

Айриянц Ксения Аркадьевна

**ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ И  
СТРЕССА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД НА  
ВЫРАЖЕННОСТЬ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО  
СПЕКТРА У МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР**

1.5.5 физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в секторе молекулярной нейробиологии стресса ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», г.Новосибирск.

**Научный руководитель — Бондарь Наталья Петровна**, канд. биол. наук, заведующая сектором молекулярной нейробиологии стресса ФГБНУ ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

**Официальные оппоненты:**

**Лопатина Ольга Леонидовна**, д-р. биол. наук, доцент, руководитель лаборатории социальных нейронаук, профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО Красноярского Государственного Медицинского Университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Минздрава России.

**Степаничев Михаил Юрьевич**, д-р. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы ФГБУН Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва

**Ведущее учреждение — Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Университет «Сириус»**, г. Сочи

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2024 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.178.0 на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. академика Тимакова, 4; тел.: (383) 335-98-01; факс: (383) 335-97-54; эл. почта [dissovet@neuronm.ru/](mailto:dissovet@neuronm.ru/).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте Института [www.neuronm.ru](http://www.neuronm.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_2024г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
д-р биол. наук

М. А. Тихонова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Расстройство аутистического спектра (РАС) в настоящее время является наиболее распространенным нарушением развития головного мозга (Zeidan et al., 2022). Диагностика патологии основывается на обнаружении характерной триады аутизма: недостаток социальных взаимодействий, нарушение взаимной коммуникации и ограниченность интересов, выраженная в повторяющемся репертуаре поведения (Zwaigenbaum et al., 2016). Наблюдаемая в развитых странах тенденция к увеличению случаев заболевания (Centers for Disease Control and Prevention, 2007, 2016), а также неполнота данных о его патогенезе актуализируют дальнейшие исследования РАС.

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 формы РАС: синдромальную и идиопатическую. Синдромальный РАС связан с определенными мутациями в локусах хромосом и, как правило, сопровождается различными сопутствующими патологиями. 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 (Sandweiss et al., 2020), генетический фактор, по-видимому, играет важную роль в развитии и 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. 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 (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 BTBR можно считать обнаруженный абберрантный иммунный профиль (Heo et al., 2011). По сравнению с высоко социальными мышами C57BL/6 (B6), которые, как правило, используются в качестве контроля, мыши BTBR

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 $\beta$  (Careaga et al., 2015). Измененный иммунный профиль мышей BTBR 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, 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 стресс (Corbett et al., 2019), 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.

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

**Задачи исследования:**

- 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 рефлексив;
- 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 BTBR. В поставленных экспериментах мы впервые оценили поведенческие изменения у мышей BTBR 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.

**Методология и методы диссертационного 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 рефлекс) 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.

**Степень достоверности результатов.** Результаты являются достоверными, поскольку получены на большой выборке животных с применением адекватных молекулярно-генетических методов исследования и статистической обработки полученных данных.

**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.

**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.

**Личный вклад автора.** Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором лично. Автор благодарит Павлова Константина Сергеевича и Рябушкину Юлию Андреевну за помощь в получении и обработке данных поведенческих тестов.

**Апробация результатов.** 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Для оценки влияния 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 T+tf/J в различных возрастных точках (Рис.1).

Детенышей мышей линий C57Bl/6 (B6) и BTBR T+tf/J (BTBR) случайным образом разделяли на экспериментальные группы: подвергавшиеся стрессу разлучения с матерью на 3 часа в день со второго по 15 дни жизни (maternal separation, MS) и контрольные (NC), которые стрессу не подвергались.

Таким образом, животные разделились на четыре группы: 1) контрольная группа B6-NC; 2) группа B6-MS; 3) контрольная группа BTBR-NC и 4) группа BTBR-MS. Оценка социального и индивидуального поведения животных всех групп была проведена с помощью тестов «Социальное взаимодействие» (на 23 и 37 день жизни (ДЖ)), «Темная-светлая камера» и «Открытое поле» (на 23 ДЖ). Животные на 23 ДЖ случайным образом разделялись внутри на две подгруппы: первая подгруппа тестировалась в тесте «Открытое поле», а вторая – в тесте «Социальное взаимодействие». 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.

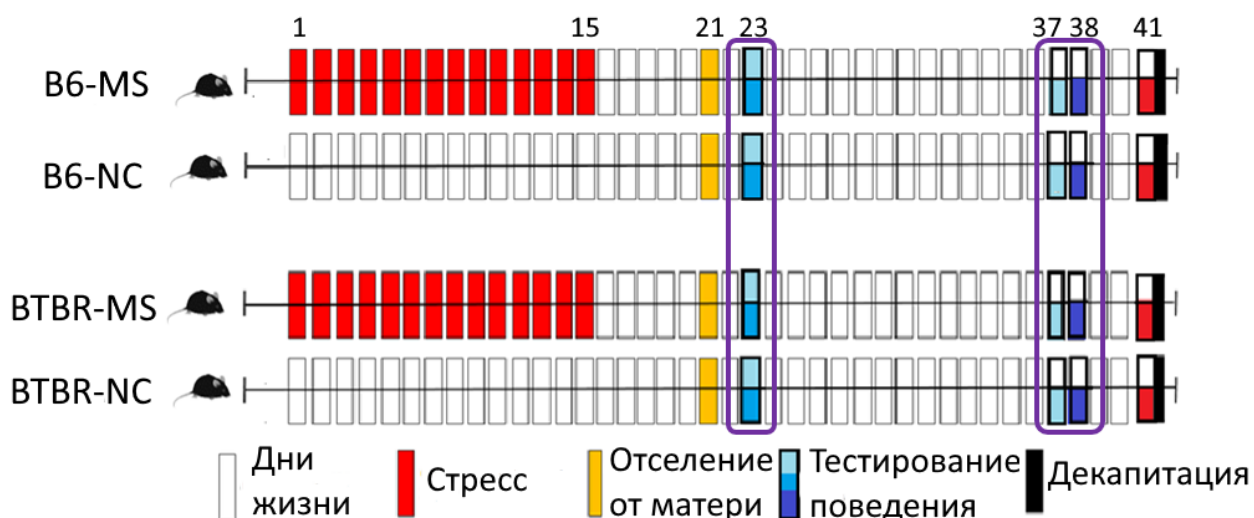
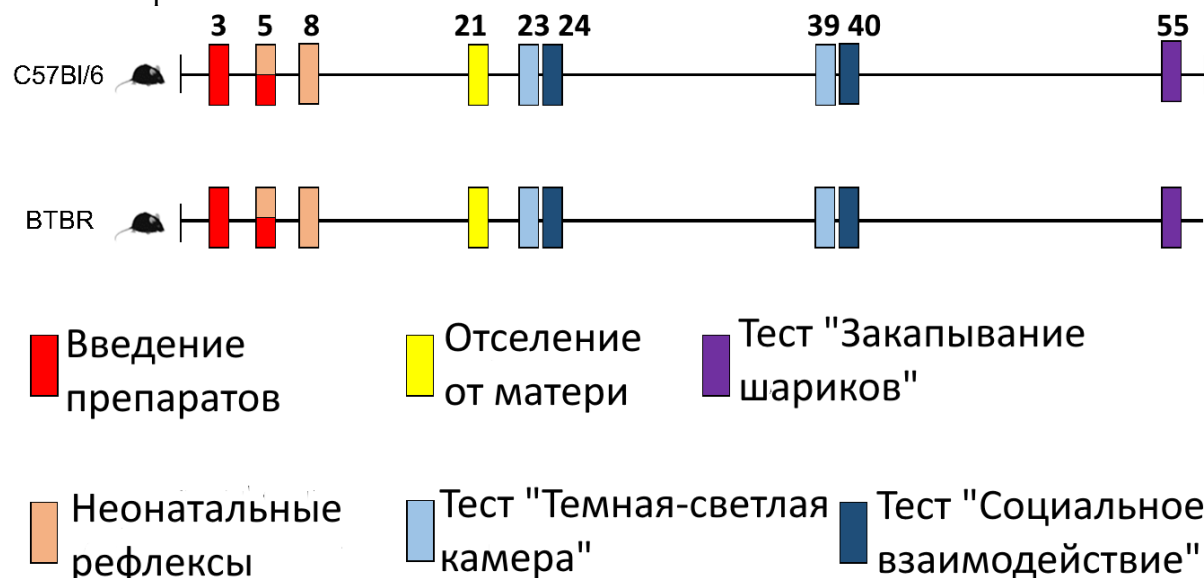


