

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Красноярский государственный медицинский университет  
им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Панина Юлия Анатольевна  
Клеточно-молекулярные механизмы нейровоспаления при  
экспериментальном аутизме**

**14.03.03 – патологическая физиология**

**03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология**

**Диссертация**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор  
Салмина Алла Борисовна

доктор медицинских наук  
Малиновская Наталия Александровна

Красноярск – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	6
<b>ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	14
1.1 Нейродегенерация и нарушения развития мозга: общие механизмы (роль нейровоспаления) .....	14
1.1.1 Нарушения развития мозга (основные механизмы и проявления) .....	15
1.1.2 Нейродегенерация (основные механизмы и проявления) .....	16
1.1.3 Нейровоспаление (клетки-эффекторы, молекулярные механизмы, гуморальные регуляторы) .....	19
1.2 Современные представления о заболеваниях аутистического спектра .....	25
1.2.1. Патогенез аутизма: признанные теории и нерешенные вопросы. ....	27
1.2.2 Роль нейровоспаления в патогенезе аутизма .....	31
1.3. Современные представления о болезни Альцгеймера .....	36
<b>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	39
2.1.1 Объект исследования .....	39
2.1.2 Создание экспериментальной модели аутизма .....	41
2.1.3 Создание экспериментальной болезни Альцгеймера .....	44
2.2 Фенотипирование животных в модели аутизма .....	46
2.2.1 Осмотр животных на наличие признаков аутизма .....	46
2.2.2 Неврологическая шкала NSS (Neurological Severity Score) .....	47
2.2.3 Оценка состояния неврологических рефлексов и физического развития животных при моделировании аутизма .....	47
2.3 Тесты для оценки когнитивной функции крыс .....	48
2.3.1 Водный лабиринт Морриса .....	48
2.3.2 Тест на распознавание нового объекта .....	49
2.4 Тесты для оценки социального поведения крыс .....	49

2.4.1 3-камерная активность .....	49
2.4.2 Социальный пятипопыточный тест .....	50
2.4.3 Тест с трубой на агрессию .....	51
2.5 Тесты для оценки эмоционального поведения крыс .....	51
2.5.1 Тест открытое поле .....	51
2.5.2 Приподнятый крестообразный лабиринт .....	52
2.6 Определение уровня окситоцина в гомогенатах ткани головного мозга .....	53
2.7 Иммуногистохимическое исследование .....	53
2.8 Детекция апоптоза в ткани головного мозга .....	55
2.9 Статистический анализ результатов .....	56
<b>ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ...</b>	<b>57</b>
3.1 Результаты фенотипирования экспериментальных животных с моделью аутизма.....	57
3.1.1 Результаты теста «Открытое поле» в экспериментальной модели аутизма .....	57
3.1.2 Оценка проявлений аутизма .....	60
3.1.3 Исследование эмоционального поведения животных в вальпроевой модели аутизма .....	61
3.1.4 Исследование неврологических рефлексов, физического развития животных, массы тела и головного мозга при пренатальном введении вальпроевой кислоты .....	64
3.1.5 Социальное распознавание в вальпроевой модели аутизма .....	68
3.1.6 Оценка когнитивных функций при пренатальном нарушении развития головного мозга и в контроле.....	73
3.1.7 Уровень окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и миндалине на 60 и 90 сутки развития при экспериментальном аутизме и в контрольной группе .....	76
3.2 Оценка экспрессии маркеров нейростимуляции, синаптогенеза и апоптоза в ткани головного мозга.....	78

3.2.1 Оценка апоптоза в клетках головного мозга крыс при пренатальном введении вальпроевой кислоты .....	79
3.2.2 Уровень экспрессии интерлейкина-1 $\beta$ .....	83
3.2.3 Уровень экспрессии HMGB1 .....	86
3.2.4 Результаты экспрессии CD157 на клетках микроглии при пренатальном введении вальпроевой кислоты .....	90
3.2.5 Анализ экспрессии CD38 на клетках микроглии при экспериментальном аутизме .....	95
3.2.6 Оценка экспрессии NLRP3 и коэкспрессии NLRP3 с CD11 $\beta$ при пренатальном нарушении развития головного мозга .....	102
3.2.7 Оценка экспрессии PSD95 при экспериментальном аутизме .....	108
3.3 Корреляционный анализ экспрессии клеточных маркеров нейровоспаления при экспериментальном аутизме .....	111
<b>ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>112</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>127</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>128</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>130</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>133</b>
Приложение А Протокол проведения теста NSS .....	156
Приложение Б Тесты для оценки неврологического и физического развития животных .....	158
Приложение В Протокол определения содержания окситоцина в гомогенатах головного мозга .....	159
Приложение Г Протокол проведения иммуногистоцитохимии для парафиновых срезов .....	161
Приложение Д Протокол проведения иммуногистоцитохимии для свободно плавающих срезов .....	163
Приложение Е Протокол детекции апоптоза методом TUNEL .....	164

Приложение Ж Количественные показатели концентрации окситоцина при экспериментальном аутизме и в контроле, пг/мл ...	165
Приложение З Экспрессия и коэкспрессия CD157, CD18 в гиппокампе, коре и базолатеральной миндалине в контрольной и экспериментальной группах .....	166
Приложение И Экспрессия CD38, CD18 и коэкспрессия CD38/CD18 в исследуемых регионах головного мозга в норме и при экспериментальном аутизме .....	169
Приложение К Экспрессия NLRP3, CD11 $\beta$ и коэкспрессия NLRP3/CD11 $\beta$ в исследуемых регионах головного мозга в норме и при пренатальном введении вальпроевой кислоты .....	172
Приложение Л Корреляционный анализ в модели хронической нейродегенерации детского возраста .....	175

