40 и 60 ДЖ). Кроме того, на 40 ДЖ на параметр веса животных также повлияло сочетание факторов «Группа x Линия» [$F(3,87) = 2.870$, $p = 0.041$]: только самцы мышей

линии BTBR после введения Poly I:C этого возраста имели достоверно более низкий вес, чем контрольная группа BTBR-S (BTBR-P vs. BTBR-S $p = 0.03$), а также группа BTBR с введением LPS (BTBR-P vs. BTBR-L $p = 0.05$).

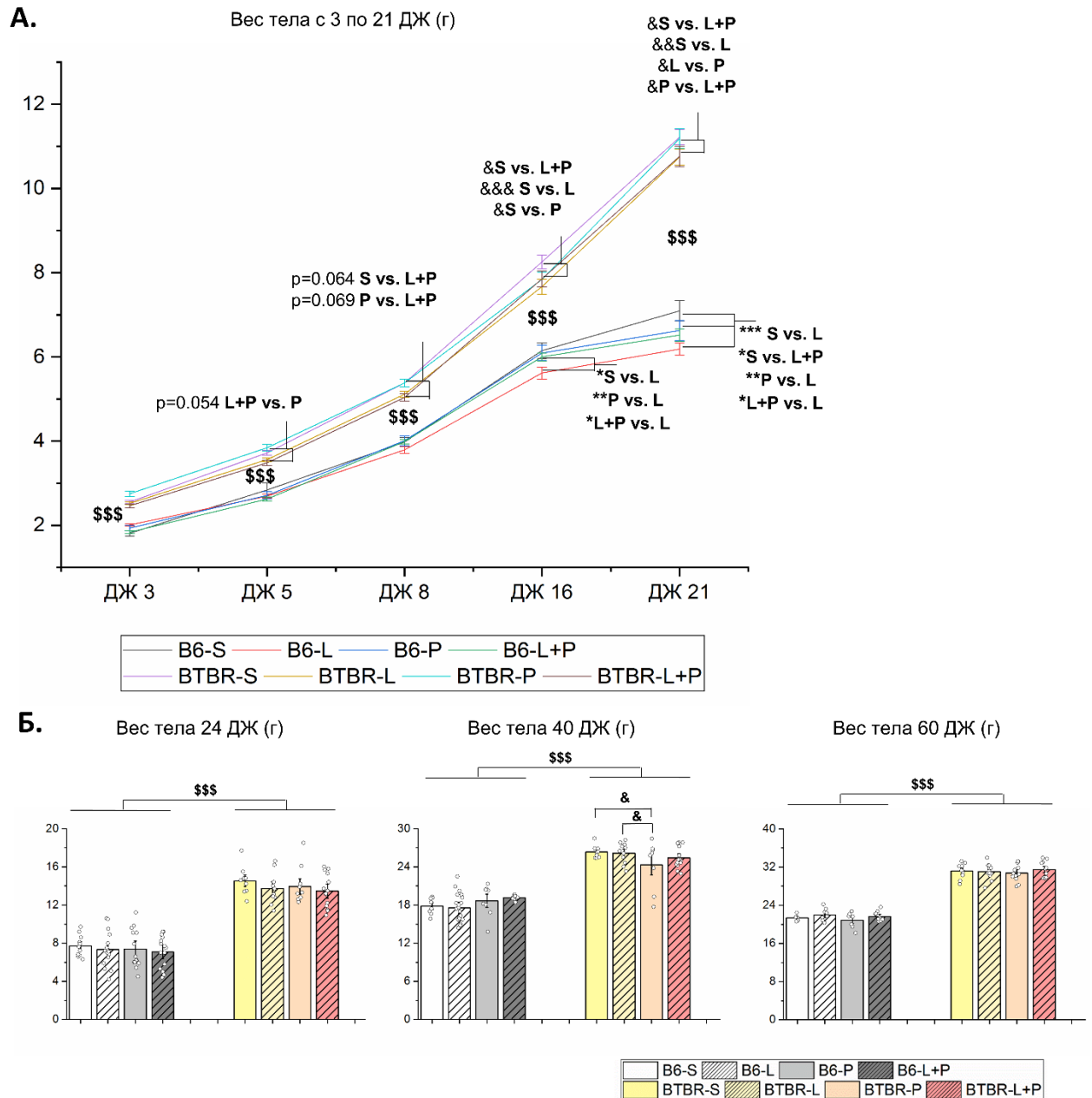


Рисунок 9. А. Вес тела мышей линий В6 и BTBR с 3 по 21 дни жизни. Б. Вес тела мышей линий В6 и BTBR на 24, 40 и 60 дни жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- между группами В6; & -- между группами BTBR; \$ -- BTBR vs. В6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; & $p < 0.05$; && $p < 0.01$; &&& $p < 0.001$; \$\$\$ $p < 0.001$.

При анализе органного индекса надпочечников и селезенки на 24 ДЖ (Рис. 10) мы обнаружили, что на оба этих параметра достоверно влиял только фактор «Линия» [индекс надпочечников: $F(1,98) = 5.633$, $p = 0.019$; индекс

селезенки: $F(1,98) = 26.673$, $p < 0.001$]. Так, у самцов мышей линии ВТВР в этом возрасте относительный вес надпочечников был достоверно ($p = 0.047$) меньше, а относительный вес селезенки, наоборот, достоверно ($p < 0.001$) больше, чем эти параметры у мышей В6.

Анализ данных показателей на 40 ДЖ также выявил достоверное влияние фактора «Линия» [индекс надпочечников: $F(1,87) = 66.952$, $p < 0.001$; индекс селезенки: $F(1,87) = 36.409$, $p < 0.001$], но на 40 день оба индекса были достоверно меньше у мышей линии ВТВР по сравнению с В6 ($p < 0.001$ для обоих параметров). При этом на 40 ДЖ на индекс надпочечников также повлияло сочетание факторов «Линия x Группа» [$F(1,87) = 2.851$, $p = 0.042$]. Было обнаружено, что органнй индекс надпочечников у мышей группы В6 после введения сочетания LPS+Poly I:C был достоверно ниже, чем у мышей этой линии после моно введения LPS (В6-LPS vs. В6-LPS+Poly I:C $p < 0.001$).

На 60 ДЖ наибольшее влияние на органнй индекс оказал влияние фактор «Линия» [индекс надпочечников: $F(1,77) = 54.431$, $p < 0.001$; индекс селезенки: $F(1,77) = 347.678$, $p < 0.001$]. Сохранялась та же тенденция, что и для 40 ДЖ: самцы мышей линии ВТВР обладали достоверно меньшими индексами надпочечников и селезенки, чем мыши линии В6 ($p < 0.001$ для обоих параметров). При этом на индекс надпочечников также оказало влияние взаимодействие факторов «Группа x Линия» [$F(1,77) = 3.157$, $p = 0.030$]. Так, у мышей линии В6 группа с сочетанным введением LPS и Poly I:C обладала меньшим индексом, чем контрольная группа и группа после введения Poly I:C (В6-LPS+Poly I:C vs. В6-S $p = 0.025$; В6-LPS+Poly I:C vs. В6-Poly I:C $p < 0.001$). Кроме того, у мышей этой линии органнй индекс надпочечников был снижен и у группы с моно введением LPS по сравнению с группой Poly I:C (В6-LPS vs. В6-Poly I:C $p = 0.042$). При анализе индекса селезенки на 60 ДЖ мы выявили, что на этот параметр достоверно ещё повлиял фактор «Группа» [$F(1,77) = 4.275$, $p = 0.007$]. Мы обнаружили что относительный вес этого органа был ниже у самцов линии В6 после сочетанного введения LPS и Poly I:C по

сравнению с группами с моноведением LPS или Poly I:C (B6-LPS+Poly I:C vs. B6-Poly I:C $p = 0.002$; B6-LPS+Poly I:C vs. B6-LPS $p = 0.003$).

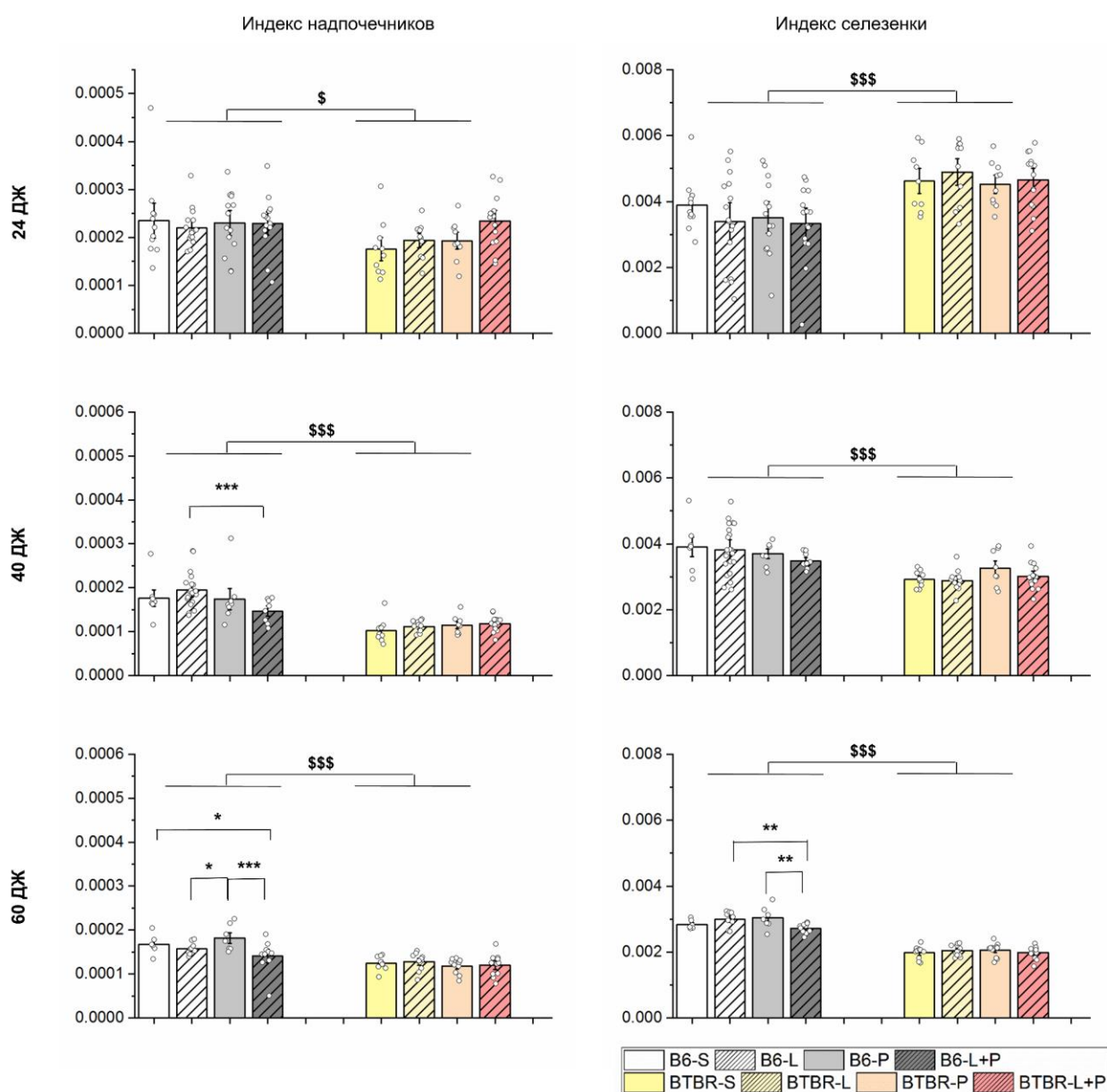


Рисунок 10. Органный индекс надпочечников и селезенки самцов мышей линий B6 и BTBR на 24, 40 и 60 дни жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- между группами B6; \$ -- BTBR vs. B6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; \$ $p < 0.05$; \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2.2 Изменение параметров общего анализа крови у самцов мышей линий B6 и BTBR после индукции воспаления в ранний постнатальный период

Для оценки динамики изменений клеточных компонентов крови был проведен общий анализ крови самцов мышей на 24, 40 и 60 ДЖ.

Анализ крови животных на 24 день жизни выявил, что на количество лейкоцитов и лимфоцитов достоверно повлиял только фактор «Группа» [лейкоциты: $F(3,97) = 2.650$, $p = 0.051$; лимфоциты: $F(3,97) = 3.093$, $p = 0.030$] (Рис. 11). Мыши линии В6 после введения LPS в ранний постнатальный период имели достоверно повышенный уровень лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с группой В6-LPS+Poly (лейкоциты: В6-L vs В6-L+P $p = 0.014$; лимфоциты: В6-L vs В6-L+P $p = 0.027$). Кроме того, мы обнаружили, что на количество тромбоцитов в этот период жизни животных достоверно повлияли факторы «Группа» [$F(3,97) = 3.536$, $p = 0.017$] и «Линия» [$F(1,97) = 7.400$, $p = 0.007$]. Так, у мышей линии ВТВР уровень тромбоцитов был достоверно ($p = 0.012$) выше, чем у В6. При этом также *post hoc* анализ выявил, что у мышей линии В6 с опытом введения LPS количество тромбоцитов было ниже, чем у контрольной группы и группы с введением Poly I:C (В6-L vs В6-S $p = 0.036$; В6-L vs В6-P $p = 0.029$). У мышей линии ВТВР тоже было выявлено влияние введения препаратов: животные с сочетанным введением LPS+Poly I:C демонстрировали пониженное количество тромбоцитов относительно мышей с моновведением Poly I:C (ВТВР-L+P vs. ВТВР-P $p = 0.006$).

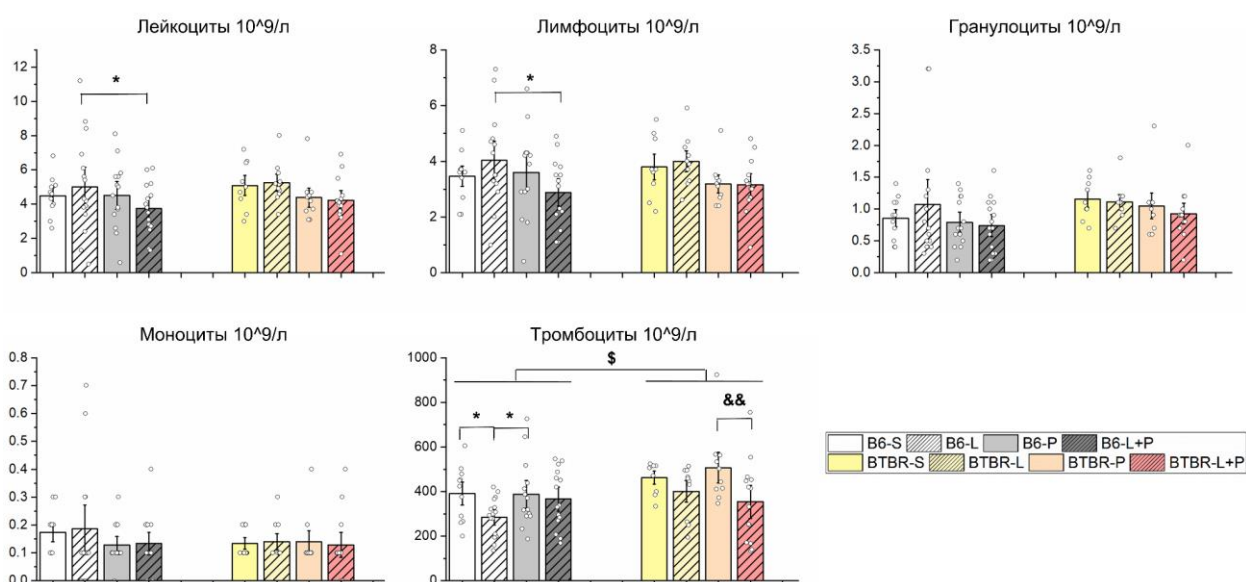


Рисунок 11. Общий анализ крови самцов мышей линий В6 и ВТВР на 24 день жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- между группами В6; & -- между группами ВТВР; \$ -- ВТВР vs. В6. * $p < 0.05$; && $p < 0.01$; \$ $p < 0.05$.

К 40 ДЖ стали проявляться больше межгрупповые различия: так, было обнаружено, что в этот период жизни на количество лейкоцитов и лимфоцитов повлиял только параметр «Линия» [лейкоциты: $F(1,75) = 18.960$, $p < 0.001$; лимфоциты: $F(1,75) = 31.408$, $p < 0.001$] (Рис. 12). Так, оба этих параметра были снижены у самцов мышей линии BTBR по сравнению с животными линии B6 ($p < 0.001$ для лейкоцитов и лимфоцитов).