Рисунок 1. Схема проведения Эксперимента 1.

**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 детеныши мышей линий B6 и BTBR

случайным образом разделялись на экспериментальные группы. Мышам экспериментальных групп на 3й и 5й дни жизни вводили либо отдельно липополисахарид (бактериальный миметик) (50мкг/кг) либо полиинозиновую полицитидиловую кислоту (вирусный миметик) (10 мкг/кг), либо их сочетание (Рис.2). Контрольная группа получала эквивалентный объем физиологического раствора. Таким образом, животные каждой линии разделились на 4 группы: контрольная группа (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 неонатальных рефлексов. 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) животные выводились из эксперимента быстрой декапитацией для забора тканей и крови.



**Рисунок 2.** Схема проведения Эксперимента 2.

Для анализа полученных данных использовалось программное обеспечение EthoStudio и Ethovision 10.0 (тест «Открытое поле» и тест «Социальное взаимодействие»), а также BORIS (тест «Темная-светлая камера»). Тест «Закапывание шариков», неонатальные рефлексы, а также некоторые параметры теста «Темная-светлая камера» были обработаны вручную.

Выделение РНК для последующего анализа осуществляли с помощью PureZol (Bio-Rad, США), в соответствии с протоколом производителя, а затем производили реакцию обратной транскрипции при помощи набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», Литва). Оценка уровня экспрессии исследуемых генов производилась методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченных зондов с помощью коммерческого набора BioMaster HS-qPCR («Биолабмикс», Россия).

Иммуноферментный анализ уровня кортикостерона в плазме крови был проведен с использованием коммерческого набора Corticosterone High Sensitivity Competitive enzyme immunoassay AC-15F1, («Immunodiagnostic systems», США) на спектрофотометре VICTOR3 («Perkin Elmer», США). Общий анализ крови производился с помощью гемоанализатора BC-2800 Vet (Mindray auto hematology analyzer) на базе ЦКП «SPF виварий».

Статистический анализ был выполнен с использованием программы Statistica 6.0. Данные были проверены на нормальность. Статистический анализ выполняли с

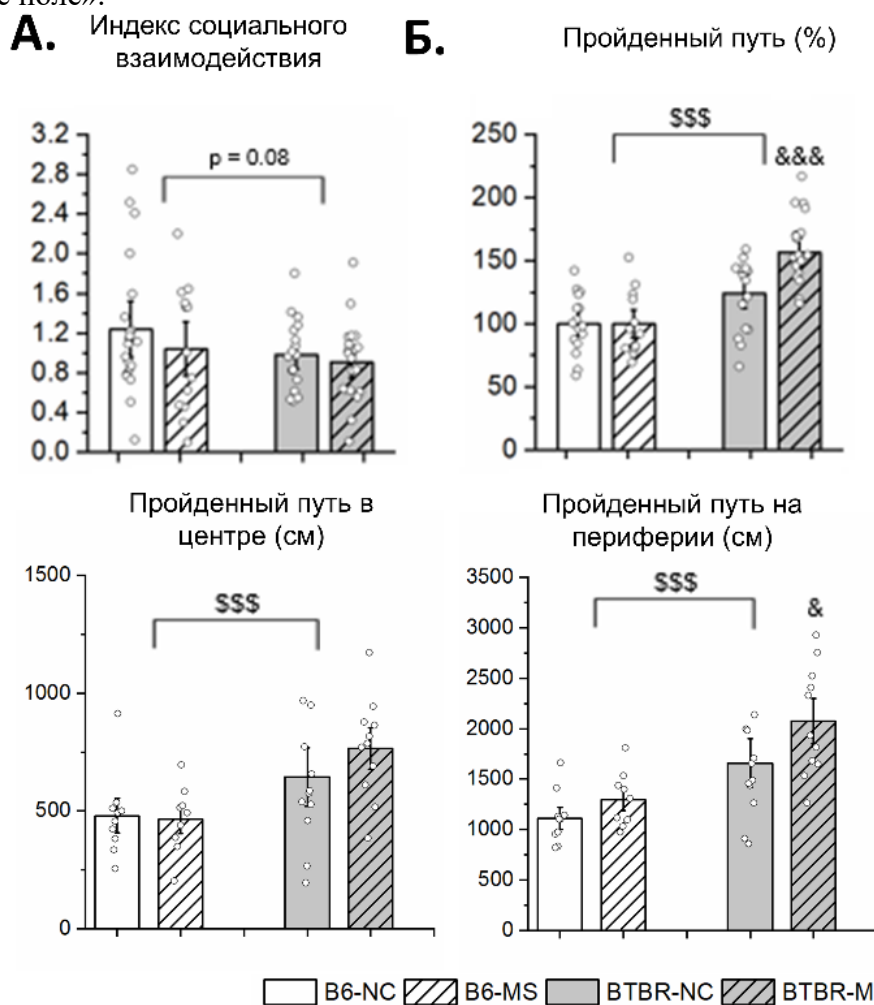
помощью ANOVA и теста Фишера (LSD) в качестве апостериорного анализа. Различия между группами мышей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ ; незначительный тренд предполагался при  $p < 0,1$ . Для анализа неонатальных рефлексов использовался критерий хи-квадрат для межгруппового сравнения. Данные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