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время все большее распространение получают нарушения развития головного мозга, которые имеют свои истоки в эмбриогенезе или раннем детстве, причем неблагоприятные факторы, оказывающие влияние на человека в детстве или юности, могут существенным образом исказить нормальный ход развития мозга и иметь своим результатом формирование патологии многие годы спустя. Нарушения клеточно-молекулярных механизмов развития головного мозга в пренатальном периоде и в периоде раннего детства приводят к выраженным поведенческим нарушениям в социальной (потеря социальной памяти, нарушение социальных связей, агрессия) и несоциальной сфере (нарушения пространственной памяти, трудности с запоминанием, развитие тревожности и депрессии), что имеет своим результатом нарушение социализации и коммуникации человека [13, 76].

Примером такого рода патологии являются расстройства аутистического спектра, включающие нарушения социального взаимодействия, нейропсихического развития, запоминания. Расстройства аутистического спектра представляют собой глобальную социально значимую проблему здравоохранения. Так, в 2012 в мире, в среднем, на 10000 человек приходилось 62 случая аутизма [30, 91]. С начала 80-х годов XX столетия отмечается выраженный рост заболеваемости в развитых странах, что связано как с улучшением методов диагностики [197], так и с влиянием новых, пока не изученных факторов [179]. Например, в США с 1996 по 2007 год число случаев расстройств аутистического спектра увеличилось с 1 до 5 на 1000 детского населения [215]. В настоящее время много исследований направлено на поиск генетических предикторов развития РАС [14, 20], однако, не отрицается роль факторов внешней среды [3], а так же нарушение центральной секреции окситоцина [70], при этом единого мнения о патогенезе аутизма нет, ввиду чего и отсутствует адекватная патогенетическая терапия. Рост заболеваемости, наличие расстройств психики,

требующих постоянного ведения пациента, высокая частота задержки умственного развития у пациентов требуют более глубокого изучения данной проблемы, понимания ее причин, механизмов развития и разработки новых подходов к терапии.

### **Степень разработанности темы исследования**

Важным компонентом патогенеза аутизма может быть нейровоспаление, роль которого в развитии заболеваний аутистического спектра находит все больше экспериментальных и клинических подтверждений, однако по-прежнему остается наименее изученным механизмом нарушений развития головного мозга. Вместе с тем, роль нейровоспаления не оспаривается при других патологических состояниях в центральной нервной системе, в частности, при ишемическом повреждении или нейродегенерации. Более того, появляются единичные данные о некотором сходстве в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и нарушений развития головного мозга, что связывают с особенностями экспрессии амилоида, обмена холестерина, нарушений нейрогенеза [29]. Несомненно, изучение механизмов развития нейровоспаления при аутизме поможет не только идентифицировать новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии этого заболевания, но и расширит существующие представления о развитии головного мозга, патогенезе нейродегенерации.

В целом, изучение механизмов нейровоспаления остается актуальным вопросом патологической физиологии, клеточной биологии, нейробиологии, неврологии и психиатрии.

### **Цель исследования**

Выявить клеточно-молекулярные механизмы нарушений сложных форм поведения и памяти при экспериментальном аутизме.

### **Задачи исследования:**

1. Провести фенотипирование животных с экспериментальной моделью аутизма по параметрам сложных форм поведения, запоминания, уровню окситоцина в отдельных регионах головного мозга.

2. Изучить особенности развития апоптоза, экспрессии молекул-маркеров нейровоспаления (CD11 $\beta$ , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, IL-1 $\beta$ ) и синаптогенеза (PSD95) в аффектированных регионах головного мозга (гиппокамп, кора, миндалина) при экспериментальном аутизме и в контроле на 5, 15, 25, 60 и 90 сутки развития; сравнить полученные данные с экспрессией NLRP3, CD38, CD157 и IL-1 $\beta$  при нейродегенерации (экспериментальная болезнь Альцгеймера).

3. Выявить взаимосвязи между экспрессией NLRP3, HMGB1, IL-1 $\beta$  при экспериментальном аутизме во взаимосвязи с признаками активации микроглии, развитием нейроповеденческих расстройств; дополнить существующие представления о роли нейровоспаления в развитии головного мозга в (пато)физиологических условиях.

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые изучены особенности экспрессии молекул-маркеров нейровоспаления (CD11 $\beta$ , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, IL-1 $\beta$ ) синаптогенеза (PSD95) в раннем онтогенезе при экспериментальном аутизме в сравнении с физиологическим развитием головного мозга и при нейродегенерации, установлены регион-специфические изменения в головном мозге при развитии экспериментального аутизма, в том числе в сравнении с моделью нейровоспаления при хронической нейродегенерации.

2. Впервые продемонстрировано нарушение центральной секреции окситоцина у животных при экспериментальном аутизме, индуцированном введением вальпроевой кислоты, преимущественно в гипоталамусе и гипофизе на ранних сроках развития патологии, в миндалине – в отдаленном периоде.