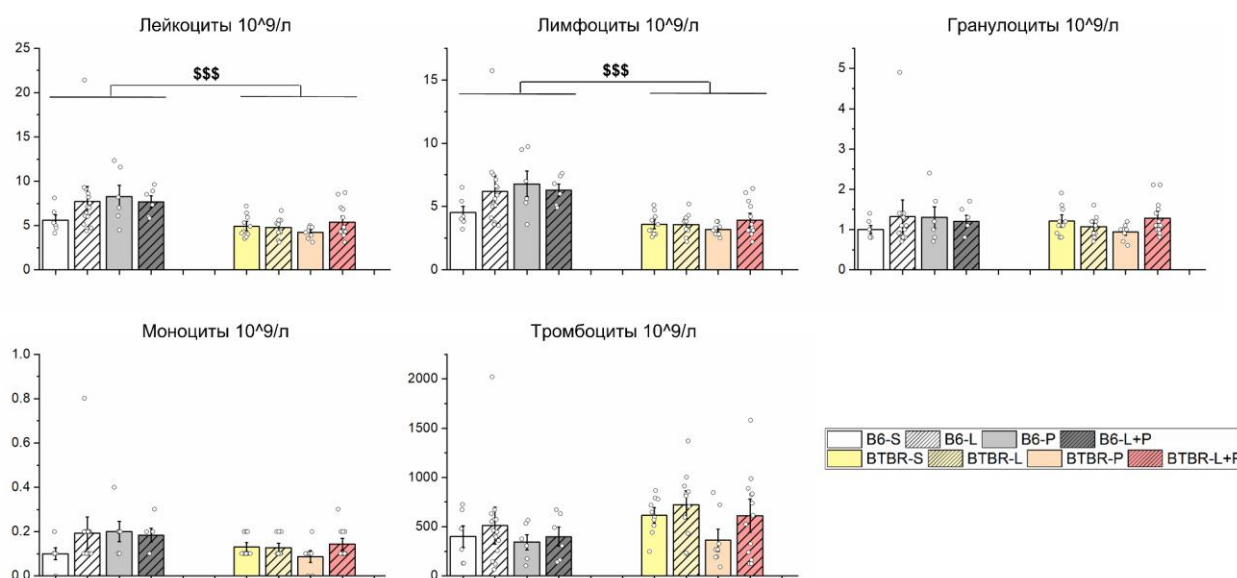


Рисунок 12. Общий анализ крови самцов мышей линий B6 и BTBR на 40 день жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. \$ -- BTBR vs. B6. \$\$\$ $p < 0.001$.

На 60 ДЖ жизни животных мы, так же как на 40 ДЖ, наблюдали только межлинейные различия в параметрах общего анализа крови. Так, на количество лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов в этот период жизни животных достоверно повлиял только фактор «Линия» [лейкоциты: $F(1,78) = 34.728$, $p < 0.001$; лимфоциты: $F(1,78) = 54.581$, $p < 0.001$; моноциты: $F(1,78) = 6.922$, $p = 0.010$] (Рис. 13). У мышей линии BTBR было существенно снижено количество лейкоцитов и лимфоцитов ($p < 0.001$ для обоих параметров), а также моноцитов ($p = 0.012$) относительно животных линии B6.

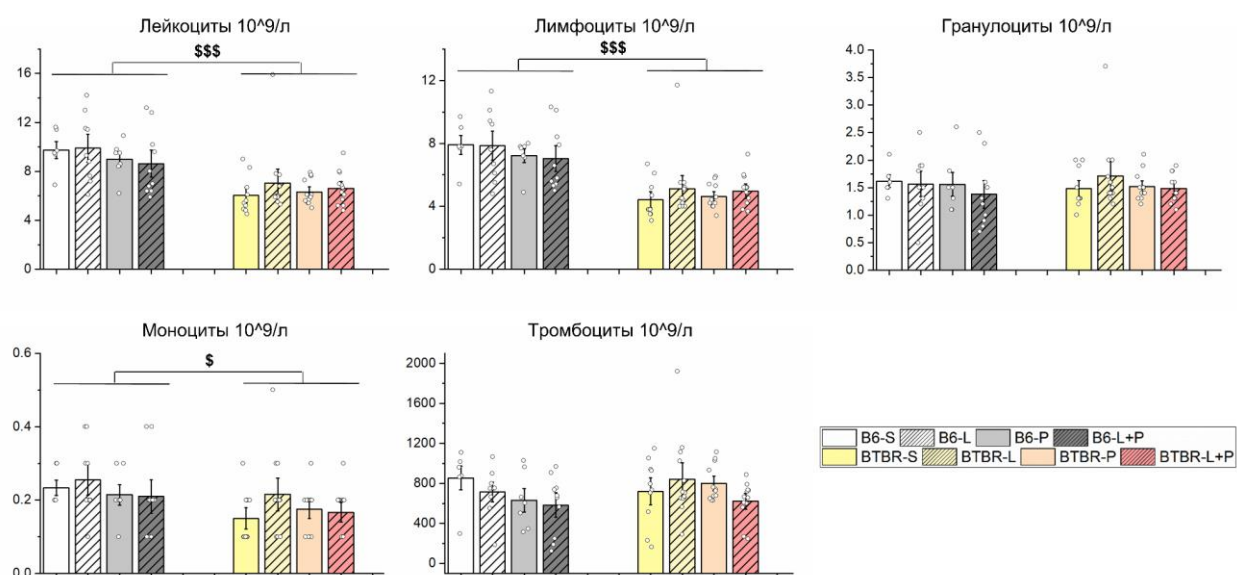


Рисунок 13. Общий анализ крови самцов мышей линий В6 и BTBR на 60 день жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. \$ -- BTBR vs. B6. \$ $p < 0.05$; \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2.3 Оценка неонатальных рефлексов после индукции воспаления

Для оценки раннего постнатального развития на 5 и 8 ДЖ мышей обеих линий подвергали тестированию на хватательный рефлекс, рефлекс отрицательного геотаксиса, а также рефлекс избегания обрыва (Рис. 14).

При статистической обработке результатов оценки хватательного рефлекса на 5 ДЖ мы обнаружили, что мыши линии BTBR после перенесенной инъекции Poly I:C достоверно [Chi-квadrat: 5.626, $df = 1$, $p = 0.017$] хуже сформировали этот рефлекс по сравнению с контрольной группой BTBR-S. Кроме того, к 8 ДЖ проявились межлинейные различия: доля мышей линии BTBR-S, проявляющих хватательный рефлекс была достоверно ниже [Chi-квadrat: 4.454, $df = 1$, $p = 0.034$] относительно B6-S.

При анализе рефлекса отрицательного геотаксиса на 5 ДЖ мы обнаружили, что у мышей линии B6 после введения LPS был достоверно снижен процент животных, проявляющих данный рефлекс, по сравнению с группами B6 после введения Poly I:C, а также Poly I:C+LPS [Chi-квadrat: 3.650, $df = 1$, $p = 0.056$ (B6-L vs. B6-P); Chi-квadrat: 5.083, $df = 1$, $p = 0.024$ (B6-L vs. B6-L+P)], но не по сравнению с контролем. Введение провоспалительных

агентов оказало влияние и на формирование этого рефлекса у мышей линии ВТВР в этом возрасте: так, в группе ВТВР-Р был достоверно больший процент животных со сформированным рефлексом относительно контрольной группы [Хи-квадрат: 8.37277, $df = 1$, $p = 0.003$ (ВТВР-S vs. ВТВР-Р)]. Кроме того, на формирование этого рефлекса раньше всего оказала влияние линия животных: у мышей линии В6-S на 5 ДЖ рефлекс отрицательного геотаксиса был сформирован лучше, чем у мышей ВТВР-S [Хи-квадрат: 4.300, $df = 1$, $p = 0.038$], однако к 8 ДЖ различия между линиями нивелировались. К 8 ДЖ мы наблюдали только влияние введения препаратов на этот рефлекс: введение LPS приводило к достоверно меньшему проявлению рефлекса у мышей линии ВТВР по сравнению с контрольной группой, а также с группой после сочетанного введения LPS+Poly I:C [Хи-квадрат: 9.22786, $df = 1$, $p = 0.002$ (ВТВР-S vs. ВТВР-L); Хи-квадрат: 4.006, $df = 1$, $p = 0.045$ (ВТВР-L vs. ВТВР-L+P)].

На 5 ДЖ при оценке рефлекса избегания обрыва мы выявили влияние введения провоспалительных агентов только у мышей ВТВР: введение Poly I:C приводило к ускорению формирования этого рефлекса относительно контрольной группы и группы с сочетанным введением LPS+Poly I:C [Хи-квадрат: 6.466, $df = 1$, $p = 0.010$ (ВТВР-S vs. ВТВР-Р); Хи-квадрат: 3.717, $df = 1$, $p = 0.053$ (ВТВР-Р vs. ВТВР-L+P)]. Влияние препаратов было обнаружено и на 8 ДЖ: так, у мышей линии В6 после введения LPS рефлекс был сформирован у большего количества животных, чем в контрольной группе В6-S [Хи-квадрат: 3.937, $df = 1$, $p = 0.047$]. У мышей же ВТВР, наоборот, группа LPS демонстрировала более низкий уровень сформированности рефлекса, чем группа с введением Poly I:C [Хи-квадрат: 4.785, $df = 1$, $p = 0.028$]. Кроме того, на 8 ДЖ проявились и межлинейные различия: у мышей ВТВР-S этот рефлекс проявляло большее количество животных, чем в группе В6-S [Хи-квадрат: 6.817, $df = 1$, $p = 0.009$].

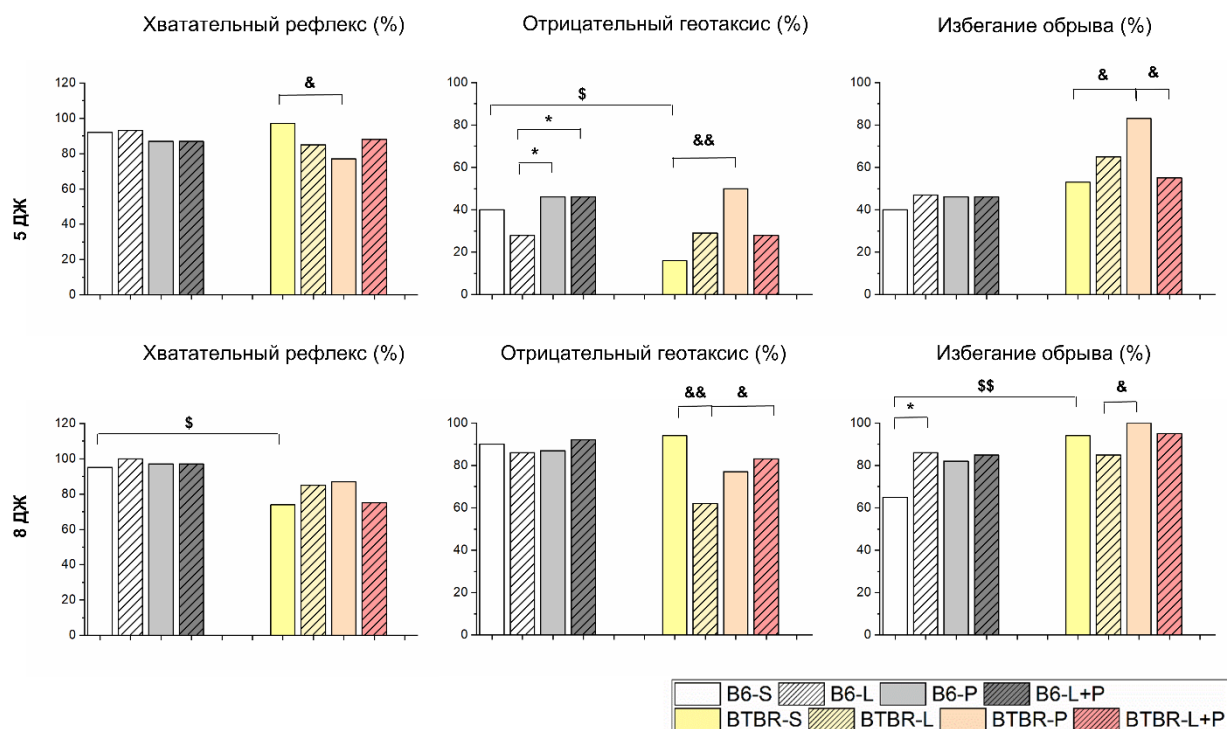


Рисунок 14. Хватательные рефлекс, отрицательный геотаксис и рефлекс избегания обрыва у мышей линий В6 и BTBR. Данные представлены как процент животных, проявляющих рефлекс. * -- между группами В6; & -- между группами BTBR; \$ -- В6-S vs. BTBR-S. * p < 0.05; & p < 0.05; && p < 0.01; \$ p < 0.05; \$\$ p < 0.01.

3.2.4 Влияние индукции воспаления в ранний постнатальный период на индивидуальное и социальное поведение самцов мышей линий В6 и BTBR в ювенильный период жизни

Для оценки поведения животных в ювенильный период на 23 ДЖ был проведен тест «Темная-светлая камера» (Рис. 15А). При оценке параметров теста мы обнаружили, что на показатель «Количество выходов в светлую зону» достоверно повлияли факторы «Линия» [$F(1,75) = 14.350$, $p < 0.001$] и «Группа x Линия» [$F(3,75) = 3.612$, $p = 0.017$]. Животные линии BTBR достоверно ($p < 0.001$) чаще совершали выходы в светлую часть отсека по сравнению с самцами В6. Кроме того, самцы мышей линии В6 после введения Poly I:C в ранний постнатальный период совершали больше выходов в светлый отсек по сравнению с группами В6 после введения только LPS или сочетанного введения LPS+Poly I:C (В6-P vs В6-L $p = 0.007$; В6-P vs. В6-L+P $p = 0.015$). При анализе параметра «Количество выглядываний в светлую зону» было обнаружено, что на этот показатель достоверно повлиял только фактор

«Линия» [$F(1,75) = 110.910, p < 0.001$]. Так, самцы линии ВТВР в этом возрастном периоде достоверно ($p < 0.001$) большее количество раз выглядывали в светлый отсек тестовой установки по сравнению с мышами линии В6. Ещё один параметр теста, на который оказали влияние исследуемые параметры – «Средняя продолжительность выхода в светлую зону». Мы обнаружили, что на него достоверно влияли факторы «Линия» [$F(1,75) = 32.600, p < 0.001$], «Группа» [$F(3,75) = 4.673, p = 0.004$], а также взаимодействие факторов «Линия x Группа» [$F(3,75) = 4.257, p = 0.008$]. Так, мыши линии ВТВР демонстрировали достоверно ($p < 0.001$) меньшую продолжительность каждого выхода в светлый отсек по сравнению с животными В6 независимо от наличия или отсутствия раннего постнатального воспаления. Также межгрупповое сравнение показало, что мыши линии В6 после инъекции Poly I:C вместе с LPS в ранний период демонстрировали достоверное повышение среднего времени нахождения в светлой части по сравнению с остальными группами введения (В6-L+P vs В6-S; В6-L+P vs. В6-L; В6-L+P vs. В6-P $p < 0.001$ для всех пар сравнения). Кроме того, в тесте мы провели оценку частоты подъемов на задние лапы. На этот параметр достоверно влияли факторы «Линия» [$F(1,75) = 9.088, p = 0.003$], «Группа» [$F(3,75) = 3.392, p = 0.022$], а также «Линия x Группа» [$F(3,75) = 3.260, p = 0.026$]. Самцы линии ВТВР в этом возрастном периоде достоверно ($p = 0.006$) меньшее количество раз поднимались на задние лапы во время нахождения в светлом отсеке тестовой установки по сравнению с мышами линии В6. Межгрупповой анализ выявил, что у мышей линии В6 после инъекции Poly I:C в ранний постнатальный период показывали достоверное увеличение частоты подъемов на задние лапы по сравнению с контрольной группой и группой после моновведения LPS (В6-P vs. В6-S, В6-P vs. В6-L $p < 0.001$ для обеих пар сравнения). Сочетанное введение препаратов LPS+Poly I:C животным этой линии тоже приводило к достоверному ($p = 0.015$) увеличению чистоты подъемов по сравнению с контрольной группой, но не столь выраженное. На

остальные рассмотренные параметры теста исследуемые факторы не оказали достоверного влияния ($p > 0.05$).

Для оценки аутизм-подобного поведения животных на 24 ДЖ был проведен тест «Социальное взаимодействие», в котором мы оценивали соотношение реакции животных в отсутствии и присутствии партнера («Социальный индекс») (Рис. 15Б). Однако, мы не обнаружили достоверного влияния на этот показатель ни фактора «Линия», ни фактора «Группа» в этом возрасте ($p > 0.05$ для всех факторов).