## Основные результаты и обсуждение

### 1. Эксперимент 1.

#### 1.1 Влияние раннего постнатального стресса на индивидуальное и социальное поведение животных в ювенильный и подростковый периоды жизни

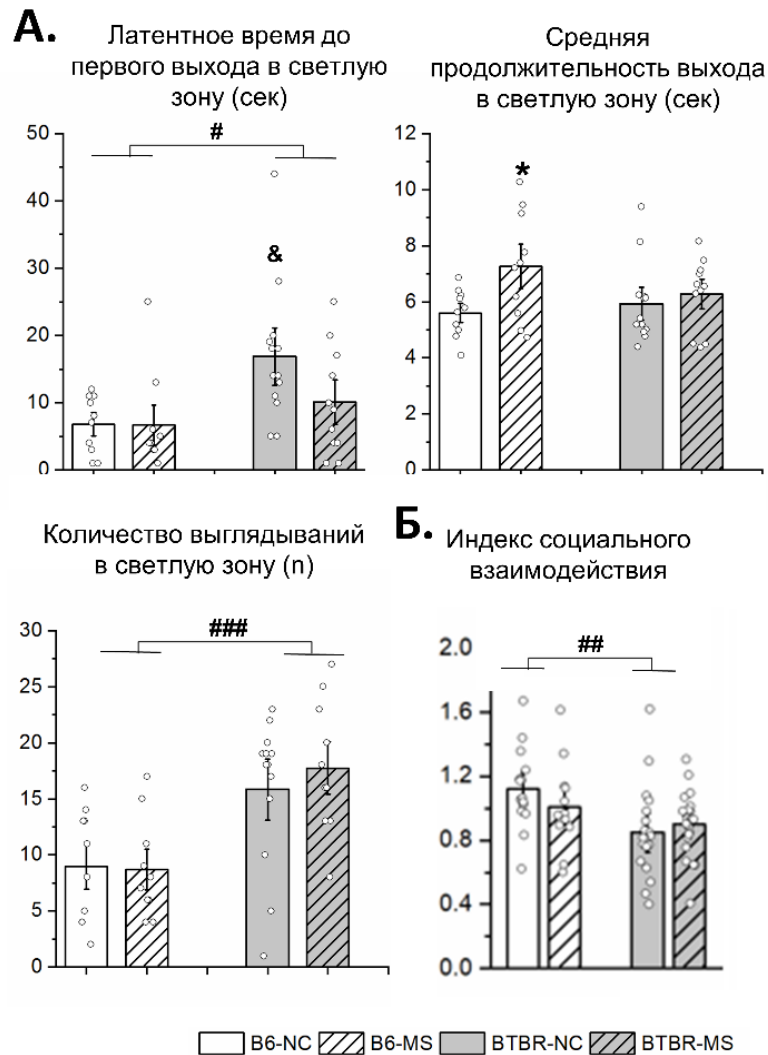
При анализе поведения животных в ювенильный период жизни (Рис.3), мы обнаружили только тенденцию к снижению социального индекса (который рассчитывался как отношение времени реакции на социальный стимул к времени реакции на несоциальный, выраженный в процентах) у самцов мышей линии BTBR, при этом опыт раннего постнатального стресса не оказал влияние на этот параметр у обеих линий мышей. Кроме того, мы не обнаружили влияние опыта стресса в ранний период на тревожность. Однако, при анализе двигательной активности, было выявлено, что самцы линии BTBR достоверно проходят больший путь по сравнению с B6, при этом опыт раннего постнатального стресса приводит к ещё большему увеличению двигательной активности у BTBR, причем только в периферической зоне теста «Открытое поле».



**Рисунок 3.** А – индекс социального взаимодействия в тесте «Социальное взаимодействие»; Б – пройденный путь в тесте «Открытое поле». Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM, & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; \$ -- BTBR vs. B6. &  $p < 0,05$ ; &&&  $p < 0,001$ ; \$\$\$  $p < 0,0011$ .



Анализ социального поведения мышей в подростковом периоде (Рис.4) выявил, что мыши линии BTBR демонстрировали достоверно сниженный индекс социального взаимодействия в этом возрасте по сравнению с самцами линии B6, при этом опыт раннего постнатального стресса не влиял на поведенческий фенотип. Кроме того, при анализе тревожности животных в этом периоде мы обнаружили, что самцы мышей BTBR демонстрируют повышенную тревожность и усиленное поведение, связанное с оценкой рисков (латентное время и количество выглядываний в тесте «Темная-светлая камера») по сравнению с животными B6. При этом опыт разделения с матерью приводит к снижению тревожности и поведения оценки рисков в этом тесте у мышей обеих линий в подростковом периоде: снижается общее и среднее время в светлой зоне, продолжительность сидения на пороге у мышей B6, латентное время до первого выхода и количество выглядываний в светлую зону у мышей BTBR.



**Рисунок 4.** 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; & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; # -- BTBR vs. B6. \*  $p < 0.05$ ; &  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .

Таким образом, мы обнаружили, что хоть мыши линии BTBR 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 B6. И, хотя нарушение социального поведения считается одной из наиболее воспроизводимых характеристик линии (Scattoni et al., 2013; Chao et al., 2018; Winiarski et al., 2022), ранее этот параметр