3. Впервые представлены данные о возможности HMGB1-индуцируемого формирования инфламмасом NLRP3 и продукции IL-1 $\beta$  в ткани головного мозга при экспериментальном аутизме, а также в физиологических условиях и при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

4. Впервые обнаружены новые доказательства роли активированных клеток микроглии в патогенезе экспериментального аутизма, установлено, что для



животных с аутизмом характерен реактивный регион-специфический микроглиоз, характер изменения которого совпадает с изменением секреции интерлейкина  $1\beta$  и может быть зарегистрирован по изменению коэкспрессии CD157/CD11 $\beta$ /CD18 в клетках микроглии.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы состоит в выявлении новых клеточно-молекулярных механизмов нейровоспаления при экспериментальном аутизме. Получена новая информация о механизмах патогенеза хронической нейродегенерации детского возраста: экспрессия НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов (CD157, CD38), экспрессия маркеров нейровоспаления (CD11 $\beta$ , CD18, HMGB1, NLRP3, интерлейкина-1 $\beta$ ), особенности развития апоптоза, синаптогенеза (PSD95), снижение уровня нейропептида окситоцина в гипоталамо-гипофизарной и лимбической системе. Полученные экспериментальные результаты расширяют существующие взгляды на роль нейровоспаления в нормальном развитии головного мозга и при нарушениях его формирования, характерных для заболеваний аутистического спектра.

### **Практическая значимость и внедрение результатов**

Экспериментальное доказательство того, что развитие нейровоспаления характерно для животных с экспериментальным аутизмом, индуцированным пренатальным введением вальпроевой кислоты, а выраженность воспаления определяется характером активации клеток микроглии на самых ранних этапах постнатального развития животных, что сопровождается нарушением процессов апоптоза, синаптогенеза и соответствует – в более поздние периоды онтогенеза – нарастанию признаков нарушения социального взаимодействия, доминирования агрессии, тревожности и стереотипий, найдет применение при разработке патогенетически-обоснованной стратегии диагностики и терапии аутизма.

Полученные результаты будут представлять значительный интерес для специалистов в области нейрофармакологии, нейробиологии, клеточной биологии, патологической физиологии, неврологии и психиатрии.

## **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа носит экспериментальный характер. Объектом исследования были белые крысы линии Wistar. С целью выполнения поставленных задач было проведено моделирование экспериментального аутизма и экспериментальной нейродгенерации альцгеймеровского типа, поведенческое фенотипирование животных и оценка сложных форм поведения и когнитивных функций, клеточно-биологические методы исследования (иммуногистохимия, TUNEL, флуоресцентная, конфокальная микроскопия, ИФА) на полученных срезах и гомогенатах головного мозга; значимость полученной информации подтверждена методами статистического анализа.

Все исследования выполнены с разрешения Биоэтической комиссии Локального этического комитета ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ (протокол № 20 от 7 октября 2013 года).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При экспериментальном аутизме в динамике с 5 по 90 сутки развития регистрируется увеличение экспрессии HMGB1, NLRP3, IL-1 $\beta$  в ткани головного мозга, что характеризует развитие нейровоспаления и соответствует характеру нарушения сложных форм поведения и запоминания. Нарушение социального поведения соответствует снижению уровня окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и в миндалине головного мозга к 90 суткам постнатального развития при экспериментальном аутизме.

2. Развитие нейровоспаления в головном мозге при экспериментальном аутизме сопровождается изменением экспрессии НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов (CD38, CD157) в CD11 $\beta$ +CD18+-клетках микроглии, что характеризует реактивный глиоз. Указанные изменения носят регион-специфичный характер и по своей выраженности не уступают изменениям, характерным для нейродегенерации.

3. Отдаленный период развития (60 и 90 сутки постнатального периода) характеризуются появлением у животных с экспериментальным аутизмом

усиления тревожности, расстройства социального распознавания, увеличения агрессивности, усугубления стереотипного поведения, чему предшествует активация микроглии, нарушение синаптогенеза в коре, гиппокампе и миндалине, пик проявления неврологической симптоматики приходится на интенсификацию синаптогенеза в миндалине.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Все научные положения и выводы были обоснованы с помощью системного анализа поставленных вопросов, современных методов исследования в нейробиологии, достоверной выборкой исследуемых животных, большим объемом фактического материала, проанализированных статистически.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 81-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины»/Baikal Russian scientific-practical conference of young scientists and students with international participation "Actual problems of modern medicine, 2014 г; на международном конгрессе по нейронаукам, г. Красноярск, 2014 г., на международном саммите (Университет Канадзавы, Япония), 2014 г.; на научно-практической конференции «Расстройства аутистического спектра и другие психические нарушения детского возраста. Современные подходы и перспективы межведомственного взаимодействия», г.Тула, 1-2 октября 2015 г; ); на VI Международном Молодёжном Медицинском Конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015», г.Санкт-Петербург, 2-4 декабря 2015 г.; научных семинарах научно-образовательного центра «Трансляционная медицина», НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ (Красноярск, 2013-2015 г).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций

на соискание ученой степени кандидата наук, 2 – в зарубежных изданиях, в том числе 1 – в журнале, индексируемом в базе данных Web of Science.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 48 рисунками, 18 таблицами и 11 приложениями. Библиографический список состоит из 220 источников (20 отечественных и 200 зарубежных).