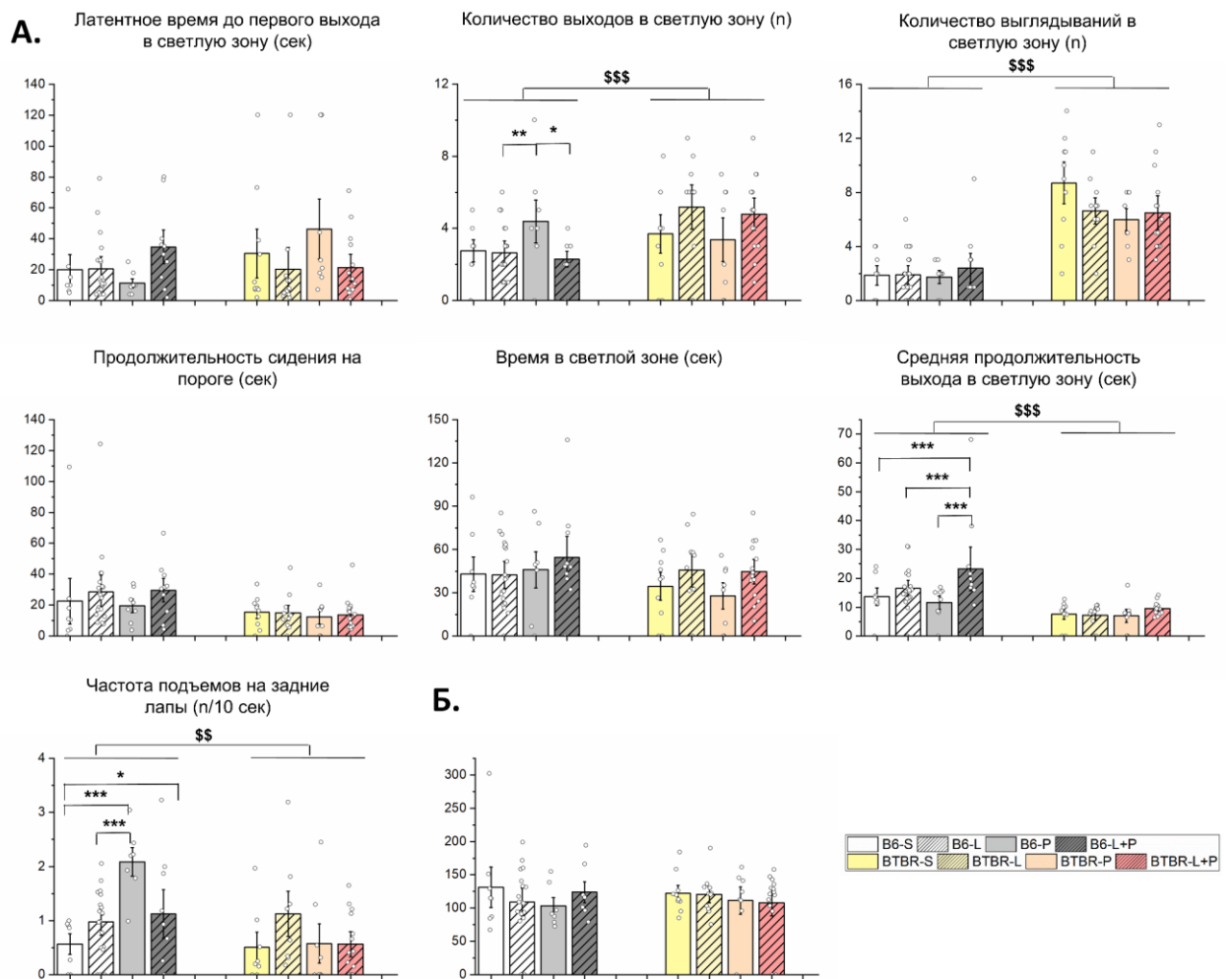


Рисунок 15. А. Поведение в тесте «Темная-светлая камера» животных линий В6 и BTBR на 23 день жизни. **Б.** Социальный индекс мышей линий В6 и BTBR на 24 день жизни в тесте «Социальное взаимодействие». Данные представлены как среднее значение ± SEM. * -- между группами В6; \$ -- BTBR vs. В6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2.5 Влияние индукции воспаления в ранний постнатальный период на индивидуальное и социальное поведение самцов мышей линий В6 и ВТВР в подростковый период жизни

Для оценки индивидуального поведения самцов обеих линий на 39 ДЖ был проведен тест «Темная-светлая камера» (Рис. 16А). При анализе параметра «Латентное время до первого выхода в светлую зону» мы установили, что на него достоверно повлияли факторы «Группа» [$F(3,75) = 3.392, p = 0.022$] и «Группа x Линия» [$F(3,75) = 3.392, p = 0.022$]. Мыши линии В6 после моноведения Poly I:C показывали достоверное увеличение времени до первого выхода в светлую зону по сравнению с остальными группами введения (В6-Р vs. В6-С $p=0.015$; В6-Р vs. В6-Л $p = 0.037$; В6-Р vs. В6-Л+Р $p = 0.008$). Аналогичное увеличение латентного времени относительно всех остальных групп наблюдалось и у мышей линии ВТВР, но уже после сочетанного введения LPS+Poly I:C (ВТВР-Л+Р vs. ВТВР-С $p = 0.005$; ВТВР-Л+Р vs. ВТВР-Л $p = 0.002$; ВТВР-Л+Р vs. ВТВР-Р $p = 0.033$). Кроме того, в этом возрасте стали преобладать межлинейные различия. Так, на «Количество выглядываний», «Время в светлой зоне», «Среднюю продолжительность выходов в светлую зону» и на «Частоту подъемов на задние лапы» достоверное влияние оказал только фактор «Линия» [количество выглядываний: $F(1,77) = 21.527, p < 0.001$; время в светлой зоне: $F(1,77) = 7.585, p = 0.007$; средняя продолжительность выходов в светлую зону: $F(1,77) = 26.604, p < 0.001$; частота подъема на задние лапы: $F(1,77) = 31.420, p < 0.001$]. Самцы мышей линии ВТВР достоверно ($p < 0.001$) больше выглядывали в светлый отсек по сравнению с самцами В6, независимо от группы введения препаратов. При этом по остальным трем параметрам теста мыши ВТВР, наоборот, показывали снижение показателей относительно В6: они меньше проводили времени в светлом отсеке, как общего ($p = 0.006$) и среднего времени ($p < 0.001$), также у них была снижена частота подъемов на задние лапы ($p < 0.001$). Данные межлинейные различия по большей части сохранились с 23 ДЖ, однако, к 39 ДЖ нивелировались эффекты введения

провоспалительных агентов на индивидуальное поведение животных, которые проявлялись в более ранний период их жизни.

При анализе теста «Социальное взаимодействие», мы, как и в ювенильный период жизни животных, не обнаружили достоверного влияния на «Социальный индекс» исследуемых факторов в этом возрасте ($p > 0.05$ для всех факторов) (Рис. 16Б).

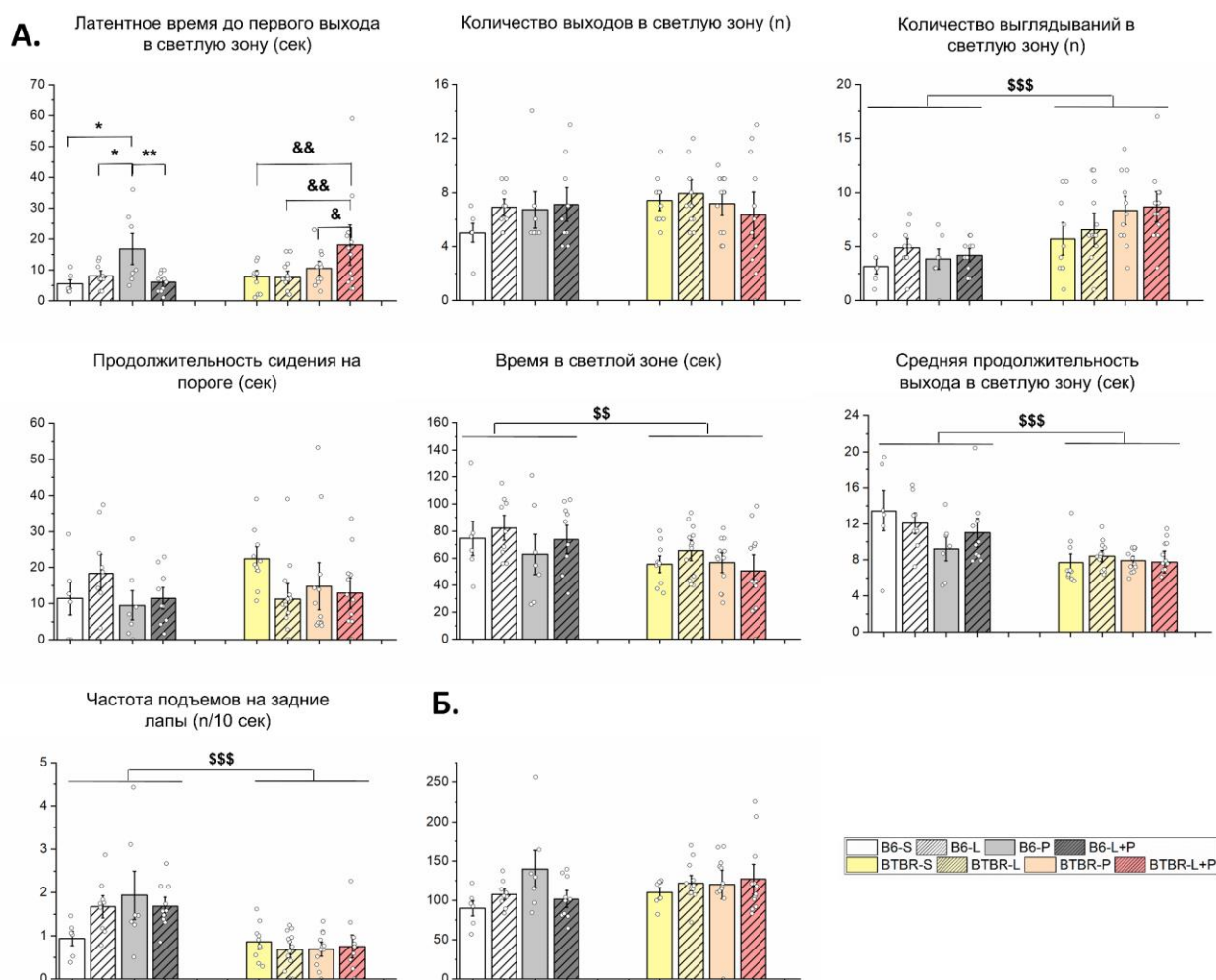


Рисунок 16. А. Поведение в тесте «Темная-светлая камера» животных линий В6 и BTBR на 39 день жизни. **Б.** Социальный индекс мышей линий В6 и BTBR на 40 день жизни в тесте «Социальное взаимодействие». Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- между группами В6; & -- между группами BTBR; \$ -- BTBR vs. В6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; & $p < 0.05$; && $p < 0.01$; \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2.6 Оценка стереотипии взрослых самцов мышей линий В6 и BTBR после индукции воспаления в ранний постнатальный период

Для оценки стереотипного поведения, которое является одним из фенотипических проявлений аутизм-подобного поведения у животных, мы

исследовали взрослых 55-дневных самцов мышей обеих линий в тесте «Закапывание шариков». При оценке параметра «Количество закопанных шариков» мы обнаружили, что достоверный эффект на данный тип поведения оказали факторы «Линия» [$F(1,77) = 11.467, p = 0.001$] и «Линия x Группа» [$F(3,78) = 3.685, p = 0.015$]. Так, мыши линии В6, неожиданно, закапывали достоверно ($p < 0.001$) большее количество шариков по сравнению с самцами линии BTBR. Однако, вероятно, данное межлинейное различие возникает из-за того, что введение LPS и Poly I:C как вместе, так и по отдельности приводило к выраженному усилению стереотипного поведения у мышей линии В6 (В6-S vs. В6-L $p = 0.005$; В6-S vs. В6-P $p = 0.045$; В6-S vs. В6-L+P $p = 0.044$), тогда как поведение мышей в группах с введением физиологического раствора не различалось между линиями. При этом у мышей линии BTBR введение препаратов не оказало эффекта на данный тип поведения.

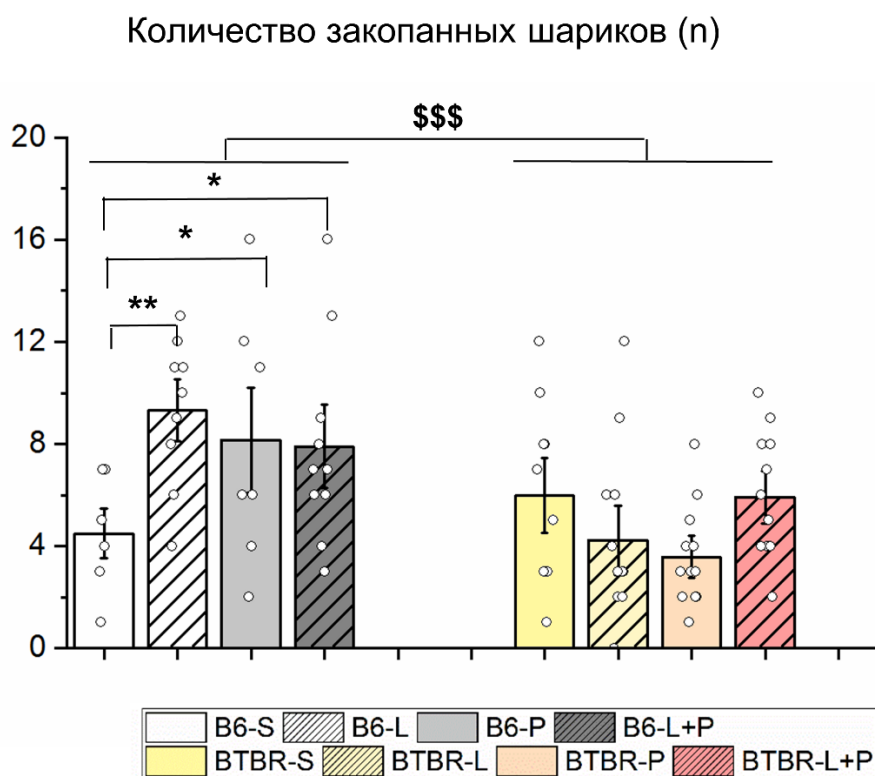


Рисунок 17. Общее количество закопанных более чем на 50% шариков в тесте «Закапывание шариков» животных линий В6 и BTBR на 55 день жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. * -- между группами В6; \$ -- BTBR vs. В6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$.

3.2.7 Оценка нейровоспаления в гиппокампе после раннего воспалительного стресса у молодых мышей В6 и BTBR

Оценку уровня экспрессии генов в гиппокампе проводили отдельно для вентрального и дорсального гиппокампа. При оценке экспрессии генов *Aif1* и *Gfap* в гиппокампе на 40 день жизни мы обнаружили эффекты только в дорсальном отделе этой структуры (Рис. 18). Так, был выявлено достоверное влияние фактора «Линия» на оба гена [*Aif1*: $F(1,71) = 6.802$, $p = 0.011$; *Gfap*: $F[1,71] = 22.504$, $p < 0.001$]. Мыши линии BTBR демонстрируют пониженный ($p = 0.001$) уровень экспрессии *Aif1* в дорсальном гиппокампе по сравнению с животными В6. При этом для экспрессии гена *Gfap* наблюдается противоположная картина: мыши BTBR, наоборот, показывают повышенный уровень ($p < 0.001$) активности астроглии в дорсальном гиппокампе. Влияние введения провоспалительных агентов на экспрессию этих генов не было выявлено у обеих линий.

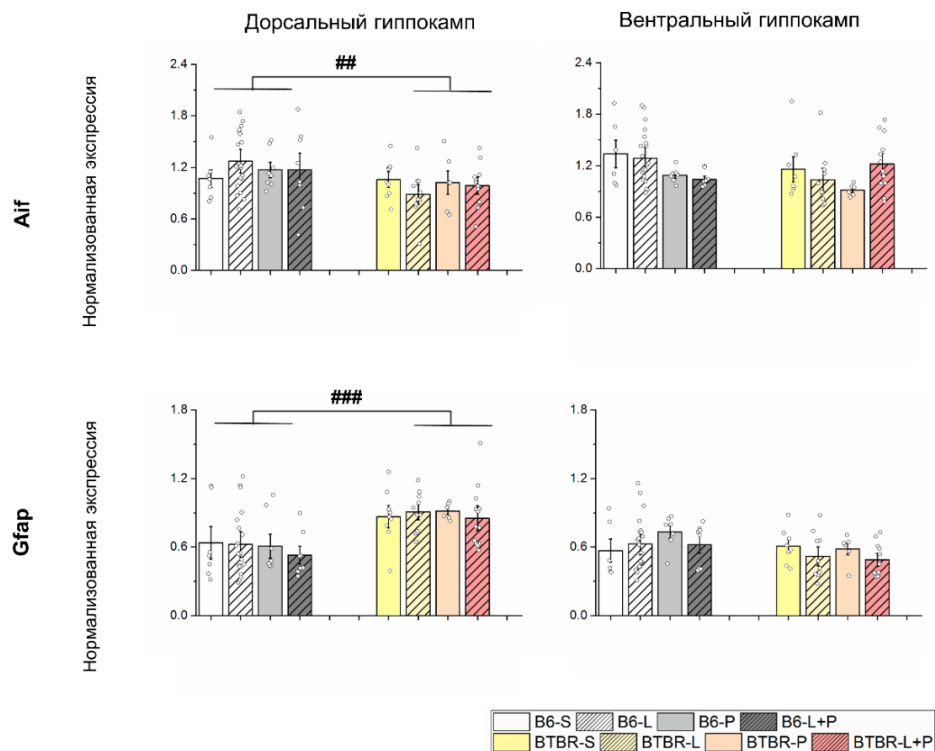


Рисунок 18. Уровень экспрессии генов в дорсальном и вентральном гиппокампе мышей линий В6 и BTBR на 40 день жизни. Данные представлены как среднее значение \pm SEM. # -- BTBR vs. В6. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

4. Обсуждение результатов

Для выполнения цели и задач диссертационного исследования было поставлено два эксперимента. Первый эксперимент позволяет оценить потенциальное влияние раннего постнатального стресса разделения с матерью на индивидуальное и социальное поведение в двух возрастных точках у мышей линии BTBR, а также линии C57Bl/6. Кроме того, в данном эксперименте мы провели оценку уровня экспрессии маркеров активности ГГНС и гена раннего ответа *c-Fos* у мышей без и с опытом разделения с матерью в норме и после предъявления острого стресса рестрикции в подростковом периоде. Поскольку в некоторых работах (Calcia et al., 2016; Adkins et al., 2023) наблюдается связь между стрессовыми событиями и нейровоспалением, мы также оценили уровень экспрессии генов, связанных с активацией астроглии и микроглии в мозге у всех групп исследуемых животных как на базальном уровне, так и после рестрикции. Данные гены были выбраны в качестве маркеров нейровоспаления у мышей, так как в последние годы всё больше данных указывают на вовлеченность иммунного ответа в патогенез РАС.

Второй эксперимент был проведен для оценки влияния индукции воспаления в ранний постнатальный период на индивидуальное и социальное поведение животных в двух возрастных точках (ювенильный и подростковый периоды), а также на стереотипное поведение во взрослом возрасте. Для исследования влияния введения провоспалительных агентов на развитие мышей был проведен анализ сформированности неонатальных рефлексов после их введения в ранний постнатальный период. Кроме того, для поиска вовлеченных механизмов в ожидаемые потенциально изменения в поведении животных в рамках второго эксперимента была проведена оценка периферического воспаления в трех возрастных точках, а также нейровоспаления в подростковом периоде.