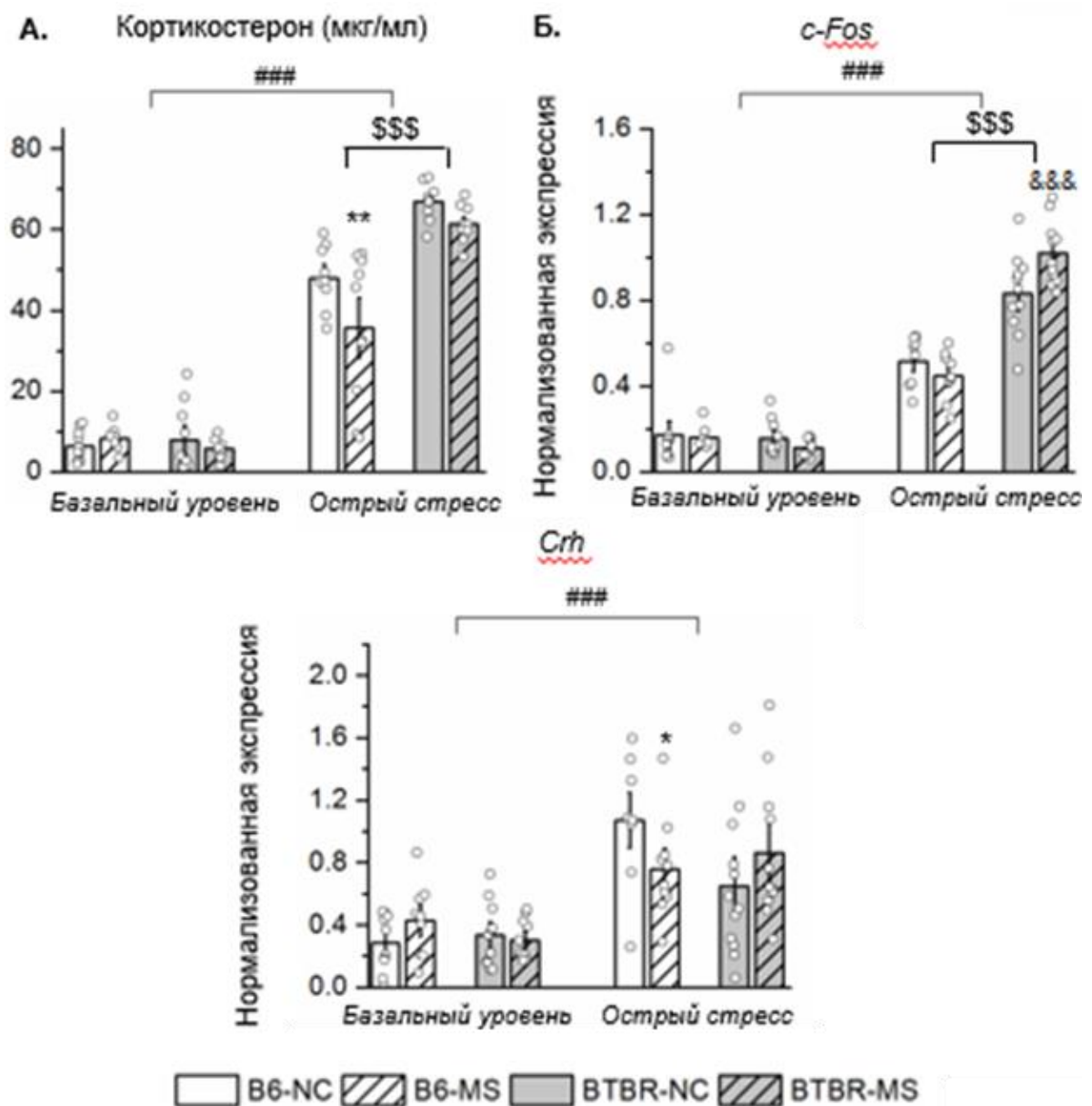
тестировали только на взрослых животных, таким образом данные, полученные в нашем исследовании в ювенильный и подростковый периоды дополняют данные по поведенческому фенотипу мышей BTBR. В нашей работе, воздействие на животных стрессом разделения с матерью в ранний период не приводило к усилению аутизм-подобного фенотипа ни у одной из исследованных линий в ювенильном или подростковом периодах жизни. Возможно, это связано с ранним возрастом тестирования социального поведения мышей линии BTBR: аутизм-подобный поведенческий фенотип только начинает проявляться в подростковом периоде, а ранний постнатальный стресс разделения с матерью окажет свои негативные эффекты позднее.

Ранее повышенная двигательная активность и тревожность мышей BTBR была описана для взрослых животных этой линии (Moy et al., 2007; Faraji et al., 2018; O'Connor et al., 2021). Наши данные показывают, что эти поведенческие черты начинают формироваться уже в ювенильный период жизни мышей BTBR. Обнаруженное нами увеличение двигательной активности только на периферии у самцов BTBR после опыта раннего стресса позволяет предположить, что наблюдаемое поведение является проявлением стереотипии данных животных, а не истинным увеличением двигательной активности. Однако, для однозначной трактовки необходимо проведение дополнительных узконаправленных тестов.

### 1.2 Влияние раннего постнатального стресса на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему в норме и после дополнительного острого стресса

В нашем исследовании мы обнаружили, что ранний постнатальный стресс не вызывает выраженного изменения активности ГГНС на базальном уровне ни у мышей B6, ни у мышей BTBR 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* у мышей BTBR, чем у мышей B6, что указывает на повышенную стресс-реактивность линии BTBR. Неожиданно влияние стресса разделения с матерью оказывало разнонаправленные изменения на уровень кортикостерона и экспрессию генов у двух линий мышей после острой рестрикции. А именно, у мышей B6 с опытом раннего постнатального стресса повышение уровня кортикостерона и уровня мРНК гена *Crh* в гипоталамусе было менее выраженное по сравнению с контрольными мышами B6. При этом мыши BTBR с историей раннего постнатального стресса демонстрировали более сильную активацию экспрессии гена *c-Fos* в гипоталамусе, фронтальной коре и надпочечниках по сравнению с контрольными мышами BTBR. В целом эти данные свидетельствуют о том, что ранний постнатальный стресс может по-разному влиять на животных с разным генетическим фоном, снижая стресс-реактивность у мышей B6 и увеличивая ее у мышей BTBR.

Наблюдаемая в нашей работе повышенная стресс-реактивность мышей BTBR, хорошо согласуется с другими исследованиями, которые показывают снижение исследовательской активности и социального поведения этой линии (Meuza 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).