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность к.б.н., доценту Лопатиной О.Л. за помощь в постановке ИФА для определения уровня окситоцина, к.м.н. Комлевой Ю.К., к.фарм.н., доценту Я.В. Гориной за помощь в постановке модели болезни Альцгеймера и исследовании механизмов нейровоспаления при этой патологии, к.б.н. Пожиленковой Е.А., исполнительному директору НИИ молекулярной медицины и патобиохимии за помощь в организации экспериментальной работы, д.м.н., проф., зав.кафедрой анатомии и гистологии человека Медведевой Н.Н. и к.м.н., доц.кафедры анатомии и гистологии человека Жукову Е.Л. за приготовление гистологических срезов головного мозга, клиническому ординатору кафедры патологической анатомии им. проф. П.Г.Подзолкова с курсом ПО Рябоконе Р.В, студентам КрасГМУ Бурхановой В.А., Тереховой К.О., Ултургашевой Д.А., Гаджиевой А.Э., Гомоновой Ю.А. за помощь в тестировании животных. Автор выражает благодарность лаборанту Красовских О.П. за помощь в уходе за животными.

Работа выполнена при поддержке гранта Совета по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-1172.2014.7, 2014-2015 гг.), целевого финансирования Министерства здравоохранения РФ (2014-2015 гг.).

### **Личный вклад автора**

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе Паниной Ю.А., получены самостоятельно. Диссертация выполнена на базе кафедры

биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии и НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ. Автором выполнено лично: определение цели, разработка задач исследования и плана их выполнения; планирование экспериментальной работы; составление протоколов исследований; отбор животных для постановки модели; моделирование аутизма у животных; отслеживание рождения потомства; оценка физического и нейropsychического развития крыс; поведенческое фенотипирование; проведение иммуногистохимического исследования; детекция апоптоза в ткани головного мозга; пробоподготовка гомогенатов ткани для определения уровня окситоцина; статистическая обработка материала исследований и интерпретация результатов. Результаты изучения механизмов нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера получены совместно с к.м.н. Ю.К. Комлевой, результаты изучения уровня окситоцина в ткани головного мозга получены совместно с к.б.н. О.Л. Лопатиной. Автором самостоятельно выполнены написание текста диссертации, автореферата, подготовка научных публикаций по теме работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Нейродегенерация и нарушения развития мозга: общие механизмы (роль нейровоспаления)

В течение нескольких десятилетий патогенез нейродегенеративных расстройств и нарушений развития головного мозга рассматривался обособленно друг от друга. Вместе с тем, накапливаются экспериментальные и клинические доказательства того, что нарушения развития головного мозга (в том числе обусловленные действием повреждающих факторов на ранних этапах онтогенеза), а также нейродегенерация, развивающаяся в отдаленные периоды онтогенеза, имеют общие механизмы развития, что позволяет ряду авторов считать нарушения развития головного мозга «частным проявлением» нейродегенерации, инициированной в пренатальном или перинатальном периодах развития [93, 166], чему в еще большей степени способствовали последние достижения в области геномики, протеомики и коннектомики [28, 82, 161].

К ключевым клеточно-молекулярным механизмам нарушения развития или повреждения мозга относятся: рецепторные и пострецепторные нарушения внутриклеточной сигнализации и межклеточной коммуникации; изменение активности и экспрессии ионных каналов плазматической мембраны, митохондриальных мембран, приводящее к быстрым или долгосрочным нарушениям электровозбудимости нейронов, а также митохондриальной дисфункции; развитие апоптоза вследствие дизрегуляции клеточных сигнальных систем или активации специфических механизмов, приводящих к реализации программы клеточной гибели; нарушение процессов нейрогенеза, миграции и дифференцировки клеток; нарушение процессов формирования и элиминации синапсов; дизрегуляция нейрон-глиальных взаимодействий, ассоциированное с нарушением нейрон-астроглиального метаболического сопряжения,

глиоэпителиального контроля локального кровотока в активных зонах мозга и изменением активности микроглиальных клеток, определяющих развитие нейровоспаления [13]. Именно нейровоспаление является одним из важных общих механизмов нарушений развития головного мозга и нейродегенерации.

### **1.1.1 Нарушения развития мозга (основные механизмы и проявления)**

Материнский стресс во время беременности может иметь глубокие и длительные последствия на развитие потомства. В действительности, многие заболевания, проявляющиеся в детском, подростковом и даже взрослом периоде жизни, имеют пренатальное происхождение [38]. Внутриутробное влияние материнского стресса может нарушить нормальное развитие мозга и, следовательно, привести к нейроповеденческим дефектам [13]. Нормальный ответ на стресс имеет эффект сохранения физиологического гомеостаза, что обычно приводит к активации надпочечников и выбросу кортизола [12]. Повторный или хронический стресс обуславливает хроническое увеличение уровня кортизола в плазме крови, который, в свою очередь, может привести плохому психическому и моторному развитию новорожденных и определяет детский темперамент [60], повышенный риск развития синдрома дефицита внимания в детском возрасте [131], шизофрении и депрессии у потомства [170]. Исследования на животных показали, что пренатальный стресс связан с сокращением в гиппокампе уровня важного маркера нейропластичности, нейротрофического фактора мозга (BDNF), а также с социально-поведенческими изменениями у зрелого потомства. Это свидетельствует о том, что пренатальный стресс может действовать через изменения развития гиппокампа как механизм программирования поведения в дальнейшей жизни [64].