Эксперимент 1

В нашем исследовании мы обнаружили, что хоть мыши линии ВТВР начинают проявлять аутизм-подобный фенотип уже с ювенильного периода развития, нарастание социального дефицита, по-видимому, усиливается с возрастом. При этом опыт раннего постнатального стресса разделения с матерью не приводит к усилению этого типа поведения у мышей данной линии или мышей линии В6. Кроме того, мы обнаружили, что мыши линии ВТВР демонстрируют повышенную двигательную активность в ювенильном периоде (пройденный путь в тесте «Открытое поле»), повышенную тревожность и усиленное поведение, связанное с оценкой рисков (латентное время и количество выглядываний в тесте «Темная-светлая камера») в подростковом периоде в поведенческих тестах. При этом опыт разделения с матерью приводит к снижению тревожности и поведения оценки рисков в тесте «Темная-светлая камера» у мышей обеих линий в подростковом периоде: снижается общее и среднее время в светлой зоне, продолжительность сидения на пороге у В6, латентное время до первого выхода и количество выглядываний в светлую зону у ВТВР. При анализе ГГНС мы не обнаружили на базальном уровне различий в уровне кортикостерона и экспрессии генов стероидогенеза в надпочечниках у мышей обеих линий как с, так и без опыта раннего постнатального стресса. Однако, при добавлении дополнительного острого стресса рестрикции в подростковый период мыши линии ВТВР демонстрировали повышенную стресс-реактивность: у них был найден более выраженный подъем уровня кортикостерона в плазме, увеличение уровня экспрессии некоторых генов стероидогенеза, а также уровня экспрессии гена *c-Fos* в гипоталамусе, дорсальном и вентральном гиппокампе и надпочечниках по сравнению с В6. При этом опыт разделения с матерью по-разному модулировал стресс-реактивность животных разных линий: снижая у В6 и увеличивая у ВТВР.

Снижение социального поведения считается одним из ключевых маркеров РАС как у людей, так и в существующих животных моделях заболевания (Семенова и др., 2019; Wang et al., 2023). Сниженное социальное поведение мышей BTBR, наблюдаемое в нашей работе, согласуется с данными, полученными в других исследованиях на животных этой линии (Yang et al., 2007; Scattoni et al., 2013; Chao et al., 2018; Winiarski et al., 2022). Однако, в нашем эксперименте было оценено поведение мышей в подростковом периоде, в то время как подавляющее большинство работ исследует сосредоточены на взрослом возрасте. Полученные нами данные дополняют существующие немногочисленные и противоречивые данные по раннему периоду жизни мышей линии BTBR (Babineau et al., 2013; Endo et al., 2019). При этом в нашем исследовании было выявлено, что наблюдаемый аутизм-подобный фенотип мышей BTBR начинает проявляться только с подросткового периода их жизни, но не в более ранние этапы развития.

Преыдушие исследования показали, что стресс в раннем возрасте может предрасполагать людей к развитию психологических расстройств, таким как депрессия, тревожное расстройство (Targum, Nemeroff, 2019), а также РАС (Singletary, 2016). При исследованиях на грызунах так же было показано, что ранний стресс может приводить к нарушениям социального поведения в подростковом и взрослом возрасте (Tsuda, Ogawa, 2012; Lundberg et al., 2017; Kambali et al., 2019; Shin et al., 2023). О способности стрессовых событий в ранней жизни усиливать аутизм-подобный фенотип во взрослом возрасте сообщалось и для некоторых животных моделей этого заболевания (Lee, Han, 2019). В нашей работе, воздействие на животных стрессом разделения с матерью в ранний период не приводило к усилению аутизм-подобного фенотипа ни у одной из исследованных линий в ювенильном или подростковом периодах жизни. Возможно, это связано с ранним возрастом тестирования социального поведения мышей данной линии: аутизм-подобный поведенческий фенотип только начинает проявляться в подростковом

периоде, а ранний постнатальный стресс разделения с матерью окажет свои негативные эффекты позднее. Стоит отметить, что наблюдаемый в исследованиях на ВТВР социальный дефицит отмечался, как правило, уже во взрослом периоде жизни (Moy et al., 2007; Yang et al., 2007; McFarlane et al., 2008; Robbe et al., 2010). Кроме того, на мышинной модели РАС с нокаутом *Fmr1* (моделирование синдрома ломкой X хромосомы) было показано, что аутизм-подобный фенотип в подростковый период в тесте социального взаимодействия не проявляется из-за раннего возраста животных, и ранний стресс не способен ускорить его возникновение (Petroni et al., 2022).

В некоторых исследованиях было показано, что у мышей линии ВТВР повышена двигательная активность во взрослом и пожилом возрасте по сравнению с нормальной по социальному поведению линией мышей В6 (Moy et al., 2007; Faraji et al., 2018; O'Connor et al., 2021). Мы так же обнаружили повышенную двигательную активность у животных этой линии, которая проявилась уже в ювенильном периоде, что дополняет описание их поведенческого фенотипа. Однако гиперактивность у ювенильных мышей ВТВР в тесте «Открытое поле» может маскировать различия в тревожном поведении. Известно, что повышенная двигательная активность присутствует в животных моделях РАС с мозжечковой дисфункцией (Fatemi et al., 2012), а также у мышей с делецией *proSAP1/Shank2*, которые также демонстрируют аутизм-подобное поведение (Schmeisser et al., 2012). Возможно, наблюдаемые изменения в двигательной активности у мышей ВТВР тоже могут быть связаны с мозжечковыми нарушениями, которые были отмечены у данной линии (Xiao et al., 2020). Кроме того, имеются предположения, что яркое освещение данного теста может вызывать гиперактивность животных с аутизм-подобным фенотипом (Jung et al., 2018). Помимо этого, мы выявили необычные отставленные эффекты раннего стресса разделения с матерью на поведение мышей в тесте «Открытое поле»: так, опыт разделения с матерью увеличивал двигательную активность на периферии у линии ВТВР, но не у В6.

Наши данные не согласуются с наблюдениями, полученными на взрослых животных с нормальным и нарушенным социальным фенотипом, где было показано, что разделение с матерью не оказывает долгосрочных последствий на поведение взрослых мышей в этом тесте (Endo et al., 2021). Кроме того, и системный мета-анализ, проведенный относительно недавно, также не выявил влияния опыта раннего постнатального стресса разделения с матерью на двигательную активность взрослых грызунов в тесте «Открытое поле» (Wang et al., 2020). Однако имеются и единичные работы, демонстрирующие, что ранний постнатальный стресс может увеличивать двигательную активность мышей в данном тесте (Tan et al., 2017). Исследования на ювенильных животных преимущественно проводились на крысах, где, как и в нашей работе, опыт разделения с матерью приводил к увеличению двигательной активности в этом периоде жизни (Sanders, Anticevic, 2007; Wang et al., 2015). Однако, и в исследованиях на крысах наблюдаются противоречивые результаты: так, в наиболее свежей работе, наоборот, опыт разделения с матерью приводил к снижению двигательной активности у ювенильных животных (Jin et al., 2018). Полученные нами результаты могут быть частично объяснены разницей протоколов стрессового воздействия и возрастом исследуемых животных. Кроме того, поскольку ранний постнатальный стресс оказал влияние только на двигательную активность мышей линии BTBR на периферии, то можно предположить, что наблюдаемое поведение является проявлением стереотипии данных животных, а не истинным увеличением двигательной активности. И хотя подобные нарушения (кружение в клетке) уже отмечались на существующих моделях аутизма на мышах и трактовались именно как проявление стереотипного поведения (Lewis et al., 2007), в нашей работе мы не можем сделать однозначного вывода из полученных данных, поскольку исследовались мыши в ювенильном периоде, а, кроме того, наши данные не были подтверждены узконаправленными тестами.

Поскольку мыши BTBR являются моделью идиопатического аутизма, мы оценивали тревожность, так как она часто сопровождает развитие этого заболевания (Simonoff et al., 2008; Van Steensel et al., 2011). При оценке поведения в тесте «Темная-светлая камера» мы обнаружили, что мыши линии BTBR демонстрируют повышенную тревожность и увеличение поведения, связанного с оценкой рисков в подростковый период. Большинство исследований животных данной линии так же сообщали об аналогичных поведенческих паттернах при сравнении с линией B6 как во взрослом периоде жизни, так и уже в 5-недельном возрасте (Pobbe et al., 2011; Burke, 2019; Sharghi et al., 2023; Zhang et al., 2023). Однако опыт разделения с матерью ослаблял тревожность у мышей, причем у обеих линий. Как правило, исследователи сообщают о увеличении тревожности у крыс, подвергнутых опыту стресса в раннем периоде жизни (Wang et al., 2020). Для мышей же характерна большая вариативность эффектов опыта разделения с матерью на тревожное поведение. Как и в исследованиях на крысах, было показано увеличение тревожности в данном тесте после стресса в ранний период жизни, причем как у взрослых животных, так и у подростков (Kim et al., 2023; Shin, Lee, 2023). При этом анализ большой выборки работ показал, что перенесенный стресс разлуки с матерью показывает крайне противоречивые результаты на мышах (Tractenberg et al., 2016; Tan et al., 2017; Wang et al., 2020) и, в большинстве случаев, не изменяет поведение животных, имеющих как нормальный поведенческий фенотип, так и нарушенный, в том числе и у линии BTBR (Millstein, Holmes, 2007; Burke, 2019).

К сожалению, большинство работ по оценке вклада раннего постнатального стресса сосредоточено на анализе отставленного во времени поведения взрослых животных; а количество исследований, затрагивающих подростковый период ограничено (Tractenberg et al., 2016; Bondar et al., 2018; Reshetnikov et al., 2018; Wang et al., 2020). Известно, что грызуны-подростки менее тревожны, чем молодые или взрослые животные, и более склонны к

рisku, импульсивному поведению и поиску новизны (Macri et al., 2002; Arrant et al., 2013). Так что полученные в нашей работе данные дополняют имеющиеся существующие исследования поведения мышей в раннем возрасте после опыта разделения с матерью и показывают, что его влияние на тревожность, скорее всего, зависит от вида животных, линии и возраста.

Для оценки с чем могут быть связаны наблюдаемые поведенческие изменения у мышей в нашем эксперименте мы провели комплексную оценку состояния ГНС у мышей в подростковом периоде в норме, а также после воздействия дополнительным стрессом рестрикции. Полученные данные позволили нам понять как опыт раннего разделения с матерью влияет не только на базальную активность этой системы, но и на ее стресс-реактивность.

В нашем исследовании мы обнаружили, что ранний постнатальный стресс не вызывает выраженного изменения активности ГНС на базальном уровне ни у мышей В6, ни у мышей ВТBR после опыта стресса разделения с матерью в раннем периоде жизни. Ограничение подвижности в течение 60 мин приводило к более сильному росту уровня кортикостерона и увеличению экспрессии мРНК гена *c-Fos* и некоторых генов стероидогенеза у мышей ВТBR, чем у мышей В6, что указывает на повышенную стресс-реактивность линии ВТBR. Неожиданно влияние стресса разделения с матерью имело противоположные направления между двумя линиями мышей после острой рестрикции. А именно, у мышей В6 с ранним постнатальным стрессом наблюдалось менее выраженное повышение кортикостерона и уровня мРНК *Crh* по сравнению с контрольными мышами В6. При этом мыши ВТBR с историей раннего постнатального стресса демонстрировали более сильную активацию экспрессии гена *c-Fos* в гипоталамусе, фронтальной коре и надпочечниках по сравнению с контрольными мышами ВТBR. В целом эти данные свидетельствуют о том, что ранний постнатальный стресс может по-разному влиять на животных разных линий, снижая стресс-реактивность у мышей В6 и увеличивая ее у мышей ВТBR.

Литературные данные о влиянии раннего постнатального стресса на последующую стресс-реактивность в подростковом и взрослом возрасте противоречивы. Большинство исследований на крысах и мышах показывают повышение стрессоустойчивости (Kember et al., 2012; Wang et al., 2012; Sachs et al., 2013; Liu et al., 2016; McIlwrick et al., 2016; Biggio et al., 2018; Dandi et al., 2018; Bonapersona et al., 2019). Другие исследовательские статьи указывают на снижение стресс-реактивности у грызунов, перенесших ранний постнатальный стресс (Hsiao et al. 2016; Fuentes et al. 2017; Odeon et al., 2017; Marrocco et al., 2019). Различия, о которых сообщается в литературе, могут быть частично объяснены типом раннего постнатального стресса, его продолжительностью и возрастом во время анализа ГГНС (Rice et al. 2008; Korosi et al., 2010; van Bodegom et al., 2017). Активация оси ГГНС ограничена отрицательной обратной связью, реализуемой через глюкокортикоидные рецепторы (de Kloet, Herman 2018). Изменения в стресс-реактивности могут быть обусловлены нарушением регуляции экспрессии глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе и префронтальной коре животных после опыта стресса в раннем возрасте. Данные, полученные на грызунах, свидетельствуют о том, что длительное разлучение с матерью в этом периоде приводит к снижению экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и лобной коре, а также к изменению их соотношения (Ladd et al., 2004; Navailles et al., 2010, Reshetnikov, 2018). При исследованиях на людях также было показано, что опыт перенесенного стресса в раннем периоде жизни может по-разному влиять на ГГНС (van Bodegom et al., 2017; Huang et al., 2021; Juruena et al., 2021).

Наблюдаемая в нашей работе повышенная стресс-реактивность мышей ВТBR, хорошо согласуется с другими исследованиями, которые показывают снижение исследовательской активности и социального поведения этой линии (Mezza et al. 2013; Scattoni et al., 2013; Reshetnikov et al., 2021a), поскольку эти поведенческие параметры связаны со способностью животных адекватно

реагировать на стресс. Однако, данные об уровне тревожности у мышей BTBR противоречивы: некоторые исследования показывают увеличение тревожности, в то время как другие предполагают, что по этому показателю они не отличаются от мышей с нормальным поведенческим фенотипом C57Bl/6 (Meuza et al., 2013). Обнаруженные в нашем исследовании поведенческие особенности и повышенная стресс-реактивность мышей BTBR, могут быть обусловлены нейроанатомическими особенностями, а также молекулярными и иммунными аномалиями у мышей BTBR (Mutovina et al., 2022; Kisaretova et al., 2023). Так, известно, что у мышей этой линии нет мозолистого тела (Meuza et al. 2013), вес мозга у них в целом меньше, дорсальная спайка гиппокампа редуцирована, а объем гиппокампа снижен (Dodero et al. 2013; Faraji et al., 2018). Кроме того, было показано, что у этой линии снижен объем коры, а также уменьшена ее толщина, особенно в префронтальной части (Faraji et al. 2018; Reshetnikov et al. 2021a). При этом префронтальная кора является ключевым отделом головного мозга, участвующим в ингибировании стрессовых реакций ГГНС (Herman et al., 2020). Таким образом, мы предполагаем, что одной из возможных причин повышения стресс-реактивности мышей BTBR является нарушение регуляции системы префронтальная кора-гиппокамп-ГГНС.

Несмотря на то, что в данном исследовании мы не обнаружили способности раннего постнатального стресса изменять аутизм-подобный фенотип мышей BTBR, возможно, что выявленные особенности активности ГГНС этих животных могут вносить вклад в их нарушенный поведенческий фенотип. Изменения функционирования ГГНС наблюдаются при различных психических расстройствах, например, у пациентов с расстройствами аутистического спектра (Muscatello et al., 2021). В раннем возрасте у таких больных отмечается нетипичная реакция на стресс (Corbett et al., 2019), повышенная тревожность, а также склонность к депрессии (Simonoff et al., 2008; van Steensel et al., 2011). Многие исследователи связывают это с

повышенной стресс-реактивностью ГГНС у таких пациентов: они показывают более высокую концентрацию кортизола в плазме и слюне как в начале исследования (Taylor, Corbett 2014), так и после воздействия различных стрессоров по сравнению с нейротипичными сверстниками (Spratt et al., 2012). Тем не менее, данные о нарушении базального функционирования ГГНС у людей с РАС противоречивы (Albantakis et al., 2021; Bakker-Huvenaars et al., 2018) и, кроме того, неясно, может ли стресс в раннем периоде ухудшить наблюдаемые изменения (Makris et al., 2022).

При оценке нейровоспалительных процессов мы не выявили изменений на базальном уровне между линиями мышей. Однако, воздействие острым стрессом рестрикции оказывало регион-специфичные изменения: микроглия активировалась во фронтальной коре животных обеих линий, но ингибировалась в вентральном гиппокампе. Причем обнаруженный подъем во фронтальной коре мРНК гена *Aif1* у ВТВР был ниже, чем у мышей с нормальным поведенческим фенотипом. При этом опыт раннего постнатального стресса по-разному модулировал активность микроглии у ВТВР в ответ на 60 минут рестрикции: снижая во фронтальной коре и повышая в вентральном гиппокампе. Регион-специфичные изменения в экспрессии исследуемых генов могут объясняться различиями в функциях этих областей головного мозга: дорсальный гиппокамп специфически участвует в процессах памяти, а вентральный модулирует эмоциональные и аффективные процессы (Fanselow, Dong, 2010), как и префронтальная кора (Krishnamurthy et al., 2020). В целом эти данные свидетельствуют о том, что ранний стресс может разнонаправленно изменять активность микроглии в разных регионах мозга у мышей ВТВР, но не у В6 в ответ на острый стресс. Возможно, обнаруженные отличия могут вносить вклад в наблюдаемые поведенческие изменения, как уже было показано для периферического воспаления (Onore et al., 2013).