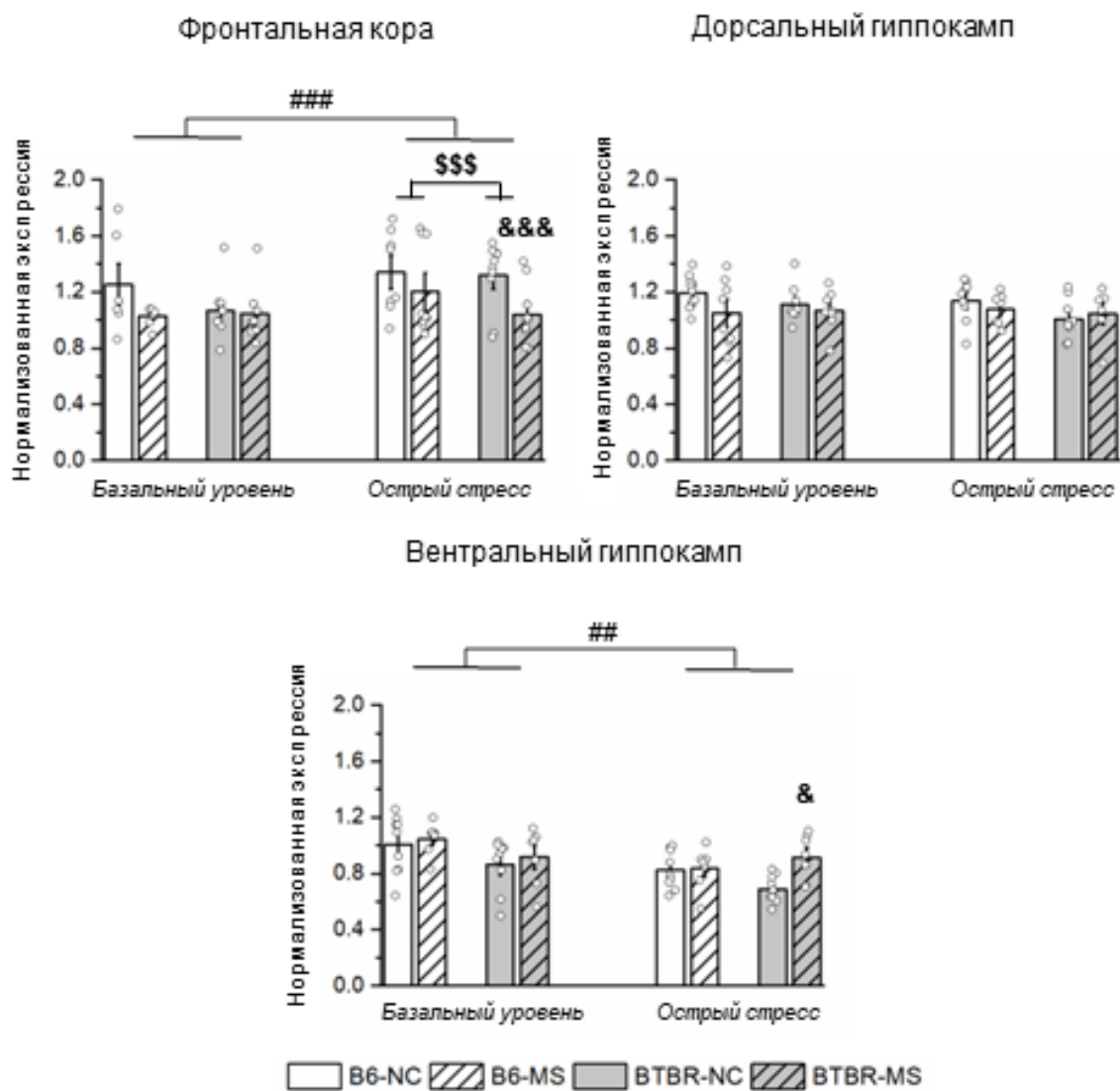


**Рисунок 5.** А – уровень кортикостерона в плазме животных с опытом и без опыта раннего стресса на базальном уровне и после предъявления острого стресса; Б – уровень экспрессии генов *c-Fos* и *Crh* в гипоталамусе животных. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM. \* -- B6-MS vs. B6-NC; & -- VTBR-MS vs. VTBR-NC; \$ -- VTBR vs. B6; # -- базальный уровень vs. острый стресс. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; &&&  $p < 0.001$ ; \$\$\$  $p < 0.001$ ; ###  $p < 0.001$ .

### 1.3 Влияние раннего постнатального стресса на экспрессию генов, связанных с активностью микроглии и астроглии, в норме и после дополнительного острого стресса

При оценке уровня экспрессии генов-маркеров активности микроглии (*Aif1*) и астроглии (*Gfap*) во фронтальной коре и гиппокампе мы не выявили различий между линиями мышей на базальном уровне. Однако, воздействие острым стрессом рестрикции оказывало регион-специфичные изменения: уровень экспрессии *Aif1* увеличивался во фронтальной коре животных обеих линий, но снижался в вентральном гиппокампе. Причем обнаруженный подъем во фронтальной коре мРНК гена *Aif1* у VTBR был ниже, чем у мышей B6 с нормальным поведенческим фенотипом. При этом опыт раннего постнатального стресса по-разному модулировал активность микроглии у VTBR в ответ на рестрикцию: 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 BTBR, но не у B6 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).



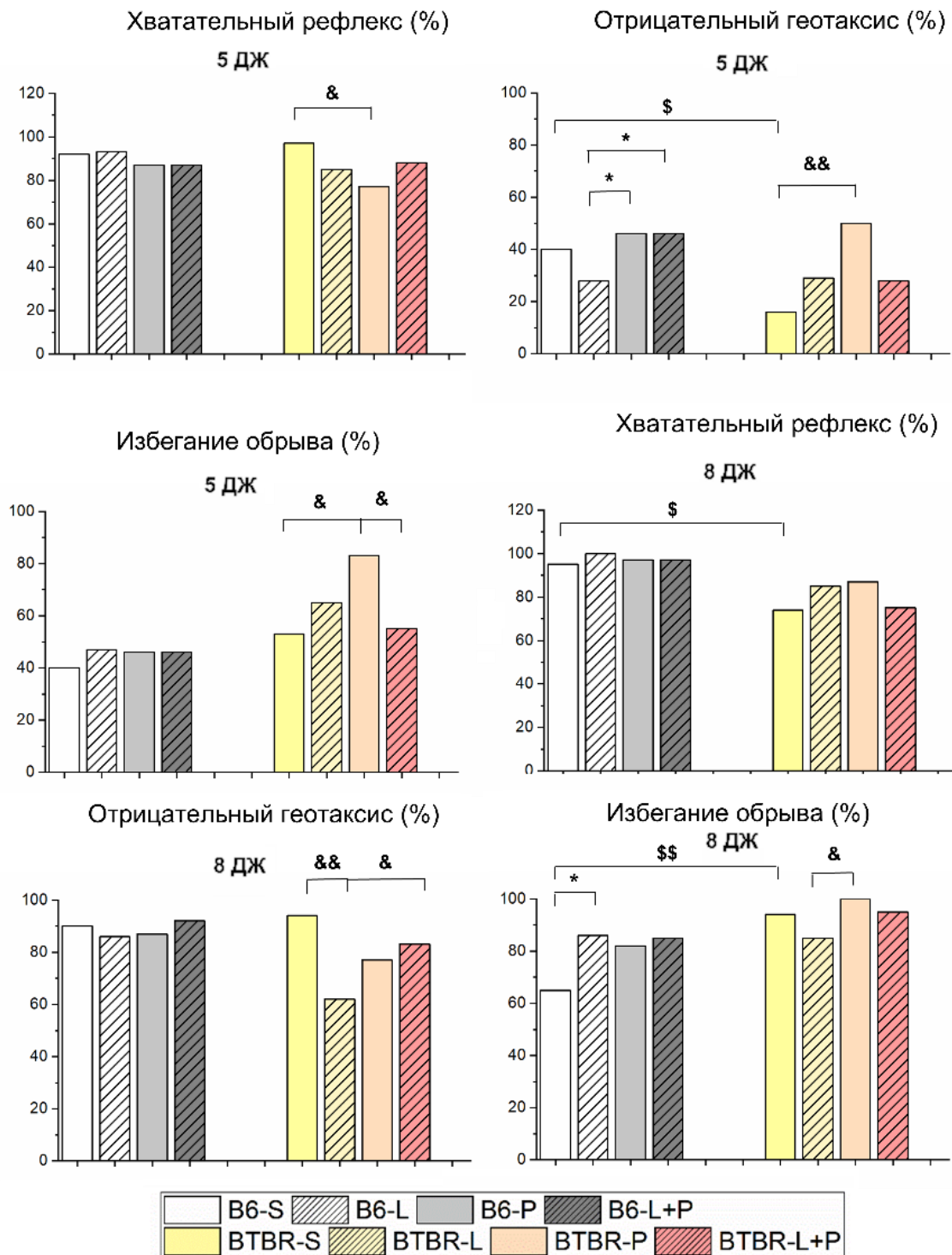
**Рисунок 6.** Уровень экспрессии гена *Aif1* в фронтальной коре, дорсальном и вентральном гиппокампе животных с опытом и без опыта раннего стресса на базальном уровне и после предъявления острого стресса. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM. & -- BTBR-MS vs. BTBR-NC; \$ -- BTBR vs. B6; # -- базальный уровень vs. острый стресс. & p < 0.05; &&& p < 0.001; \$\$\$ p < 0.001; ## p < 0.01; ### p < 0.001