Помимо стресса и депрессии матери, на развивающийся мозг оказывают влияние и препараты, принимаемые во время беременности. Поскольку зачастую депрессия требует фармакотерапевтической коррекции, встает вопрос о потенциальном эффекте антидепрессантов на развитие мозга ребенка.

Воздействие на центральную нервную систему (ЦНС) тератогенными веществами теоретически может привести к грубым порокам развития или изменениям в архитектуре мозга. Есть сведения о связи между приемом матерью селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) во время беременности и пороков развития ЦНС плода, но результаты не согласуются по населению [207]. Еще более спорным утверждением является способность антидепрессантов привести к изменениям, которые могут быть обнаружены спустя годы после воздействия [168]. Недавние исследования обнаружили связь между пренатальным воздействием СИОЗС и РАС, но это может быть недостоверным, в частности, из-за материнской депрессии [32].

### **1.1.2 Нейродегенерация (основные механизмы и проявления)**

Нейродегенеративные заболевания включают в себя большую группу приводящих к летальному исходу расстройств, включая болезнь Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз (БАС) и прионные заболевания [135].

Нейродегенерация является основой широкого спектра нейродегенеративных заболеваний, при которых роль нейронов и глиальных клеток является доказанной. В последнее время появляется все больше доказательств об участии некоторых молекулярных механизмов в ее патогенезе. К примеру, имеются данные об участии в развитии нейровоспаления пуринергической сигнализации [45, 132, 187].

Выживание нейронов при нейродегенерации зависит от нескольких факторов: высокоэнергетический обмен, поступление питательных веществ, проникновение токсичных веществ, окислительно-восстановительный потенциал среды, целостность гематоэнцефалического барьера, подавление запрограммированных путей клеточной гибели и клеточного цикла. Нарушения мозгового гомеостаза приводят к острым или хроническим изменениям, которые, в конечном итоге, могут привести к гибели нейронов с последующим нарушением



неврологических функций [202].

Гибель нейронов происходит в несколько этапов, имеющих разный уровень регуляции. Некроз – наименее регулируемая форма клеточной гибели, которая происходит в условиях крайнего стресса, зачастую повреждая соседние ткани. Морфологически некроз нейрона, как и некроз любой другой клетки, характеризуется отеком органелл и цитоплазмы, нарушением целостности плазматической мембраны и высвобождением внутриклеточного содержимого во внеклеточную среду. Внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  является главным индуктором некроза и одной из основных движущих сил этого механизма. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  повышается при активации ионных каналов, которые приводят к проникновению внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , с последующей быстрой мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из плазматического ретикулума и митохондрий. Изменения концентрации кальция запускают клеточные эффекторы (киназы, ионные каналы, сократительные белки) [46]. Это является ключевым компонентом эксайтотоксичности. перевозбуждение NMDA-и кальций-проницаемых AMPA-рецепторов приводит к входу кальция непосредственно через эти каналы. Кальций активирует калпаины, которые расщепляют белки цитоскелета, мембранные рецепторы и переносчики. Калпаины экспрессируются в большом количестве в различных регионах ЦНС, локализуются в цитоплазме и ядре нейронов, наиболее распространенными являются калпаины 1 и 2 [10, 156, 157, 220]. Калпаины участвуют в реализации многих клеточных функций, хроническое ингибирование их выработки ухудшает память на новые объекты и пространственную память [156]. Доказана роль калпаинов в развитии инсульта [110].

Апоптоз – запрограммированная гибель клеток, необходимая для развития ЦНС. В отличие от патологического некроза, при апоптозе не происходит набухания клеток, разрыва цитоплазматической мембраны, развития воспалительной реакции. Вместо этого, мембрана апоптотических клеток подвергается блеббингу, происходит концентрация и деградация содержимого ядра, переупаковка клеточных органелл в везикулы, а затем их деградация [53].

Апоптоз, как правило, происходит в пролиферативных зонах головного мозга: коре, вентрикулярной зоне, где радиальные глиальные предшественники митотически активны [153], субвентрикулярной зоне, где близко проходят пути миграции новых нейронов из зон нейрогенеза [158].

Известно еще как минимум два пути гибели нервных клеток при нейродегенерации, относящиеся к формам патологической клеточной смерти: аутофагия и некроптоз. Аутофагия играет важную роль в ликвидации компонентов клеточных отходов, возобновлении внутриклеточных белков и предотвращает наращивание избыточного или «бракованного» материала в клетке. Ее наличие важно для поддержания гомеостаза в клетках, особенно в постмитотических нейронах, которые без достаточной аутофагии начинают накапливать белковые агрегаты, теряя свои функции. Многие нейродегенеративные заболевания связаны с дефектом аутофагии, как в сторону ее усиления, так и торможения [147].

Доказана патогенетическая роль ослабления аутофагии в таких заболеваниях, как боковой амиотрофический склероз [22], болезнь Паркинсона [200], болезнь Альцгеймера [142], болезнь Гентингтона [126], расстройства аутистического спектра [121].

Основным препятствием для восстановления нервной ткани является репаративная способность поврежденных нейронов, несмотря на то, что мозг новорожденных имеет более высокую способность для восстановления, нежели мозг взрослого человека. Нервные стволовые клетки (предшественники) активно участвуют в регенерации после повреждения [155]. Появляются сообщения, что активация стволовых клеток и интеграция новообразованных нейронов могут применяться для нейрорегенерации в поврежденном мозге [128].