Исследования нейровоспаления у мышей линии BTBR всё ещё ограничены, что осложняет интерпретацию наших данных. Немногочисленные исследования указывают на повышенный уровень воспаления в центральной нервной системе у данных животных во взрослом периоде жизни (Ahmad et al., 2018; Zhang et al., 2019; Alomar et al., 2023; Jiang et al., 2023). В нашей недавней работе было показано, что уровень активной микроглии во фронтальной коре у мышей линии BTBR ниже, чем у контрольной линии мышей (Mutovina et al., 2023). Однако, данная работа была посвящена взрослым половозрелым особям. Возможно, профиль нейровоспаления линии BTBR изменяется с возрастом животных; поскольку и поведенческие дефициты у данной линии достигают наибольшей выраженности именно во взрослый период жизни. Аналогичные исследования, выполненные на других животных моделях PАС, показывают, что нейровоспаление зависит от конкретной генетической модификации линии, возраста животных и области мозга (Varghese et al., 2017).

В нашем исследовании опыт раннего разделения с матерью не оказал влияние на базальный уровень активности микроглии, что согласуется с единственным доступным в литературе исследованием, сконцентрированным на долгосрочных изменениях в этом параметре после перенесенного стресса (Ganguly et al., 2018). Другие работы, посвященные изучению стресса разделения с матерью на микроглиальную активацию, были посвящены острым эффектам и проводились всего 3 дня после завершения воздействия. При этом в таких исследованиях было отмечена значительная глиальная активация в головном мозге (Roque et al., 2016; Saavedra et al., 2017; Baldy et al., 2018). Эффекты же раннего постнатального стресса в нашем исследовании проявлялись только у мышей BTBR на фоне воздействия рестрикцией. В единственной работе, где оценивалось способность разделения с матерью модулировать ответ микроглии на дополнительный стресс было показано

увеличение ее активности в гиппокампе (Han et al., 2019), что согласуется с нашими данными.

Исследования на людях тоже подтверждают, что активация глиальных клеток может способствовать когнитивным и поведенческим нарушениям при РАС. У больных отмечается повышенный уровень нейровоспаления, в том числе повышенный уровень активированной микроглии (Onore et al., 2012; Hsiao, 2013; Rossignol, Frye, 2014, Liao et al., 2020). В патологических условиях развивающийся мозг очень чувствителен к раздражителям окружающей среды и вызывает сильную воспалительную реакцию, которая приводит к нейровоспалению, при котором микроглия реагирует (происходит глиоз), пролиферирует и рекрутирует лейкоциты периферической крови, тем самым усиливая начальное повреждение тканей. Такой реактивный глиоз может усугубить воспалительное состояние, вызванное иммунной активацией, участвующей в патогенезе РАС (Petrelli et al., 2016).

Таким образом, наше исследование позволило нам изучить влияние раннего постнатального стресса разделения с матерью на выраженность аутизм-подобного фенотипа мышей ВТВР, а также на некоторые другие поведенческие аспекты. Кроме того, мы провели комплексную оценку состояния ГГНС и воспаления в центральной нервной системе на базальном уровне и после острого стресса в норме и после перенесенного раннего разделения с матерью у мышей C57Bl/6 и ВТВР. Обнаруженные уникальные особенности мышей ВТВР улучшили наше понимание поведенческих и молекулярных аномалий этой линии в норме, а также способность раннего постнатального стресса влиять на них.

Эксперимент 2

В нашем исследовании мы обнаружили, что мыши линии ВТВР не демонстрируют нарушенный социальный фенотип в раннем периоде жизни. Кроме того, опыт раннего постнатального воспаления не способен

индуцировать изменения в данном типе поведения у животных обеих линий. При оценке стереотипии у взрослых животных мы также не обнаружили значительных межлинейных различий на базальном уровне, однако индукция воспаления в раннем периоде жизни приводила к усилению стереотипии у мышей линии B6, но не у BTBR. Анализ поведения в тесте «Темная-светлая камера» выявил, что мыши линии BTBR демонстрируют повышенную тревожность и увеличение поведения, связанного с оценкой рисков по сравнению с нормальными по фенотипу животными B6 как в ювенильном, так и в подростковом периодах. При этом введение вирусного миметика или комбинации вирусного и бактериального приводило к снижению тревожности у мышей обеих линий в исследованных возрастных точках и увеличению исследовательской активности у животных B6 в ювенильном периоде. Для оценки быстрых эффектов воспалительных агентов на развитие животных обеих линий мы провели оценку формирования неонатальных рефлексов. Было выявлено, что вирусный миметик ускоряет развитие мышей BTBR. Кроме того, мы отметили, что в норме мыши линии B6 демонстрируют более быстрые темпы развития, чем BTBR. Оценка периферического воспаления показала, что введение LPS изменяет параметры крови мышей B6 в ювенильном периоде. У мышей же линии BTBR наблюдались лишь незначительные изменения в этой временной точке после введения вирусного миметика. Кроме того, стоит отметить, что наблюдаемые изменения пропадали у животных обеих линий уже к 40 дню жизни, и оставались только межлинейные различия. На уровне воспаления в центральной нервной системе мы не обнаружили изменений под действием воспалительных агентов, однако выявили межлинейные различия в дорсальном гиппокампе: мыши линии BTBR демонстрировали пониженную активность микроглии и повышенную астроглиальную активацию в этом отделе мозга по сравнению с B6.

Несмотря на то, что в других исследованиях снижение социального поведения считается надежным маркером животных моделей PAC (Wang et

al., 2023), включая мышей BTRB (Yang et al., 2007; Scattoni et al., 2013; Chao et al., 2018; Winiarski et al., 2022), в нашей работе мы не выявили нарушений в данном типе поведения. Животные BTRB не демонстрировали снижения социальности ни в ювенильном, ни в подростковом периодах. Кроме того, эти данные не согласуются с нашими данными, полученными в эксперименте 1. Возможно, что подростковый период является ключевым периодом формирования поведенческих нарушений, поэтому фенотипические проявления могут быть не явно выражены, даже у животных одной линии. Помимо этого, стоит отметить, что подавляющее большинство работ оценивали социальную активность у взрослых мышей линии BTRB (Moy et al., 2007; Yang et al., 2007; McFarlane et al., 2008; Pobbe et al., 2010), а не у молодых животных. Полученные в нашей работе данные согласуются с немногочисленными исследованиями мышинных моделей PAC в раннем периоде жизни, в которых тоже не отмечалось проявление нарушенного социального фенотипа в этом периоде (Ferreira et al., 2022; Petroni et al., 2022), а оценка ультразвуковых вокализаций рекомендовалась как более надежный маркер предрасположенности к PAC-подобному поведению (Caruso et al., 2020). Кроме того, в нашем эксперименте мы не обнаружили способность раннего воспаления приводить к нарушениям в социальности мышей обеих линий. Считается, что воспаление может нарушать нормальное развитие нервной системы, формирование синаптических связей и, в конечном счете, поведение (Vargas et al., 2005; Khantakova et al., 2022). Исследования на моделях грызунов подтверждают, что воспалительные процессы в эмбриональном и неонатальном периоде могут приводить к развитию поведенческих расстройств в более позднем возрасте (Meyer et al., 2009; Liang et al., 2019; Cao et al., 2021; Khantakova et al., 2022a). Однако, можно предположить, что подростковый период у мышей является слишком ранним возрастом для проявления социального дефицита, а воспалительный стресс является недостаточным воздействием для его индукции.

Известно, что повышенная стереотипия является вторым РАС-подобным признаком мышей линии BTBR (Silverman et al., 2010; Amodeo et al., 2012; Onore et al., 2013; Schwartzer et al., 2013), а также наблюдается и на других животных моделях аутизма (Angoa-Pérez et al., 2013). При этом в нашей работе мы не обнаружили никаких различий в данном типе поведения между контрольными группами BTBR и B6. Поскольку количество работ, оценивающих стереотипию в тесте «Закапывание шариков» у мышей линии BTBR ограничено, мы можем предположить, что данный поведенческий аспект не всегда воспроизводится, а его оценка требует дополнительных узкоспециализированных тестов. Кроме того, мы обнаружили, что ранняя индукция воспаления приводит к увеличению стереотипного поведения у мышей B6 независимо от использованного агента, но не у мышей линии BTBR. Полученные данные на нормальных по фенотипу мышах согласуются с многочисленными работами, которые демонстрируют, что опыт воспаления приводит к усилению стереотипии у грызунов (Hsiao et al., 2012; Malkova et al., 2012; Hsiao et al., 2013; Schwartzer et al., 2013; Choi et al., 2016).

Поскольку тревожное расстройство, как правило, сопровождает РАС у людей (Ng-Cordell et al., 2022), мы решили оценить данный тип поведения у мышей линии BTBR в норме и после индукции раннего постнатального воспаления. Как и в нашем первом эксперименте, было обнаружено, что животные этой линии демонстрируют повышенную тревожность, а также увеличенное время оценки рисков по сравнению с мышами B6, причем не только в подростковом периоде жизни, но и в ювенильном. Эти результаты полностью согласуются с наблюдениями, полученными другими группами исследователей (Pobbe et al., 2011; Burke, 2019; Sharghi et al., 2023; Zhang et al., 2023). При этом введение воспалительных агентов приводил к снижению тревожности у мышей обеих линий. И хотя имеются клинические данные о том, что воспаление может вносить вклад в развитие тревожного расстройства у человека (Michopoulos et al., 2017), подобные данные всё ещё ограничены.

Полученные же на животных моделях данные показывают разнонаправленное влияние воспаления на этот тип поведения. Несмотря на то, что большинство работ указывают на то, что индукция иммунного ответа приводит к усилению тревожности у мышей в общепринятых тестах (de Paiva et al., 2010; Norden et al., 2016; Chen et al., 2022), отдельные исследования демонстрируют снижение как тревожности, так и депрессивно-подобного поведения после введения провоспалительных агентов (Lu et al., 2021; Li et al., 2022; Shi et al., 2022). Одним из предполагаемых механизмов может быть способность дополнительного воспаления индуцировать эффект толерантности при изначально чрезмерно активированной врожденной иммунной системе (Gu et al., 2021), которая может вносить вклад в развитие тревожности (Michopoulos et al., 2017). Данное объяснение может быть весьма применимым, особенно для животных линии BTBR, у которых, как сообщается, во взрослом возрасте наблюдается повышенное воспаление в центральной нервной системе (Careaga et al., 2015), а кроме того, которые в норме показывают тревожный поведенческий фенотип в нашем исследовании. Для мышей линии B6 мы можем предположить, что наблюдаемые изменения в параметрах теста на фоне перенесенного воспаления в раннем периоде, скорее, являются негативными эффектами, поскольку сопряжены со снижением оценки риска. Подобное поведение характеризуется импульсивной (иногда безрассудной) реакцией без адекватного суждения о возможных последствиях или сбора информации об условиях окружающей среды (Romer et al., 2017; McKewen et al., 2019).

Для оценки быстрых эффектов индукции воспаления в ранний период мы проводили исследование неонатальных рефлексов. В нашем исследовании, мы выявили, что мыши линии BTBR отстают в формировании отрицательного геотаксиса и хватательного рефлекса. При этом ответ на дополнительный воспалительный стресс разнонаправленно зависел от агента, а также был линия-специфичным: введение LPS тормозило развитие отрицательного

геотаксиса и избегания обрыва у B6, а Poly I:C ускорило развитие этих же рефлексов у BTR. Как правило, в работах других авторов сообщается о задержке формирования неонатальных рефлексов у грызунов после перенесенного воспаления (Wong et al., 2014; Nguyen et al., 2016; Yeh et al., 2021), что согласуется с полученными данными на контрольной линии мышей B6 в этом эксперименте. Наблюдаемое в нашем эксперименте ускорение формирования рефлексов под действием Poly I:C не фиксировалось ранее в исследованиях. При этом на развитие хватательного рефлекса введение провоспалительных агентов не оказывало выраженного эффекта. Известно, что в его формировании и угасании участвуют разные области коры (Schott, Rossor, 2003). Можно предположить, что необходимые для развития данного рефлекса структуры либо не затронуты воспалением вовсе, либо есть какие-то компенсаторные механизмы, например, изменения в микроглиальной активации, как было показано у некоторых исследователей (VanRyzin et al., 2016). В развитии нейрональных путей, вовлеченных в рефлекс отрицательного геотаксиса, тоже участвует микроглия, причем различные постнатальные вмешательства могут только замедлить его формирование (VanRyzin et al., 2016). Способность Poly I:C ускорять неонатальное развитие мышей BTR может заключаться в предполагаемом свойстве индуцированного воспаления ослаблять врожденное aberrантное функционирование иммунной системы, за счет чего ослаблять поведенческие нарушения (Gu et al., 2021), если предположить, что отставание мышей этой линии в норме было вызвано наблюдаемым у них нейровоспалением (Careaga et al., 2015).

Для понимания того, может ли воспаление вносить вклад в наблюдаемый измененный фенотип двух линий, мы провели анализ периферического и центрального иммунного состояния мышей. Общий анализ крови, проведенный в трех возрастных точках, выявил преимущественно межлинейные различия, которые проявились с подросткового периода жизни.

В базе данных мышиноного фенома (<https://phenome.jax.org/>) представлены результаты общего анализа крови в разных экспериментах. Используя одни и те же линии мышей в примерно одном возрасте, и даже производя забор крови одним способом, данные этого анализа сильно различаются у разных научных групп. В указанной базе есть несколько исследований, затрагивающих исследование мышей линий B6 и BTBR. В двух из них были найдены межлинейные различия в процентном соотношении лейкоцитов разных типов (kile2003 dataset 'Justice2' и petkova2008 dataset 'Petkova1'), которые совпадают с найденными в обсуждаемом исследовании. Межлинейные различия в процентном соотношении иммунокомпетентных клеток могут свидетельствовать о превалировании адаптивного иммунитета у мышей B6, и врожденного – у BTBR, при этом опыт раннего воспаления не дает отставленные эффекты на периферический иммунный ответ у данных животных.

При оценке нейровоспалительных процессов после индукции воспаления в ранний период, мы не обнаружили влияния введения бактериального или вирусного миметиков на микроглиальную или астроглиальную активацию на 40 день жизни. Возможно, мы не обнаружили эффектов из-за того, что оценивали сильно отставленную от индукции воспаления возрастную точку, поскольку активация микроглии и астроглии уже была отмечена у животных линии BTBR на эти агенты через 2 и 16 часов с момента введения (Mutovina et al., 2022).

Однако, в этом эксперименте были обнаружены межлинейные различия в дорсальном гиппокампе: уровень *Aif1* был ниже, а *Gfap* выше у мышей линии BTBR. Обнаруженное нами снижение активности микроглии не согласуется с работами, которые бы исследовали данный параметр на животных моделях РАС: как правило, исследователи отмечают высокий уровень активности микроглии (Hu et al., 2022). Возможно, в нашем исследовании сказался возраст исследуемых животных: патологическую активность микроглии связывают с

нарушенным социальным поведением, дефицит которого не наблюдался в исследуемом возрасте. Аналогичные исследования, выполненные на других животных моделях РАС, показывают, что нейровоспаление может зависеть от конкретной генетической модификации линии, возраста животных и области мозга (Varghese et al., 2017). Обнаруженный повышенный уровень гена *Gfap* согласуется с немногочисленными исследованиями, указывающих на активность астроглии в животных моделях РАС (Xiong et al., 2023).

Всё вместе, полученные нами данные позволили комплексно оценить способность раннего воспаления влиять на раннее развитие, аутизм-подобное и тревожное поведение мышей обеих линий в нескольких возрастных точках. Кроме того, для оценки механизмов, потенциально вовлеченных в наблюдаемые изменения, мы провели анализ состояния воспаления на периферии и в центральной нервной системе.

5. Заключение

В данной работе впервые комплексно исследовано влияние двух различных стрессовых факторов – воспаления и стресса в ранний период – на поведение, функционирование ГГНС, иммунные изменения в динамике у мышей линий BTBR и B6.

В нашем исследовании мы показали, что мыши линии BTBR начинают проявлять аутизм-подобный фенотип в подростковом периоде развития, но не в ювенильном, то есть нарастание социального дефицита, по-видимому, усиливается с возрастом. При этом опыт раннего постнатального стресса разделения с матерью или индуцированного воспаления не приводит к усилению аутизм-подобного фенотипа у мышей линий BTBR и B6. Кроме того, мы обнаружили, что мыши линии BTBR характеризуются повышенной тревожностью и увеличением поведения, связанного с оценкой рисков уже в раннем периоде жизни. При этом перенесенный опыт стресса в постнатальный период приводит к снижению тревожности у этих животных. При анализе ГГНС мы не обнаружили на базальном уровне различий в уровне кортикостерона и экспрессии генов стероидогенеза в надпочечниках у мышей обеих линий независимо от опыта раннего постнатального стресса разделения с матерью. Однако, при добавлении дополнительного острого стресса рестрикции в подростковый период мыши линии BTBR демонстрировали повышенную стресс-реактивность. При этом опыт разделения с матерью по-разному модулировал реакцию на стресс животных разных линий: снижая у B6 и увеличивая у BTBR.

Было выявлено, что мыши линии B6 демонстрируют более быстрые темпы развития рефлексов в неонатальный период по сравнению с животными BTBR. При этом индукция воспаления в раннем возрасте вирусный миметиком ускоряет развитие мышей BTBR, но не B6.

Мы обнаружили, что индукция в ранний постнатальный период ни вирусным, ни бактериальным миметиком не способна оказать длительное

влияние на состояние иммунной системы как на периферии, так и в центральной нервной системе. При этом на базальном уровне животные демонстрировали зависимые от линии изменения в уровне экспрессии генов, связанных с активностью астроглии и микроглии, причем эти различия были регион-специфичными.