## 2. Эксперимент 2.

### 2.1 Влияние раннего индуцированного воспаления на развитие, индивидуальное и социальное поведение мышей в раннем периоде и стереотипию во взрослом

Для оценки влияния воспалительных агентов на развитие животных (Рис.7) обеих линий мы провели оценку формирования неонатальных рефлексов. Было выявлено, что вирусный миметик ускоряет развитие некоторых рефлексов у мышей BTBR. Кроме того, мы показали, что в норме мыши линии BTBR демонстрируют более медленные темпы развития, чем B6. Способность Poly I:C ускорять неонатальное развитие мышей BTBR может заключаться в предполагаемом свойстве

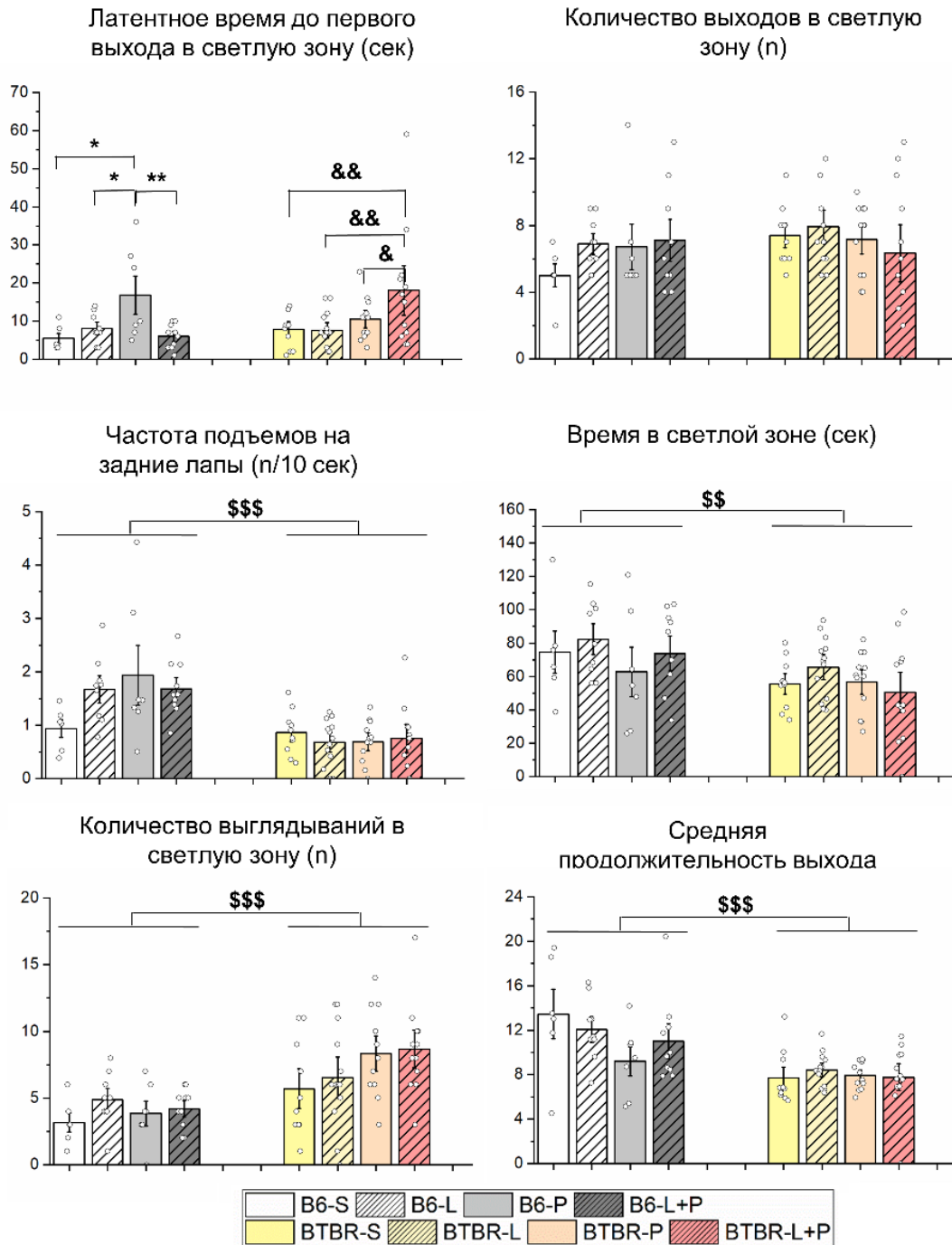
индуцированного воспаления ослаблять врожденное aberrantное функционирование иммунной системы, за счет чего ослаблять и поведенческие нарушения (Gu et al., 2021), если предположить, что отставание мышей этой линии в норме было вызвано наблюдаемым у них нейровоспалением (Careaga et al., 2015).