Белок постсинаптической плотности 95 (PSD95), как известно, способствует созреванию синапсов и оказывает большое влияние на синаптическую стабильность, прочность, пластичность. Избыточная экспрессия мутантного кортактина, имитируя деацетилированный белок, уменьшает кластеризацию PSD95, в то время как мутантная форма, которая имитирует ацетилированную

форму, может уберечь от снижения кластеризацию PSD95, опосредованную нокаутom кортактина [172]. Кроме того, BDNF способствует увеличению PSD95 в дендритных шипиках [218].

### **1.1.3 Нейровоспаление (клетки-эффекторы, молекулярные механизмы, гуморальные регуляторы)**

Нейродегенерация, прогрессирующая дисфункция и потеря нейронов ЦНС, является основной причиной когнитивных и двигательных расстройств. Новые данные указывают на роль нейровоспаления в патофизиологии, начиная с глии, развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, инсульт и психоневрологические расстройства (к примеру, аутизм). Нейровоспаление является относительно новой областью исследований, посвященных функции и регуляции клеточного иммунитета в центральной нервной системе. Воспалительный ответ включает в себя многочисленные типы клеток (тромбоциты, нейтрофилы, макрофаги, фибробласты, эндотелиальные клетки, нервные клетки, и лимфоциты), взаимодействующих друг с другом с целью устранения причины повреждения, изоляции инфекционных агентов и/или отделения поврежденной ткани от «нетронутой», а затем – для восстановления тканей и нормальной физиологической функции [42].

Было установлено, что существует связь между иммунной системой и центральной нервной системой (ЦНС). Микроглия – основной тип иммунных клеток головного мозга, играющих решающую роль в «иммунной системе» ЦНС. В спокойном состоянии микроглия защищает нервную систему, действуя в качестве поглотителей мусора, патогенных микроорганизмов и регуляции врожденного и адаптивного иммунных ответов. Патологические состояния внутри нервной системы запускают активацию микроглии, что вызывает высвобождение провоспалительных факторов. В патологических условиях активированная микроглия выступает посредником между повреждением и

гибелью нейронов через продукцию провоспалительных факторов, таких как цитокины и хемокины, глутамат и активные формы кислорода, мобилизует адаптивный иммунный ответ и клеточной хемотаксис, что приводит к трансэндотелиальной миграции иммунных клеток. Хотя некоторые воспалительные стимулы вызывают благоприятные последствия (например, фагоцитоз апоптотических клеток), и зачастую воспаление связано с процессами восстановления тканей, неконтролируемое воспаление может привести к продукции нейротоксических факторов, которые усиливают патологические состояния. Цитокины, выделившиеся из некротизированных нейронов, вызывают дальнейшую активацию микроглии и астроцитов [72].

Клетки микроглии играют важную роль в ответе на инфекцию в ЦНС, но чрезмерная стимуляция иммунного ответа может ускорить повреждение нейронов, что показано при нейродегенеративных заболеваниях человека, где наблюдается пролиферация микроглии и активация запуска и распространения нейровоспаления при нейрон-глиальных взаимодействиях (между нейронами, клетками глии и иммунной системы) [23]. Глиальные клетки развиваются и мигрируют в соответствующие зоны в начале эмбриогенеза. К сожалению, нейровоспаление не всегда играет защитную роль. Хронические повреждения, такие как некупированная инфекция или частые травмы, изменения обмена веществ, увеличение агрегации белков, могут нивелировать позитивный эффект нейровоспаления и привести к нейродегенерации [74].

Активации микроглии может происходить по двум различным типам: классическому (M1) и альтернативному (M2). При M1 активации клетки микроглии могут стать гиперразветвленными или амебоидными/фагоцитарными и могут синтезировать провоспалительные молекулы (интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (IL-6), супероксид-анион радикалы, глутамат, оксид азота (NO)) и в конечном счете очищать нервную систему от инфекций и осуществлять репарацию тканей. Альтернативная M2 активация может быть вызвана цитокинами IL-4, IL-13 или IL-25. Она связана с выделением противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10,

инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), трансформирующий фактор роста В (TGF-В), нейротрофические факторы, которые способствуют заживлению и ограничивают повреждение нейронов [43]. Характер и величина повреждения могут повлиять на развитие этих фенотипов микроглии. В дополнение к указанной фенотипической классификации, существует классификация по степени активации микроглии (от стадии покоя, состояния «боеготовности», самонаведения, фагоцитарного этапа и, наконец, непосредственно активации, которая отличается от других стадий по морфологическим признакам и уровню цитокинов и секретируемых факторов роста) [152]. Выявление активированной микроглии в патологическом состоянии не позволяет в полной мере понять воспалительный процесс. Только путем определения фенотипа микроглии можно определить ее роль в цитотоксичности и/или нейропротекции [139].

При взаимодействии макрофагов с патогенами играют роль Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые участвуют в распознавании патогенов для получения иммунологически соответствующих ответов [191]. Провоспалительные цитокины играют ключевую роль в их взаимодействии. При воспалительном ответе вырабатываются такие провоспалительные цитокины, как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-6. Глия и микроглия являются важным источником медиаторов воспаления, играя ключевую роль в расстройствах ЦНС. Тем не менее, избыточная продукция цитокинов («цитокиновый шторм») иммунными клетками может быть фатальной [42].