6. Выводы

1. Самцы мышей линии VTBV начинают проявлять аутизм-подобный фенотип уже на 37 день жизни; опыт раннего постнатального стресса разделения с матерью или индукция воспаления не приводят к усилению поведенческих нарушений. Индукция воспаления приводит к усилению стереотипии во взрослом возрасте у самцов мышей с нормальным фенотипом C57Bl/6.
2. Самцы мышей линии VTBV демонстрируют повышенную тревожность уже с раннего периода жизни (на 37 день жизни). В этом же возрасте животные этой линии демонстрируют повышенную стресс-реактивность в ответ на острый стресс (рестрикцию): более сильный подъем кортикостерона и уровня экспрессии гена *c-Fos* по сравнению с самцами мышей C57Bl/6. Опыт раннего разделения с матерью усиливает реакцию на стресс самцов линии VTBV, но снижает у самцов линии C57Bl/6.
3. Опыт раннего стресса разделения с матерью и индукции воспаления приводит к снижению тревожности у самцов мышей обеих линий на 37 день жизни.
4. Индукция воспаления в ранний период жизни приводит к нарушению формирования неонатальных рефлексов у самцов линии VTBV: введение Poly I:C ускоряет формирование рефлекса избегания обрыва и отрицательного геотаксиса.

5. Показаны межлинейные различия в транскрипционной активности генов, связанных с активацией микроглии (*Aif1*) и астроглии (*Gfap*): у самцов ВТBR в подростковом возрасте в дорсальном гиппокампе уровень мРНК *Aif1* был выше, а уровень мРНК *Gfap* ниже относительно самцов мышей C57Bl/6. При этом опыт раннего стресса изменяет ответ на острый рестрикционный стресс только у самцов мышей ВТBR (на 37 день жизни): уровень мРНК *Aif1* ниже во фронтальной коре и выше во вентральном гиппокампе по сравнению с группой без опыта раннего стресса. Не выявлено влияния разделения с матерью или индукции воспаления в раннем постнатальном периоде на базовую транскрипционную активность генов *Aif1* и *Gfap* во фронтальной коре и гиппокампе у мышей обеих линий.

7. Список литературы:

1. Семенова АА, Лопатина ОЛ, Салмина АБ. Модели аутизма и методики оценки аутистически-подобного поведения у животных // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. — 2019. — Т.70. — №2. — Стр. 147-162.
2. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology // Nat Rev Genet. — 2008. — V. 9. — P. 341-355.
3. Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, et al. Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity // Nutr Metab (Lond). — 2011. — V. 8. — P. 34.
4. Adkins AM, Colby EM, Kim WK, Wellman LL, Sanford LD. Stressor control and regional inflammatory responses in the brain: regulation by the basolateral amygdala // J Neuroinflammation. — 2023. — V. 20. — P. 128.
5. Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Alzahrani MZ, Bakheet SA, Attia SM. Resveratrol Improves Neuroimmune Dysregulation Through the Inhibition of Neuronal Toll-Like Receptors and COX-2 Signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J Mice // Neuromolecular Med. — 2018. — V. 20. — P. 133-146.
6. Albantakis L, Brandi ML, Brückl T, Gebert D, Auer MK, et al. Oxytocin and cortisol concentrations in adults with and without autism spectrum disorder in response to physical exercise // Compr Psychoneuroendocrinol. — 2021. — V. 11. — P. 100027.
7. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Boudos R, DuBray MB, et al. Diffusion tensor imaging of the corpus callosum in Autism // Neuroimage. — 2007. — V. 34. — P. 61-73.
8. Alomar HA, Ansari MA, Nadeem A, Attia SM, Bakheet SA, et al. A potent and selective CXCR2 antagonist improves neuroimmune dysregulation through the inhibition of NF- κ B and notch inflammatory signaling in the BTBR mouse model of autism // J Neuroimmunol. — 2023. — V. 377. — P. 578069.

9. Amodeo DA, Jones JH, Sweeney JA, Ragozzino ME. Differences in BTBR T+ tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors // *Behavioural brain research*. — 2012. — V. 227. — P. 64-72.
10. Anderson JS, Druzgal TJ, Froehlich A, DuBray MB, Lange N, et al. Decreased interhemispheric functional connectivity in autism // *Cereb Cortex*. — 2011. — V. 21. — P. 1134-46.
11. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice // *J Vis Exp*. — 2013. — V. 24. — P. 50978.
12. Anney RJL, Ripke S, Anttila V. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia // *Molecular Autism*. — 2017. — V. 8. — P. 21.
13. Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats // *Behav Brain Res*. — 2013. — V. 256. — P. 119-27.
14. Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders // *J Autism Dev Disord*. — 2010. — V. 40. — P. 1423-30.
15. Babineau BA, Yang M, Berman RF, Crawley JN. Low home cage social behaviors in BTBR T+tf/J mice during juvenile development // *Physiol Behav*. — 2013. — V. 114. — P. 49-54.
16. Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. // *Psychol Med*. — 1995. — V. 25. — P. 63-77.
17. Bakker-Huvenaars MJ, Greven CU, Herpers P, Wieggers E, Jansen A, et al. Saliva oxytocin, cortisol, and testosterone levels in adolescent boys with autism spectrum disorder, oppositional defiant disorder/conduct disorder and typically developing individuals // *Eur Neuropsychopharmacol*. — 2020. — V. 30. — P. 87-101.

18. Baldy C, Fournier S, Boisjoly-Villeneuve S, Tremblay MÈ, Kinkead R. The influence of sex and neonatal stress on medullary microglia in rat pups // *Exp Physiol.* — 2018. — V. 10. — № 9. — P. 1192-1199.
19. Barrett CE, Hennessey TM, Gordon KM, Ryan SJ, McNair ML, et al. Developmental disruption of amygdala transcriptome and socioemotional behavior in rats exposed to valproic acid prenatally // *Mol Autism.* — 2017. — V. 8. — P. 42.
20. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation // *Nat Rev Immunol.* — 2017. — V. 17. — № 1. — P. 49-59.
21. Benno R, Smirnova Y, Vera S, Liggett A, Schanz N. Exaggerated responses to stress in the BTBR T+tf/J mouse: an unusual behavioral phenotype // *Behav Brain Res.* — 2009. — V. 197. — № 2. — P. 462-5.
22. Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, et al. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation // *Nature genetics.* — 2010. — V. 42. — № 6. — P. 489.
23. Betancur C, Buxbaum JD. SHANK3 haploinsufficiency: a “common” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders // *Molecular Autism.* — 2013. — V. 4. — № 1. — P. 17.
24. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting // *Brain Res.* — 2011. — V. 1380. — P. 42-77.
25. Bettelheim B. *The empty fortress: infantile autism and the birth of the self* // Free Press. — 1967.
26. Biggio F, Talani G, Locci V, Pisu MG, Boero G, et al. Low doses of prenatal ethanol exposure and maternal separation alter HPA axis function and ethanol consumption in adult male rats // *Neuropharmacology.* — 2018. — V. 131. — P. 271-281.
27. Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, et al. Disruption of the ProSAP2 gene in at (12; 22) (q24. 1; q13. 3) is associated with the

- 22q13.3 deletion syndrome // *The American Journal of Human Genetics*. — 2001. — V. 69. — № 2. — P. 261-268.
28. Bonapersona V, Damsteegt R, Adams ML, van Weert LTCM, et al. Sex-Dependent Modulation of Acute Stress Reactivity After Early Life Stress in Mice: Relevance of Mineralocorticoid Receptor Expression // *Front Behav Neurosci*. — 2019. — V. 13. — P. 181.
29. Bondar NP, Lepeshko AA, Reshetnikov VV. Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects // *Behav Neurol*. — 2018. — V. 2018. — P. 1538931.
30. Bromley RL, Mawer G, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs // *Neurology*. — 2008. — V. 71. — № 23. — P. 1923-4.
31. Burke K. A. Comparison of Anxiety-related Behavior on the Elevated Plus Task Following Environmental Enrichment in Two Mouse models for Autism // *Syracuse University Honors Program Capstone Projects*. — 2019. — V. 1095.
32. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness // *Psychopharmacology (Berl)*. — 2016. — V. 233. — № 9. — P. 1637-50.
33. Cao P, Chen C, Liu A, Shan Q, Zhu X, et al. Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines // *Neuron*. — 2021. — V. 109. — № 16. — P. 2573-2589.e9.
34. Caruso A, Ricceri L, Scattoni ML. Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models // *Neurosci Biobehav Rev*. — 2020. — V. 116. — P. 31-43.
35. Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology // *Neuron*. — 2007. — V. 56. — P. 422–437
36. Chao OY, Yunger R, Yang YM. Behavioral assessments of BTBR T+Itpr3tf/J mice by tests of object attention and elevated open platform: Implications for

- an animal model of psychiatric comorbidity in autism // *Behav Brain Res.* — 2018. — V. 347. — P. 140-147.
37. Chess S. Autism in children with congenital rubella // *J Autism Child Schizophr.* — 1971. — V. 1. — № 1. — P. 33-47.
38. Chess S. Follow-up report on autism in congenital rubella // *J Autism Child Schizophr.* — 1977. — V. 7. — № 1. — P. 69-81.
39. Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring // *Science.* — 2016. — V. 351. — № 6276. — P. 933-9.
40. Ciernia AV, Link VM, Careaga M, LaSalle JM, Ashwood P. Genetic variants drive altered epigenetic regulation of endotoxin response in BTBR macrophages // *Brain Behav Immun.* — 2020. — V. 89. — P. 20-31.
41. Cobb S, Guy J, Bird A. Reversibility of functional deficits in experimental models of Rett syndrome // *Biochem Soc Trans.* — 2010. — V. 38. — P. 498–506
42. Constantino J. N. The quantitative nature of autistic social impairment // *Pediatric research.* — 2011. — V. 69. — № 8. — P. 55-62.
43. Corbett BA, Muscatello RA, Baldinger C. Comparing stress and arousal systems in response to different social contexts in children with ASD // *Biol Psychol.* — 2019. — V. 140. — P. 119-130.
44. Dabell MP, Rosenfeld JA, Bader P, Escobar LF, El-Khechen D, et al. Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization // *Am J Med Genet A.* — 2013. — V. 161A. — № 4. — P. 717-31.
45. Dammann O, Meyer U. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? // *Pediatr Res.* — 2011. — V. 69. — P. 26R–33R
46. Dandi E, Kalamari A, Touloumi O, Lagoudaki R, Nousiopolou E, et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress // *Int J Dev Neurosci.* — 2018. — V. 67. — P. 19-32.

- 47.de Kloet AD, Herman JP. Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism // *Front Neuroendocrinol.* — 2018. — V. 48. — P. 50-57.
- 48.de Paiva VN, Lima SN, Fernandes MM, Soncini R, Andrade CA, Giusti-Paiva A. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice // *Behav Brain Res.* — 2010. — V. 215. — № 1. — P.146-51.
- 49.Dodero L, Damiano M, Galbusera A, Bifone A, Tsafaris SA, et al. Neuroimaging evidence of major morpho-anatomical and functional abnormalities in the BTBR T+TF/J mouse model of autism // *PLoS One.* — 2013. — V. 8. — № 10. — P. e76655.
- 50.Donovan AP, Basson MA. The neuroanatomy of autism - a developmental perspective // *J Anat.* — 2017. — V. 230. — № 1. — P. 4-15.
- 51.Endo N, Makinodan M, Mannari-Sasagawa T, Horii-Hayashi N, Somayama N, et al. The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice // *Sci Rep.* — 2021. — V. 11. — № 1. — P. 527.
- 52.Endo N, Makinodan M, Somayama N, Komori T, Kishimoto T, Nishi M. Characterization of behavioral phenotypes in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism spectrum disorder under social housing conditions using the multiple animal positioning system // *Exp Anim.* — 2019. — V. 68. — № 3. — P. 319-330.
- 53.Enthoven L, Schmidt MV, Cheung YH, van der Mark MH, de Kloet ER, Oitzl MS. Ontogeny of the HPA axis of the CD1 mouse following 24 h maternal deprivation at pnd 3 // *Int J Dev Neurosci.* — 2010. — V. 28. — № 2. — P. 217-24.
- 54.Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? // *Neuron.* — 2010. — V. 65. — № 1. — P. 7-19.

55. Faraji J, Karimi M, Lawrence C, Mohajerani MH, Metz GAS. Non-diagnostic symptoms in a mouse model of autism in relation to neuroanatomy: the BTBR strain reinvestigated // *Transl Psychiatry*. — 2018. — V. 8. — № 1. — P. 234.
56. Fatemi SH, Aldinger KA, Ashwood P, Bauman ML, Blaha CD, et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism // *Cerebellum*. — 2012. — V. 11. — № 3. — P. 777-807.
57. Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, et al. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism // *Neurosci Lett*. — 2006. — V. 409. — № 1. — P. 10-13.
58. Ferreira H, Sousa AC, Sereno J, Martins J, Castelo-Branco M, Gonçalves J. Sex-Dependent Social and Repetitive Behavior and Neurochemical Profile in Mouse Model of Autism Spectrum Disorder // *Metabolites*. — 2022. — V. 12. — № 1. — P. 71.
59. Fóscolo DRC, Lima PMA, Rodovalho GV, Coimbra CC. Early maternal separation alters the activation of stress-responsive brain areas in adulthood // *Neurosci Lett*. — 2022. — V. 771. — P. 136464.
60. Frye CA, Llaneza DC. Corticosteroid and neurosteroid dysregulation in an animal model of autism, BTBR mice // *Physiol Behav*. — 2010. — V. 100. — № 3. — P. 264-7.
61. Fuentes IM, Pierce AN, Di Silvestro ER, Maloney MO, Christianson JA. Differential Influence of Early Life and Adult Stress on Urogenital Sensitivity and Function in Male Mice // *Front Syst Neurosci*. — 2018. — V. 11. — P. 97.
62. Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, et al. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism // *Mol Psychiatry*. — 2012. — V. 17. — P. 402–411.
63. Ganguly P, Thompson V, Gildawie K, Brenhouse HC. Adolescent food restriction in rats alters prefrontal cortex microglia in an experience-dependent manner // *Stress*. — 2018. — V. 21. — № 2. — P. 162-168.

64. Gao J, Zou J, Yang L, Zhao J, Wang L, et al. Alteration of peripheral cortisol and autism spectrum disorder: A meta-analysis // *Front Psychiatry*. — 2022. — V. 13. — P. 928188.
65. Geschwind D. H. Advances in autism // *Annual review of medicine*. — 2009. — V. 60. — P. 367-380.
66. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes // *Nature*. — 2009. — V. 459. — P. 569–573.
67. Gould GG, Burke TF, Osorio MD, Smolik CM, Zhang WQ, et al. Enhanced novelty-induced corticosterone spike and upregulated serotonin 5-HT1A and cannabinoid CB1 receptors in adolescent BTBR mice // *Psychoneuroendocrinology*. — 2014. — V. 39. — P. 158-169.
68. Green JG, McLaughlin KA, Berglund PA, Gruber MJ, Sampson NA, et al. Childhood adversities and adult psychiatric disorders in the national comorbidity survey replication I: associations with first onset of DSM-IV disorders // *Arch Gen Psychiatry*. — 2010. — V. 67. — № 2. — P. 113-23.
69. Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, et al. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder // *Nat Genet*. — 2019. — V. 51. — № 3. — P. 431-444.
70. Gu Y, Ye T, Tan P, Tong L, Ji J, et al. Tolerance-inducing effect and properties of innate immune stimulation on chronic stress-induced behavioral abnormalities in mice // *Brain Behav Immun*. — 2021. — V. 91. — P. 451-471.
71. Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, et al. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation // *Arch Gen Psychiatry*. — 2009. — V. 66. — P. 947–956.
72. Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders // *Developmental neurobiology*. — 2014. — V. 74. — № 2. — P. 113-122.

73. Gunnar MR, Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development // *Psychoneuroendocrinology*. — 2002. — V. 27. — №. 1-2. — P. 199-220.
74. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism // *Arch Gen Psychiatry*. — 2011. — V. 68. — № 11. — P. 1095-102.
75. Han Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D, Zhao Q, et al. Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation // *Psychoneuroendocrinology*. — 2019. — V. 107. — P. 37-45.
76. Hedges DJ, Hamilton-Nelson KL, Sacharow SJ, Nations L, Beecham GW, et al. Evidence of novel fine-scale structural variation at autism spectrum disorder candidate loci // *Mol Autism*. — 2012. — V. 3. — P. 2.
77. Heo Y, Zhang Y, Gao D, Miller VM, Lawrence DA. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders // *PLoS One*. — 2011. — V. 6. — P. 7.
78. Herman JP, Nawreen N, Smail MA, Cotella EM. Brain mechanisms of HPA axis regulation: neurocircuitry and feedback in context Richard Kvetnansky lecture // *Stress*. — 2020. — V. 23. — № 6. — P. 617-632.
79. Hertz-Picciotto I, Korrick SA, Ladd-Acosta C, Karagas MR, Lyall K, et al. Maternal tobacco smoking and offspring autism spectrum disorder or traits in ECHO cohorts // *Autism Res*. — 2022. — V. 15. — № 3. — P. 551-569.
80. Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Matsusue Y, Azuma C, Nishi M. Developmental changes in desensitisation of c-Fos expression induced by repeated maternal separation in pre-weaned mice // *J Neuroendocrinol*. — 2013. — V. 25. — № 2. — P. 158-167.
81. Horvath K, Perman JA. Autistic disorder and gastrointestinal disease. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // *Curr Opin Pediatr*. — 2002. — V. 14. — № 5. — P. 583-7.