**Рисунок 7.** Хватательные рефлекс, отрицательный геотаксис и рефлекс избегания обрыва у мышей линий B6 и BTBR. Данные представлены как процент животных, проявляющих рефлекс. \* -- между группами B6; & -- между группами BTBR; \$ -- B6-S vs. BTBR-S. \* p < 0.05; & p < 0.05; && p < 0.01; \$ p < 0.05; \$\$ p < 0.01.

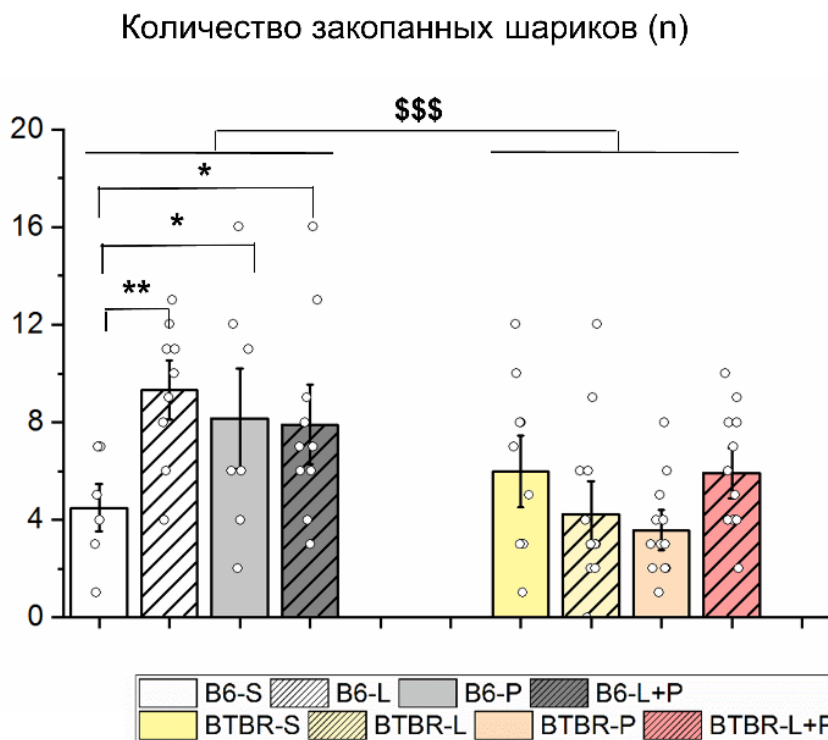
Введение вирусного миметика или комбинации вирусного и бактериального приводило к снижению тревожности у мышей обеих линий в ювенильном и подростковом возрасте и увеличению исследовательской активности у животных B6 в ювенильном периоде (Рис. 8, для ювенильного периода данные не представлены).

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 (Michoropoulos et al., 2017).



**Рисунок 8.** Поведение в тесте «Темная-светлая камера» животных линий B6 и BTBR в подростковом возрасте (на 39 день жизни). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM. Данные представлены \* -- между группами B6; & -- между группами BTBR; \$ - BTBR vs. B6. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; &  $p < 0.05$ ; &&  $p < 0.01$ ; \$\$  $p < 0.01$ ; \$\$\$  $p < 0.001$ .

При анализе стереотипии у животных во взрослом периоде 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.



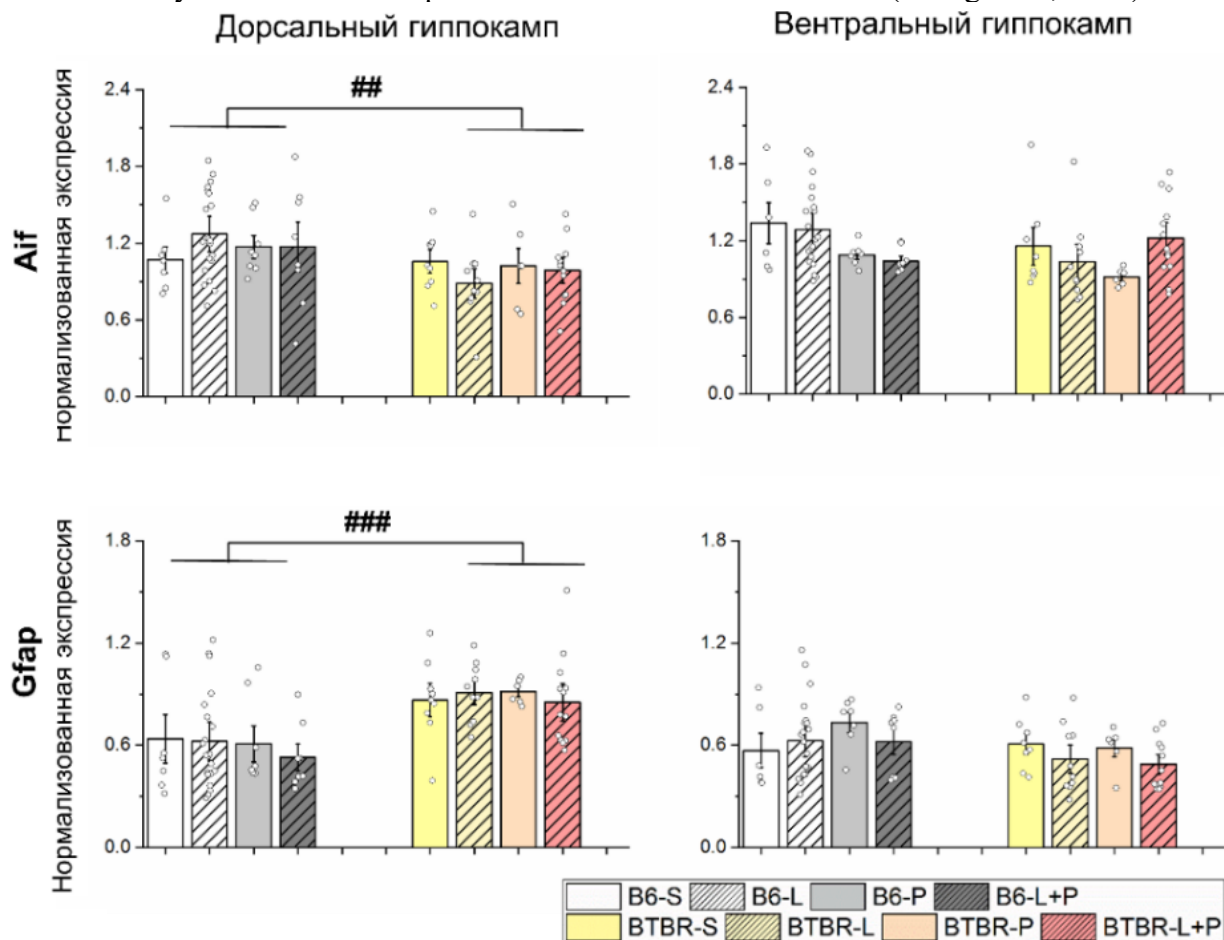
**Рисунок 9.** Общее количество закопанных более чем на 50% шариков в тесте «Закапывание шариков» животных линий B6 и BTBR на 55 день жизни. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM. \* -- между группами B6; \$ -- BTBR vs. B6. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \$\$\$  $p < 0.001$ .