В выработке провоспалительных медиаторов играет роль HMGB1. HMGB1 – high mobility group box 1, амфотерин, белок из группы ядерных негистоновых белков. HMGB1 широко экспрессируется на клетках ЦНС, является весьма распространенным белком, который действует в качестве внеклеточного сигнала при активной секреции иммунными клетками или пассивно выделяется из мертвых, погибающих и поврежденных клеток. И внутриклеточный, и внеклеточный HMGB1 играет основную роль в регуляции клеточного ответа на стресс. Целенаправленное перемещение, высвобождение и действие HMGB1 может ограничить воспаление и уменьшить повреждение тканей при

инфекционном и асептическом воспалении. Изучено, что окислительный стресс является одним из центральных регуляторов действия HMGB1 при воспалении и клеточной гибели [219].

Внеклеточный белок HMGB1 активирует врожденный иммунный ответ путем «привлечения» в очаг повреждения воспалительных, гладкомышечных клеток, мезангиобластов, стволовых клеток. HMGB1 является иммуноадьювантом активации или подавления Т-клеток, дендритных и эндотелиальных клеток. Активированные иммунные (макрофаги, моноциты, дендритные клетки) и эндотелиальные клетки также секретируют HMGB1, который, в свою очередь, по принципу положительной обратной связи, приводит к высвобождению дополнительных цитокинов и хемокинов с вовлечением нескольких типов рецепторов. Таким образом, HMGB1 поддерживает воспаление в условиях стресса. Интересно, что внеклеточный HMGB1 обладает антибактериальным эффектом, подавляя рост клеток и их митотическую активность. Эта внеклеточная активность не только опосредуется рецепторами, но и окислительно-восстановительным состоянием и структурой HMGB1 [194]. Внеклеточный HMGB1 вызывает воспалительную реакцию при ишемической реперфузии, действуя непосредственно на образ-распознающие рецепторы, в том числе на Toll-подобные рецепторы (TLR) 2 и 4 и на рецепторы для конечных продуктов гликирования (RAGEs) [96].

HMGB1 высвобождается из клеток с помощью двух основных механизмов: первый – его активная секреция иммунокомпетентными клетками, второй – пассивное высвобождение при некрозе или из поврежденных клеток, когда цитоплазматическое содержимое рассеивается во внеклеточном пространстве [101, 188]. В некротических клетках HMGB1 отделяется от хроматина и попадает в цитоплазму, а затем высвобождается из клеток, вызывая провоспалительный ответ. В отличие от некроза, при апоптозе или запрограммированной клеточной гибели (к примеру, при эмбриональном развитии) он остается в связанном виде с хроматином, не вызывает провоспалительный ответ и не распознается иммунными клетками [180]. HMGB1 также может экспрессироваться на

иммунных клетках в условиях, не связанных с некрозом. В ответ на провоспалительные стимулы (к примеру, на липополисахарид), HMGB1 перемещается из ядра к клеточной мембране, действуя как молекула внеклеточной сигнализации, для индукции и модуляции различных провоспалительных процессов [111].

В цитоплазме клеток HMGB1 взаимодействует с множеством белков, участвующих в аутофагии [78], опухолевом росте, и, возможно, нетрадиционном секреторном пути [29]. Ингибирование экспрессии HMGB1 существенно снижает воспалительную реакцию, повреждение тканей и смерть у животных. Важность HMGB1 как провоспалительного цитокина было доказано при многих заболеваниях. HMGB1 приводит к активации NLRP3 и каспазы-8, регулирует активацию NLRP3 и созревание ИЛ-1 NF-κB-зависимым образом. Комплекс HMGB1/каспаза-8 способствует активации NF-κB, который впоследствии индуцирует выработку ИЛ-1 [100]. Интересно, что формирование NLRP3 инфламмасом и активация каспазы-1 участвует в качестве регуляторного механизма высвобождения HMGB1 [107], вероятнее всего, по принципу обратной связи. Таким образом, HMGB1 может быть вовлечен во многие клеточные процессы, способствуя межбелковым взаимодействиям [99], развитию нейровоспаления и клеточной гибели.

NLRP3 (также известен как Nalp3, криопирин, CIAS1, PYPAF1 и CLR1.1) является наиболее изученной инфламмасомой и активируется химически и структурно разнообразными стимулами [165]. Существует ряд механизмов, играющих роль в активации NLRP3-инфламмасом, но прямых лигандов для NLRP3 до сих пор не найдено. Образование пор является общим шагом активации NLRP3, при действии разнообразных стимулов: различных бактериальных пора-образующих токсинов, АТФ через паннексин-1. Нарушение целостности клеточной мембраны или высвобождение эндогенных молекул распознается NLRP3. После активации, члены семьи NLR (NLRP 1, NLRP3 и NLRC4) способны образовывать мультибелковые комплексы, называемые инфламмасомами. Инфламмасома служит платформой для активизации цистеиновой каспазы-1.

Активная каспаза-1 участвует в расщеплении про-цитокинов IL-1 и IL-18 до их активных, секретлируемых форм. NLRP3 инфламмосома активируется в ответ на различные сигналы, которые указывают на повреждение. Нарушение регуляции активации NLRP3 связано с наследственными и приобретенными воспалительными заболеваниями [119].

Кроме лигандов RAGE (HMGB1), инфламмосом NLRP3 и секретлируемого ими провоспалительного цитокина ИЛ-1, в патогенезе нейровоспаления и межклеточных также играет роль комплекс MAC-1.