- 82.Hsiao EY, Bregere C, Malkova N, Patterson PH. Modeling features of autism in rodents. In: Amaral DG, Dawson G, Geschwind DH. Autism Spectrum Disorders // Oxford University Press, Oxford. — 2011.
- 83.Hsiao EY, McBride SW, Chow J, Mazmanian SK, Patterson PH. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2012. — V. 109. — № 31. — P. 2776-81.
- 84.Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders // Cell. — 2013. — V. 155. — № 7. — P. 1451-63.
- 85.Hsiao EY. Immune dysregulation in autism spectrum disorder // Int Rev Neurobiol. — 2013. — Vol. 113. — P. 269-302.
- 86.Hsiao YM, Tsai TC, Lin YT, Chen CC, Huang CC, Hsu KS. Early life stress dampens stress responsiveness in adolescence: Evaluation of neuroendocrine reactivity and coping behavior // Psychoneuroendocrinology. — 2016. — V. 67. — P. 86-99.
- 87.Hu C, Li H, Li J, Luo X, Hao Y. Microglia: Synaptic modulator in autism spectrum disorder // Front Psychiatry. — 2022. — V. 13. — P. 958661.
- 88.Huang H, Wang Q, Guan X, Zhang X, Zhang Y, et al. Effects of enriched environment on depression and anxiety-like behavior induced by early life stress: A comparison between different periods // Behav Brain Res. — 2021. — V. 411. — P. 113389.
- 89.Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex // J Comp Neurol. — 1997. — V. 387. — № 2. — P. 167-78.
- 90.Hwang SR, Kim CY, Shin KM, Jo JH, Kim HA, Heo Y. Altered expression levels of neurodevelopmental proteins in fetal brains of BTBR T+tf/J mice with autism-like behavioral characteristics // J Toxicol Environ Health A. — 2015. — V. 78. — № 8. — P. 516-523.

91. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism // *Nat Genet.* — 2003. — V. 34. — № 1. — P. 27-9.
92. Jiang P, Zhou L, Du Z, Zhao L, Tang Y, et al. Icarin alleviates autistic-like behavior, hippocampal inflammation and vGlut1 expression in adult BTBR mice // *Behav Brain Res.* — 2023. — V. 445. — P. 114384.
93. Jiang Y., Ehlers M. D. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice // *Neuron.* — 2013. — V. 78. — № 1. — P. 8-27.
94. Jin S, Zhao Y, Jiang Y, Wang Y, Li C, et al. Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life // *Neuroreport.* — 2018. — V. 29. — № 8. — P. 643-649.
95. Jung H, Park H, Choi Y, Kang H, Lee E, et al. Sexually dimorphic behavior, neuronal activity, and gene expression in Chd8-mutant mice // *Nat Neurosci.* — 2018. — V. 21. — № 9. — P. 1218-1228.
96. Juruena MF, Bourne M, Young AH, Cleare AJ. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis dysfunction by early life stress // *Neurosci Lett.* — 2021. — V. 759. — P. 136037.
97. Kambali MY, Anshu K, Kutty BM, Muddashetty RS, Laxmi TR. Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour // *Exp Brain Res.* — 2019. — V. 237. — № 8. — P. 1993-2010.
98. Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, Crawley JN. Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse // *Intractable Rare Dis Res.* — 2014. — V. 3. — № 4. — P. 118-33.
99. Kember RL, Dempster EL, Lee TH, Schalkwyk LC, Mill J, Fernandes C. Maternal separation is associated with strain-specific responses to stress and epigenetic alterations to Nr3c1, Avp, and Nr4a1 in mouse // *Brain Behav.* — 2012. — V. 4. — P. 455-67.
100. Khantakova JN, Bondar NP, Antontseva EV, Reshetnikov VV. Once induced, it lasts for a long time: the structural and molecular signatures

- associated with depressive-like behavior after neonatal immune activation // *Front Cell Neurosci.* — 2022. — V. 16. — P. 1066794.
101. Khantakova JN, Bondar NP, Saprionova AA, Reshetnikov VV. Delayed effects of neonatal immune activation on brain neurochemistry and hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning // *Eur J Neurosci.* — 2022. — V. 56. — № 10. — P. 5931-5951.
 102. Kim EG, Chang W, Shin S, Adhikari AS, Seol GH, et al. Maternal separation in mice leads to anxiety-like/aggressive behavior and increases immunoreactivity for glutamic acid decarboxylase and parvalbumin in the adolescence ventral hippocampus // *Korean J Physiol Pharmacol.* — 2023. — 27. — № 1. — P. 113-125.
 103. Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, et al. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder // *Am J Hum Genet.* — 2008. — V. 82. — P. 199–207.
 104. Kıray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, Barnett SC. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination // *Exp Neurol.* — 2016. — V. 283(Pt B). — 541-9.
 105. Kisaretova P, Tsybko A, Bondar N, Reshetnikov V. Molecular Abnormalities in BTBR Mice and Their Relevance to Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders: An Overview of Transcriptomic and Proteomic Studies // *Biomedicines.* — 2023. — V. 11. — № 2. — P. 289.
 106. Korosi A, Shanabrough M, McClelland S, Liu ZW, Borok E, et al. Early-life experience reduces excitation to stress-responsive hypothalamic neurons and reprograms the expression of corticotropin-releasing hormone // *J Neurosci.* — 2010. — V. 30. — № 2. — P. 703-13.
 107. Koshino H, Carpenter PA, Minshew NJ, Cherkassky VL, Keller TA, Just MA. Functional connectivity in an fMRI working memory task in high-functioning autism // *Neuroimage.* — 2005. — V. 24. — № 3. — P. 810-821.
 108. Krishnamurthy K, Yeung MK, Chan AS, Han YMY. Effortful Control and Prefrontal Cortex Functioning in Children with Autism Spectrum

- Disorder: An fNIRS Study // *Brain Sci.* — 2020. — V. 10. — № 11. — P. 880.
109. Kuenzel E, Seguin D, Nicolson R, Duerden EG. Early adversity and positive parenting: Association with cognitive outcomes in children with autism spectrum disorder // *Autism Res.* — 2021. — V. 14. — № 12. — P. 2654-2662.
110. Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation // *Biol Psychiatry.* — 2004. — V. 55. — № 4. — P. 367-75.
111. Langley EA, Krykbaeva M, Blusztajn JK, Mellott TJ. High maternal choline consumption during pregnancy and nursing alleviates deficits in social interaction and improves anxiety-like behaviors in the BTBR T+Itpr3tf/J mouse model of autism // *Behav Brain Res.* — 2015. — V. 278. — P. 210-20.
112. Lauritsen MB, Pedersen CB, Mortensen PB. Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study. // *J Child Psychol Psychiatry.* — 2005. — V. 46. — № 9. — P. 963-71.
113. Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments // *PLoS Genet.* — 2014. — V. 10. — № 9. — P. e1004580.
114. Lee Y, Han PL. Early-Life Stress in D2 Heterozygous Mice Promotes Autistic-like Behaviors through the Downregulation of the BDNF-TrkB Pathway in the Dorsal Striatum // *Exp Neurobiol.* — 2019. — V. 28. — № 3. — P.337-351.
115. Lee Y, Han PL. Early-Life Stress in D2 Heterozygous Mice Promotes Autistic-like Behaviors through the Downregulation of the BDNF-TrkB

- Pathway in the Dorsal Striatum // *Exp Neurobiol.* — 2019. — V. 28. — № 3. — P. 337-351.
116. Lewis MH, Tanimura Y, Lee LW, Bodfish JW. Animal models of restricted repetitive behavior in autism // *Behav Brain Res.* — 2007. — V. 176. — № 1. — P. 66-74.
117. Li F, Xiang H, Gu Y, Ye T, Lu X, Huang C. Innate immune stimulation by monophosphoryl lipid A prevents chronic social defeat stress-induced anxiety-like behaviors in mice // *J Neuroinflammation.* — 2022. — V. 19. — № 1. — P. 12.
118. Liang M, Zhong H, Rong J, Li Y, Zhu C, et al. Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Impairs Adult Neurogenesis and Causes Depression-like Behaviors Through Astrocytes Activation Triggering GABAA Receptor Downregulation // *Neuroscience.* — 2019. — V. 422. — P. 21-31.
119. Liao X, Liu Y, Fu X, Li Y. Postmortem Studies of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder: a Systematic Review // *Mol Neurobiol.* — 2020. — V. 57. — № 8. — P. 3424-3438.
120. Liu Y, Hu Z, Xun G, Peng Y, Lu L, et al. Mutation analysis of the NRXN1 gene in a Chinese autism cohort // *J Psychiatr Res.* — 2012. — V. 46. — P. 630–634.
121. Liu YW, Liu WH, Wu CC, Juan YC, Wu YC, et al. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice // *Brain Res.* — 2016. — V. 1631. — P. 1-12.
122. Lombardo MV, Moon HM, Su J, Palmer TD, Courchesne E, Pramparo T. Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder // *Mol Psychiatry.* — 2018. — V. 23. — P. 1001–1013.
123. Lu Q, Xiang H, Zhu H, Chen Y, Lu X, Huang C. Intranasal lipopolysaccharide administration prevents chronic stress-induced

- depression- and anxiety-like behaviors in mice // *Neuropharmacology*. — 2021. — V. 200. — P. 108816.
124. Lundberg S, Martinsson M, Nylander I, Roman E. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats // *Horm Behav*. — 2017. — V. 87. — P. 137-144.
125. Macri SAW, Chiarotti F, Laviola G. Risk taking during exploration of a plusmaze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice // *Anim. Behav*. — 2002. — V. 64. — P. 541–546.
126. Makris G, Agorastos A, Chrousos GP, Pervanidou P. Stress System Activation in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder // *Front Neurosci*. — 2022. — V. 15. — P. 756628.
127. Makris G, Eleftheriades A, Pervanidou P. Early Life Stress, Hormones, and Neurodevelopmental Disorders // *Horm Res Paediatr*. — 2023. — V. 96. — № 1. — P. 17-24.
128. Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism // *Brain Behav Immun*. — 2012. — V. 26. — № 4. — P. 607-16.
129. Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives // *Mol Hum Reprod*. — 2009. — V. 15. — № 6. — P.321-333.
130. Marotta R, Risoleo MC, Messina G, Parisi L, Carotenuto M, et al. The Neurochemistry of Autism // *Brain Sci*. — 2020. — V. 10. — № 3. — P. 163.
131. Marrocco J, Gray JD, Kogan JF, Einhorn NR, O'Conneide EM, et al. Early Life Stress Restricts Translational Reactivity in CA3 Neurons Associated With Altered Stress Responses in Adulthood // *Front Behav Neurosci*. — 2019. — V. 13. — P. 157.

132. Mawson AR, Croft AM. Rubella Virus Infection, the Congenital Rubella Syndrome, and the Link to Autism // *Int J Environ Res Public Health*. — 2019. — V. 16. — № 19. — P. 3543.
133. Mazzone L, Postorino V, Siracusano M, Riccioni A, Curatolo P. The Relationship between Sleep Problems, Neurobiological Alterations, Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder, and Psychiatric Comorbidities // *J Clin Med*. — 2018. — V. 7. — № 5. — P. 102.
134. McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, Phoenix JL, Bolivar VJ, Crawley JN. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice // *Genes Brain Behav*. — 2008. — V. 7. — № 2. — P. 152-163.
135. McIlwrick S, Rechenberg A, Matthes M, Burgstaller J, Schwarzbauer T, et al. Genetic predisposition for high stress reactivity amplifies effects of early-life adversity // *Psychoneuroendocrinology*. — 2016. — V. 70. — P. 85-97.
136. McKewen M, Skippen P, Cooper PS, Wong ASW, Michie PT, et al. Does cognitive control ability mediate the relationship between reward-related mechanisms, impulsivity, and maladaptive outcomes in adolescence and young adulthood? // *Cogn Affect Behav Neurosci*. — 2019. — V. 19. — № 3. — P. 653-676.
137. McTighe SM, Neal SJ, Lin Q, Hughes ZA, Smith DG. The BTBR mouse model of autism spectrum disorders has learning and attentional impairments and alterations in acetylcholine and kynurenic acid in prefrontal cortex // *PLoS One*. — 2013. — V. 8. — № 4. — P. e62189.
138. Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders // *Neurosci Biobehav Rev*. — 2009. — V. 3. — № 7. — P. 1061-79.
139. Meyza KZ, Defensor EB, Jensen AL, Corley MJ, Pearson BL, et al. The BTBR T+ tf/J mouse model for autism spectrum disorders-in search of biomarkers // *Behav Brain Res*. — 2013. — V. 251. — P. 25-34.

140. Michopoulos V, Powers A, Gillespie CF, Ressler KJ, Jovanovic T. Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond // *Neuropsychopharmacology*. — 2017. — V. 42. — № 1. — P. 254-270.
141. Millstein RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains // *Neurosci Biobehav Rev*. — 2007. — V. 31. — № 1. — P. 3-17.
142. Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains // *Behav Brain Res*. — 2007. — V. 176. — № 1. — P. 4-20.
143. Muscatello RA, Andujar J, Taylor JL, Corbett BA. Exploring Key Physiological System Profiles at Rest and the Association with Depressive Symptoms in Autism Spectrum Disorder // *J Autism Dev Disord*. — 2021. — V. 51. — № 1. — P. 15-29.
144. Muscatello RA, Corbett BA. Comparing the effects of age, pubertal development, and symptom profile on cortisol rhythm in children and adolescents with autism spectrum disorder // *Autism Res*. — 2018. — V. 11. — № 1. — P. 110-120.
145. Mutovina A, Ayriyants K, Mezhlumyan E, Ryabushkina Y, Litvinova E, Bondar N, et al. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice // *Int J Mol Sci*. — 2022. — V. 23. — № 24. — P. 15577.
146. Nadeem A, Ahmad SF, El-Sherbeeney AM, Al-Harbi NO, Bakheet SA, Attia SM. Systemic inflammation in asocial BTBR T+ tf/J mice predisposes them to increased psoriatic inflammation // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. — 2018. — V. 83. — P. 8-17.
147. Nakanishi M, Nomura J, Ji X, Tamada K, Arai T, et al. Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism // *PLoS Genet*. — 2017. — V. 13. — № 8. — P. e1006940.
148. Navailles S, Zimnisky R, Schmauss C. Expression of glucocorticoid receptor and early growth response gene 1 during postnatal development of

- two inbred strains of mice exposed to early life stress // *Dev Neurosci.* — 2010. — V. 32. — № 2. — P. 139-48.
149. Ng-Cordell E, Wardell V, Stewardson C, Kerns CM. Anxiety and Trauma-Related Disorders in Children on the Autism Spectrum // *Curr Psychiatry Rep.* — 2022. — V. 24. — № 3. — P. 171-180.
150. Nguyen AT, Bahry AM, Shen KQ, Armstrong EA, Yager JY. Consumption of broccoli sprouts during late gestation and lactation confers protection against developmental delay induced by maternal inflammation // *Behav Brain Res.* — 2016. — V. 307. — P. 239-49.
151. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W. Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents // *Gen Comp Endocrinol.* — 2013. — V. 181. — P. 306-309.
152. Noor A, Whibley A, Marshall CR. Disruption at the PTCHD1 Locus on Xp22.11 in Autism spectrum disorder and intellectual disability // *Sci Transl Med.* — 2010. — V. 2. — № 49. — P. 49ra68.
153. Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge // *Glia.* — 2016. — V. 64. — № 2. — P. 300-16.
154. O'Connor R, van De Wouw M, Moloney GM, Ventura-Silva AP, O'Riordan K, et al. Strain differences in behaviour and immunity in aged mice: Relevance to Autism // *Behav Brain Res.* — 2021. — V. 399. — P. 113020.
155. Odeon MM, Yamauchi L, Grosman M, Acosta GB. Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats // *Brain Res.* — 2017. — V. 1657. — P. 193-201.
156. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism // *Brain Behav Immun.* — 2012. — V. 26. — № 3. — P. 383-392.

157. Onore CE, Careaga M, Babineau BA, Schwartz JJ, Berman RF, Ashwood P. Inflammatory macrophage phenotype in BTBR T+tf/J mice // *Front Neurosci.* — 2013. — V. 7. — P. 158.
158. Owens MJ, Nemeroff CB. Pharmacology of valproate // *Psychopharmacol Bull.* — 2003. — V. 37. — Suppl 2. — P. 17-24.
159. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development // *Science.* — 2011. — V. 333. — № 6048. — P. 1456-8.
160. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models // *Behav Brain Res.* — 2009. — V. 204. — P. 313–321
161. Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism // *Trends Mol Med.* — 2011. — V. 17. — № 7. — P. 389-94.
162. Patterson PH. Modeling Autistic Features in Animals // *Pediatr Res.* — 2011. — V. 11. — P. 34–40.
163. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases // *Acta Neuropathol.* — 2016. — V. 131. — № 3. — P. 323-45.
164. Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders // *Front Cell Neurosci.* — 2016. — V. 10. — P. 21.
165. Petroni V, Subashi E, Premoli M, Wöhr M, Crusio WE, et al. Autistic-like behavioral effects of prenatal stress in juvenile Fmr1 mice: the relevance of sex differences and gene-environment interactions // *Sci Rep.* — 2022. — V. 12. — № 1. — P. 7269
166. Phelan MC, Rogers RC, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, et al. 22q13 deletion syndrome // *American journal of medical genetics.* — 2001. — V. 101. — P. 91-99.
167. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant,

- mood stabilizer, and teratogen // *J Biol Chem.* — 2001. — V. 276. — № 39. — P. 36734-41.
168. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders // *Nature.* — 2010. — V. 466. — № 7304. — P. 368-72.
169. Pobbe RL, Defensor EB, Pearson BL, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. General and social anxiety in the BTBR T+ tf/J mouse strain // *Behav Brain Res.* — 2011. — V. 216. — № 1. — P. 446-51.
170. Pobbe RL, Pearson BL, Defensor EB, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ. Expression of social behaviors of C57BL/6J versus BTBR inbred mouse strains in the visible burrow system // *Behavioural brain research.* — 2010. — V. 214. — № 2. — P. 443-449.
171. Prigge MB, Lange N, Bigler ED, Merkley TL, Neeley ES, et al. Corpus Callosum Area in Children and Adults with Autism // *Res Autism Spectr Disord.* — 2013. — V. 7. — № 2. — P. 221-234.
172. Rai D, Golding J, Magnusson C, Steer C, Lewis G, Dalman C. Prenatal and early life exposure to stressful life events and risk of autism spectrum disorders: population-based studies in Sweden and England // *PLoS One.* — 2012. — V. 7. — № 6. — P. e38893.
173. Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder // *Dev Med Child Neurol.* — 2005. — V. 47. — № 8. — P. 551-5.
174. Reshetnikov V, Studenikina A, Ryabushkina J, Merkulova T, Bondar N. The impact of early-life stress on the expression of HPA-associated genes in the adult murine brain // *Behaviour.* — 2018. — V. 155. — P. 181–203
175. Reshetnikov VV, Ayriyants KA, Ryabushkina YA, Sozonov NG, Bondar NP. Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice // *Behav Brain Res.* — 2021. — V. 414. — P. 113489.