### 2.1 Влияние раннего индуцированного воспаления на периферическое воспаление и экспрессию генов, связанных с активацией микроглии и астроглии

Общий анализ крови, проведенный в трех возрастных точках, выявил преимущественно межлинейные различия с подросткового периода, которые могут свидетельствовать о превалировании адаптивного иммунитета у мышей B6, и врожденного – у BTBR мыши линии BTBR демонстрировали сниженное количество лимфоцитов и лейкоцитов.

При оценке уровня экспрессии генов-маркеров активности микроглии (*Aif1*) и астроглии (*Gfap*) во фронтальной коре и гиппокампе (Рис. 10) 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 была отмечена у животных линии BTBR на эти агенты через 2 и 16 часов с момента введения (Mutovina et al., 2022). Кроме того, в этом эксперименте были обнаружены межлинейные различия в дорсальном гиппокампе: уровень *Aif1* был ниже, а *Gfap* выше у мышей линии BTBR, что не согласуется с работами, которые исследовали данный параметр на животных моделях PAC (Hu et al., 2022). Возможно, в

нашем исследовании сказался возраст исследуемых животных: патологическую активность микроглии связывают с нарушенным социальным поведением, дефицит которого еще не наблюдался в исследуемом возрасте. Обнаруженный повышенный уровень гена *Gfap* согласуется с немногочисленными исследованиями, выявляющих повышенную активность астроглии в животных моделях РАС (Xiong et al., 2023).



**Рисунок 10.** 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. B6. ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые комплексно исследовано влияние двух различных стрессовых факторов – воспаления и стресса в ранний период – на поведение, функционирование ГГНС и иммунные изменения в динамике у самцов 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. Мы обнаружили, что мыши линии BTBR характеризуются повышенной тревожностью и усиленным поведением, связанным с оценкой рисков уже с раннего периода 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 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 линии В6 и увеличивая у линии ВТВР. Было выявлено, что мыши линии В6 демонстрируют более быстрые темпы развития рефлексов в неонатальный период по сравнению с животными ВТВР. При этом индукция воспаления в раннем возрасте вирусным миметиком ускоряет развитие мышей ВТВР, но не В6.

Мы показали, что индукция воспаления 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.

## ВЫВОДЫ

1. Самцы мышей линии ВТВР начинают проявлять аутизм-подобный фенотип уже на 37-й 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 С57В1/6.
2. Самцы мышей линии ВТВР демонстрируют повышенную тревожность уже с раннего периода жизни (на 37-й 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 С57В1/6. Опыт раннего разделения с матерью усиливает реакцию на стресс самцов линии ВТВР, но снижает у самцов линии С57В1/6.
3. Опыт раннего стресса разделения с матерью и индукции воспаления приводит к снижению показателей тревожности у самцов мышей обеих линий на 37-й день жизни, что, вероятно, связано с нарушением оценки рисков животными в данном возрасте.
4. Индукция воспаления в ранний период жизни приводит к нарушению формирования неонатальных рефлексов у самцов линии ВТВР: 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 ВТВР в подростковом возрасте в дорсальном гиппокампе уровень мРНК *Aif1* был выше, а уровень мРНК *Gfap* ниже относительно самцов мышей С57В1/6. При этом опыт раннего стресса изменяет ответ на острый рестрикционный стресс только у самцов мышей ВТВР (на 37-й 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.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science, а также 4 тезиса:

### Статьи:

1. **Ayriyants KA**, Ryabushkina YA, Saponova AA, Ivanchikhina AV, Kolesnikova MM, Bondar NP, Reshetnikov VV. A comparison of stress reactivity between BTBR and C57BL/6J mice: an impact of early-life stress // Exp Brain Res (IF=2.064) – 2023. – Vol. 241(3). – P. 687-698. – doi: 10.1007/s00221-022-06541-1.
2. Mutovina A, **Ayriyants K**, Mezhlumyan E, Ryabushkina Y, Litvinova E, Bondar N, Khantakova J, Reshetnikov V. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice // Int J Mol Sci (IF=5.6). – 2022. – Vol. 23(24). – P. 15577. – doi: 10.3390/ijms232415577.

3. Ryabushkina YA, Shevelev OB, Kisaretova PE, Sozonov NG, **Ayriyants KA**, Bondar NP, Reshetnikov VV. High-resolution MRI data of the brain of C57BL/6J and BTBR mice in three anatomical views // Data in Brief (IF=1.48). – 2021. – Vol. 39. – P. 107619. – doi: 10.1016/j.dib.2021.107619.

4. Reshetnikov V., **Ayriyants K.**, Ryabushkina Yu., Sozonov N., Bondar N. Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early life stress in C57Bl/6 and BTBR mice // Behavioural Brain Research (IF=3.352) – 2021. – Vol. 414. – P. 113489. – doi: 10.1016/j.bbr.2021.113489.

Тезисы:

1. **Айриянц К.А.**, Сапронова А.М., Иванчихина А.А., Бондарь Н.П., Решетников В.В. Влияние опыта раннего постнатального стресса на стресс-реактивность мышей линии BTBR // VIII Молодёжная Школа-конференция, Санкт-Петербург, 2022 г;

2. **Айриянц К.А.**, Межлумян Е.В., Мутовина А.С., Колесникова М.М., Рябушкина Ю.А., Сапронова А.А., Решетников В.В. Влияние введения бактериального и вирусного миметиков на развитие, социальное и индивидуальное поведение мышей линии BTBR // XIX Всероссийская молодёжная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, 2022 г;

3. **Ayriyants K.**, Reshetnikov V., Bondar N., Mutovina A., Kolesnikova M., Muzhlyumyan E., Kisaretova P. Influence of administration of pro-inflammatory agents on development, individual and social behavior of BTBR mice // 13th International Multiconference on “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology”, Новосибирск, 2022;

4. **Айриянц К.А.**, Решетников В.В., Рябушкина Ю.А., Кисаретова П.Е., Бондарь Н.П. Последствия раннего постнатального стресса: изменение реакции на социальный стресс и возрастная динамика уровня тревожности // XVIII Всероссийская молодёжная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, 2021.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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

*c-Fos* – ген, кодирующий белок протоонкоген Fos

*Crh* – ген, кодирующий белок кортикотропин

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

LPS – lipopolysaccharides – липополисахариды

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

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

РАС – расстройства аутистического спектра