176. Reshetnikov VV, Lepeshko AA, Ryabushkina YA, Studenikina AA, Merkulova TI, Bondar NP. The Long-Term Effects of Early Postnatal Stress on Cognitive Abilities and Expression of Genes of the Glutamatergic System in Mice // *Neurochem J.* — 2018. — V. 12. — P. 142–151.
177. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress // *Endocrinology.* — 2008. — V. 149. — № 10. — P. 4892-900.
178. Rivarola MA, Suárez MM. Early maternal separation and chronic variable stress in adulthood changes the neural activity and the expression of glucocorticoid receptor in limbic structures // *Int J Dev Neurosci.* — 2009. — V. 27. — № 6. — P.567-574.
179. Robinson-Agramonte MLA, Noris García E, Fraga Guerra J, Vega Hurtado Y, Antonucci N, et al. Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know about It? // *Int J Mol Sci.* — 2022. — V. 23. — № 6. — P. 3033.
180. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei // *Journal of Comparative Neurology.* — 1996. — V. 370. — P. 247-261.
181. Romer D, Reyna VF, Satterthwaite TD. Beyond stereotypes of adolescent risk taking: Placing the adolescent brain in developmental context // *Dev Cogn Neurosci.* — 2017. — V. 27. — P. 19-34.
182. Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels // *Brain Behav Immun.* — 2016. — V. 55. — P. 39-48.
183. Rosen TE, Mazefsky CA, Vasa RA, Lerner MD. Co-occurring psychiatric conditions in autism spectrum disorder // *Int Rev Psychiatry.* — 2018. — V. 30. — № 1. — P. 40-61.

184. Rossignol DA, Frye RE. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism // *Front Physiol.* — 2014. — V. 5. — P. 150.
185. Rotschafer S, Razak K. Altered auditory processing in a mouse model of fragile X syndrome // *Brain Res.* — 2013. — V. 1506. — P. 12-24.
186. Rotschafer S, Razak K. Altered auditory processing in a mouse model of fragile X syndrome // *Brain Res.* — 2013. — V. 1506. — P. 12-24.
187. Roussin L, Prince N, Perez-Pardo P, Kraneveld AD, Rabot S, Naudon L. Role of the Gut Microbiota in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder: Clinical and Preclinical Evidence // *Microorganisms.* — 2020. — V. 8. — № 9. — P. E1369.
188. Saavedra LM, Fenton Navarro B, Torner L. Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups // *Neuroimmunomodulation.* — 2017. — V. 24. — № 4-5. — P. 242-255.
189. Sachs BD, Rodriguiz RM, Siesser WB, Kenan A, Royer EL, et al. The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress // *Int J Neuropsychopharmacol.* — 2013. — V. 16. — № 9. — P. 2081-94.
190. Sala C, Vicidomini C, Bigi I, Mossa A, Verpelli C. Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders // *Journal of neurochemistry.* — 2015. — V. 135. — P. 849-858.
191. Salmina AB, Gorina YV, Komleva YK, Panina YA, Malinovskaya NA, Lopatina OL. Early Life Stress and Metabolic Plasticity of Brain Cells: Impact on Neurogenesis and Angiogenesis // *Biomedicines.* — 2021. — V. 9. — №9. — P. 1092.
192. Sanders BJ, Anticevic A. Maternal separation enhances neuronal activation and cardiovascular responses to acute stress in borderline

- hypertensive rats // *Behav Brain Res.* — 2007. — V. 183. — № 1. — P. 25-30.
193. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism // *Neuron.* — 2011. — V. 70. — P. 863–885.
194. Sandweiss AJ, Brandt VL, Zoghbi HY. Advances in understanding of Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome: prospects for future therapies // *Lancet Neurol.* — 2020. — V. 19. — № 8. — P. 689-698.
195. Sapolsky RM, Meaney MJ, McEwen BS. The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. III. Negative-feedback regulation // *Brain Res.* — 1985. — V. 350. — № 1-2. — P.169-173.
196. Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism // *PloS one.* — 2008. — V. 3. — № 8. — P. e3067.
197. Scattoni ML, Martire A, Cartocci G, Ferrante A, Ricceri L. Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T+ tf/J strain, a mouse model of autism // *Behav Brain Res.* — 2013. — V. 251. — P. 35-40.
198. Schaaf CP, Boone PM, Sampath S, Williams C, Bader PI, et al. Phenotypic spectrum and genotype–phenotype correlations of NRXN1 exon deletions // *Eur J Hum Genet.* — 2012. — V. 20. — P. 1240–1247.
199. Schmeisser MJ, Ey E, Wegener S, Bockmann J, Stempel AV, et al. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2 // *Nature.* — 2012. — V. 486. — № 7402. — P. 256-60.
200. Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse // *Int J Dev Neurosci.* — 2003. — V. 21. — № 3. — P. 125-132.

201. Schmidt MV, Oitzl M, Steenbergen P, Lachize S, Wurst W, et al. Ontogeny of steroid receptor coactivators in the hippocampus and their role in regulating postnatal HPA axis function // *Brain Res.* — 2007. — V. 12. — № 1174. — P. 1-6.
202. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid // *Psychoneuroendocrinology.* — 2008. — V. 33. — P. 728–740.
203. Schott JM, Rossor MN. The grasp and other primitive reflexes // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 2003. — V. 74. — № 5. — P. 558-60.
204. Schwartzter JJ, Careaga M, Onore CE, Rushakoff JA, Berman RF, Ashwood P. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice // *Transl Psychiatry.* — 2013. — V. 3. — № 3. — P. e240.
205. Schwartzter JJ, Onore CE, Rose D, Ashwood P. C57BL/6J bone marrow transplant increases sociability in BTBR T+ Itpr3tf/J mice // *Brain Behav Immun.* — 2017. — V. 59. — P. 55-61.
206. Sharghi S, Flunkert S, Daurer M, Rabl R, Chagnaud BP, et al. Evaluating the effect of R-Baclofen and LP-211 on autistic behavior of the BTBR and Fmr1-KO mouse models // *Front Neurosci.* — 2023. — V. 17. — P. 1087788.
207. Shi R, Liu H, Tan P, Hu Z, Ma Y, et al. Innate immune stimulation prevents the development of anxiety-like behaviors in chronically stressed mice // *Neuropharmacology.* — 2022. — V. 207. — P. 108950.
208. Shin HS, Choi SM, Lee SH, Moon HJ, Jung EM. A Novel Early Life Stress Model Affects Brain Development and Behavior in Mice // *Int J Mol Sci.* — 2023. — V. 24. — № 5. — P. 4688.
209. Shin S, Lee S. The impact of environmental factors during maternal separation on the behaviors of adolescent C57BL/6 mice // *Front Mol Neurosci.* — 2023. — V. 16. — P. 1147951.

210. Shin SH, Wright C, Johnston S. Early Life Experiences Moderate the Relationship Between Genetic Risk of Autism and Current and Lifetime Mental Health // *Front Psychiatry*. — 2021. — V. 12. — P. 772841.
211. Siddiqui TJ, Pancaroglu R, Kang Y, Rooyakkers A, Craig AM. LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development // *J Neurosci*. — 2010. — V. 30. — P. 7495–7506.
212. Silverman J, Yang M, Lord C. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism // *Nat Rev Neurosci*. — 2010. — V. 11. — P. 490–502.
213. Silverman JL, Tolu SS, Barkan CL, Crawley JN. Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP // *Neuropsychopharmacology*. — 2010. — V. 35. — № 4. — P. 976-989.
214. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample // *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. — 2008. — V. 47. — № 8. — P. 921-929.
215. Singletary WM. An integrative model of autism spectrum disorder: ASD as a neurobiological disorder of experienced environmental deprivation, early life stress and allostatic overload // *Neuropsychoanalysis*. — 2015. — V. 17. — № 2. — P. 1-101.
216. Siracusano M, Riccioni A, Abate R, Benvenuto A, Curatolo P, Mazzone L. Vitamin D Deficiency and Autism Spectrum Disorder // *Curr Pharm Des*. — 2020. — 26. — № 21. — P. 2460-2474.
217. Smith ED, Prieto GA, Tong L. Rapamycin and interleukin-1 β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy // *J Biol Chem*. — 2014. — V. 289. — P. 20615–20629.

218. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology // *Acta Neuropathol.* — 2010. — V. 119. — № 1. — P. 7-35.
219. Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, Hekimler K, Imirzalioglu N. A 10.46 Mb 12p11.1–12.1 interstitial deletion coincident with a 0.19 Mb NRXN1 deletion detected by array CGH in a girl with scoliosis and autism // *Am J Med Genet Part A.* — 2011. — V. 155A. — P. 1745–1752.
220. Spencer CM, Alekseyenko O, Hamilton SM, Thomas AM, Serysheva E, et al. Modifying behavioral phenotypes in Fmr1KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses // *Autism Res.* — 2011. — V. 4. — № 1. — P. 40-56.
221. Spratt EG, Nicholas JS, Brady KT, Carpenter LA, Hatcher CR, et al. Enhanced cortisol response to stress in children in autism // *J Autism Dev Disord.* — 2012. — V. 42. — № 1. — P. 75-81.
222. Spratt EG, Nicholas JS, Brady KT, Carpenter LA, Hatcher CR, et al. Enhanced cortisol response to stress in children in autism // *J Autism Dev Disord.* — 2012. — V. 42. — № 1. — P. 75-81.
223. Stephenson DT, O'Neill SM, Narayan S, Tiwari A, Arnold E, et al. Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis // *Mol Autism.* — 2011. — V. 2. — № 1. — P. 7.
224. Tan S, Ho HS, Song AY, Low J, Je HS. Maternal Separation Does Not Produce a Significant Behavioral Change in Mice // *Exp Neurobiol.* — 2017. — V. 26. — № 6. — P. 390-398.
225. Targum SD, Nemeroff CB. The Effect of Early Life Stress on Adult Psychiatric Disorders // *Innov Clin Neurosci.* — 2019. — V. 16. — № 1-2. — P. 35-37.
226. Taylor JL, Corbett BA. A review of rhythm and responsiveness of cortisol in individuals with autism spectrum disorders // *Psychoneuroendocrinology.* — 2014. — V. 49. — P. 207-228.

227. Taylor JL, Corbett BA. A review of rhythm and responsiveness of cortisol in individuals with autism spectrum disorders // *Psychoneuroendocrinology*. — 2014. — V. 49. — P. 207-28.
228. Tomarken AJ, Han GT, Corbett BA. Temporal patterns, heterogeneity, and stability of diurnal cortisol rhythms in children with autism spectrum disorder // *Psychoneuroendocrinology*. — 2015. — V. 62. — P. 217-26.
229. Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review // *Neurosci Biobehav Rev*. — 2016. — V. 68. — P. 489-503.
230. Troakes C, Ingram CD. Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation // *Stress*. — 2009. — V. 12. — № 4. — P. 362-369.
231. Tsuda MC, Ogawa S. Long-lasting consequences of neonatal maternal separation on social behaviors in ovariectomized female mice // *PLoS One*. — 2012. — V. 7. — № 3. — P. e33028.
232. Uddin MN, Yao Y, Manley K, Lawrence DA. Development, phenotypes of immune cells in BTBR T+Itpr3tf/J mice // *Cell Immunol*. — 2020. — V. 358. — P. 104223.
233. Uemura T, Lee SJ, Yasumura M, Takeuchi T, Yoshida T, et al. Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum // *Cell*. — 2010. — V. 141. — P. 1068–1079.
234. van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure // *Front Cell Neurosci*. — 2017. — V. 11. — P. 87.

235. Van Steensel FJ, Bögels SM, Perrin S. Anxiety disorders in children and adolescents with autistic spectrum disorders: a meta-analysis // *Clinical child and family psychology review*. — 2011. — V. 14. — № 3. — P. 302.
236. VanRyzin JW, Yu SJ, Perez-Pouchoulen M, McCarthy MM. Temporary Depletion of Microglia during the Early Postnatal Period Induces Lasting Sex-Dependent and Sex-Independent Effects on Behavior in Rats // *eNeuro*. — 2016. — V. 3. — № 6. — P. ENEURO.0297-16.2016.
237. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism // *Ann Neurol*. — 2005. — V. 57. — № 1. — P. 67-81.
238. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models // *Acta Neuropathol*. — 2017. — V. 134. — № 4. — P. 537-566.
239. Verpelli C, Sala C. Molecular and synaptic defects in intellectual disability syndromes // *Current opinion in neurobiology*. — 2012. — V. 22. — P. 530-536.
240. Walker JJ, Spiga F, Gupta R, Zhao Z, Lightman SL, Terry JR. Rapid intra-adrenal feedback regulation of glucocorticoid synthesis // *J R Soc Interface*. — 2015. — V.12. — № 102. — P. 20140875.
241. Wang C, Geng H, Liu W, Zhang G. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis // *Medicine (Baltimore)*. — 2017. — V. 96. — № 18. —P. e6696.
242. Wang D, Levine JLS, Avila-Quintero V, Bloch M, Kaffman A. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents // *Transl Psychiatry*. — 2020. — V. 10. — № 1. — P. 174.
243. Wang L, Wang B, Wu C, Wang J, Sun M. Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy // *Int J Mol Sci*. — 2023. — V. 24. — № 3. — P. 1819.

244. Wang Q, Li M, Du W, Shao F, Wang W. The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats // *Behav Brain Res.* — 2015. — V. 280. — P. 16-23.
245. Wang XD, Labermaier C, Holsboer F, Wurst W, Deussing JM, et al. Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1 // *Eur J Neurosci.* — 2012. — V. 36. — № 3. — P. 2360-7.
246. Wearick-Silva LE, Orso R, Martins LA, Creutzberg KC, Centeno-Silva A, et al. Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and *Bdnf/TrkB* and *Drd1/Drd2* gene expression in different mouse brain regions // *Behav Brain Res.* — 2019. — V. 359. — P. 66-72.
247. Winiarski M, Kondrakiewicz L, Kondrakiewicz K, Jędrzejewska-Szmek J, Turzyński K, et al. Social deficits in BTBR T+ *Itpr3*tf/J mice vary with ecological validity of the test // *Genes Brain Behav.* — 2022. — V. 21. — № 5. — P. e12814.
248. Wöhr M., Rouillet F. I., Crawley J. N. Reduced scent marking and ultrasonic vocalizations in the BTBR T+ *tf/J* mouse model of autism // *Genes, Brain and Behavior.* — 2011. — V. 10. — P. 35-43.
249. Wong CS, Jow GM, Kaizaki A, Fan LW, Tien LT. Melatonin ameliorates brain injury induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats // *Neuroscience.* — 2014. — V. 267. — P. 147-56.
250. Woodbury-Smith M, Scherer SW. Progress in the genetics of autism spectrum disorder // *Dev Med Child Neurol.* — 2018. — V. 60. — № 5. — P. 445-451.
251. Xiao R, Zhong H, Li X, Ma Y, Zhang R, et al. Abnormal Cerebellar Development Is Involved in Dystonia-Like Behaviors and Motor Dysfunction of Autistic BTBR Mice // *Front Cell Dev Biol.* — 2020. — V. 8. — P. 231.

252. Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells // *J Mol Endocrinol*. — 2010. — V. 45. — № 1. — P. 59-68.
253. Xiong Y, Chen J, Li Y. Microglia and astrocytes underlie neuroinflammation and synaptic susceptibility in autism spectrum disorder // *Front Neurosci*. — 2023. — V. 17. — P. 1125428.
254. Yang M, Scattoni ML, Zhodzishsky V, Chen T, Caldwell H, et al. Social approach behaviors are similar on conventional versus reverse lighting cycles, and in replications across cohorts, in BTBR T+ tf/J, C57BL/6J, and vasopressin receptor 1B mutant mice // *Front Behav Neurosci*. — 2007. — V. 1. — P. 1.
255. Yang M, Zhodzishsky V, Crawley JN. Social deficits in BTBR T+ tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers // *International Journal of Developmental Neuroscience*. — 2007. — V. 25. — P. 515-521.
256. Yeh JH, Wang KC, Kaizaki A, Lee JW, Wei HC, et al. Pioglitazone Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Impairment, Brain Inflammation, White Matter Injury and Mitochondrial Dysfunction in Neonatal Rats // *Int J Mol Sci*. — 2021. — V. 22. — № 12. — P. 6306.
257. Zeidan J, Fombonne E, Scora J, Ibrahim A, Durkin MS, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update // *Autism Research*. — 2022. — V. 15. — P. 778-790.
258. Zhang L, Xu X, Ma L, Wang X, Jin M, et al. Zinc Water Prevents Autism-Like Behaviors in the BTBR Mice // *Biol Trace Elem Res*. — 2023.
259. Zhang Q, Wu H, Zou M, Li L, Li Q, et al. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism // *J Nutr Biochem*. — 2019. — V. 71. — P. 98-109.

260. Zhao H, Zhang H, Liu S, Luo W, Jiang Y, Gao J. Association of Peripheral Blood Levels of Cytokines With Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis // *Front Psychiatry*. — 2021. — V. 12.
261. Zoghbi HY, Bear MF. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. — 2012. — V. 3. — P. a009886.