Комплекс MAC-1 (CD11b/CD18) – молекула межклеточного взаимодействия, участвующая в соединении разных молекул и экспрессирующаяся на клетках, способных к фагоцитозу. Комплекс MAC-1 способен активировать запуск реакций нейровоспаления, окислительного стресса, может выполнять функцию моделирования клеточного ответа в зависимости от воздействия про- или противовоспалительных цитокинов. Не исключается роль повышенной экспрессии CD11b/CD18 в развитии нейродегенерации за счет взаимодействия между микроглия-индуцированного окислительным стрессом, процессом нейровоспаления и микроглиозом [98].

Его отдельная субъединица ( $\beta 2$  интегрин, CD18) используется в качестве маркера макрофагов/микроглии.  $\beta 2$  интегрин - трансмембранные гликопротеины, состоящие из переменной субъединицы (AL, AM или AX) и консервативной  $\beta 2$  субъединицы, которые опосредуют межклеточные взаимодействия (взаимодействие как соседних клеток между собой, так и клеток с внеклеточным матриксом). В ЦНС млекопитающих они экспрессируются лейкоцитами, в том числе периваскулярными макрофагами и микроглией [136].

Еще одним молекулярным механизмом, играющим роль в нейровоспалении при нейродегенерации, являются белки из семейства НАД-гликогидролаз (АДФ-рибозилциклаз): CD38 и CD157. Обе молекулы имеют в структуре 36% одинаковой последовательности аминокислот, служат как НАД<sup>+</sup>-метаболизирующие ферменты и сигнальные молекулы, доказана их роль в поляризации, миграции и диапедезе человеческих гранулоцитов при воспалении.



CD157 (Bone Marrow Stromal Cell Antigen-1) - гликозилфосфатидинозитол-связанный гликопротеид из семейства АДФ-рибозилциклаз, обладающий как АДФ-рибозилциклазной, так и НАД<sup>+</sup>-гликогидролазной активностью [77]. CD157 играет различные роли в гуморальных иммунных реакциях, в миграции нейтрофилов и поддержании гемопоэтических стволовых клеток [34].

Выявлено, что на фагоцитах CD157 является участником сигнальных путей для их адгезии и миграции. В комплексе с  $\beta$ 2-интегринами CD157 может взаимодействовать с молекулой межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1, что приводит к атаке фагоцитов очага воспаления путем трансэндотелиальной миграции [174]; присоединение CD157 подавляет интегрин-зависимую адгезию нейтрофилов к фибриногену; CD157 также способен к формированию комплексов с CD11 $\beta$ /CD18, участвуя при этом в передаче сигналов [77, 206].

Таким образом, в патогенезе нейровоспаления при нейродегенерации могут играть роль как клеточные (микроглия, макрофаги и другие клетки иммунного ответа, их взаимодействия с нейронами и клетками глии, изменения клеточной гибели, нейро- и синаптогенеза), так и молекулярные механизмы (экспрессия на микроглии молекул-маркеров межклеточных взаимодействий и нейровоспаления, секреция провоспалительных цитокинов).

## **1.2. Современные представления о заболеваниях аутистического спектра**

Аутизм – нарушение развития нервной системы, которое характеризуется изменением социального взаимодействия и общения, а также ограниченным и повторяющимся (стереотипным) поведением. Данные симптомы, как правило, начинают проявляться у детей до трехлетнего возраста [9, 92]. Социальное поведение, как правило, связано с отклонением от социальных взаимодействий, характеризуется отсутствием социальной эмоциональной взаимности и снижением зрительного контакта [35]. Кроме вышеуказанных признаков, для этой патологии в ряде случаев характерны следующие симптомы: повышенный

уровень тревожности, задержка умственного развития, дефицит внимания, гиперактивность, отклонения в пищевом поведении, недержание мочи, диссомнические расстройства [87, 204]. Симптомы могут варьировать от относительно легкой степени выраженности до крайне тяжелой. У молодежи с расстройствами аутистического спектра отмечаются клинически значимые симптомы тревоги, связанные с повышенной раздражительностью, нарушением сна, деструктивным поведением, невнимательностью и проблемами со здоровьем (например, частые желудочно-кишечные расстройства), что значительно ухудшает качество жизни [56]. До недавнего времени считалось, что 75% детей с аутизмом характеризуются умственной отсталостью. Однако, более современные данные свидетельствуют о том, что менее половины из страдающих этими расстройствами имеют существенный дефицит познавательной деятельности [197]. РАС вариабельны в плане когнитивных проявлений, которые могут ранжироваться от неговорящего ребенка с умственной отсталостью до студента с IQ выше среднего с неадекватными социальными навыками [196].

Сложный характер этих нарушений, в сочетании с отсутствием биологических маркеров для диагностики и изменений в клинической картине, создает проблемы мониторинга распространенности РАС. Заболеваемость расстройствами аутистического спектра за последние годы выросла: если на начало 1980-х годов выявлялось 5 случаев на 10000, то сейчас РАС страдает один из 68 [171]. Такое повышение встречаемости может быть связано с сочетанием таких факторов, как изменение диагностических критериев, повышение осведомленности родителей и врачей и/или реальным увеличением заболеваемости [54]. Соотношение по полу при аутизме составляет 4,2:1 (мальчики:девочки) [84].

Термин «аутизм» довольно многозначен – под ним подразумевают и синдром Каннера (ранний детский аутизм), и, в более широком смысле, расстройства аутистического спектра (РАС) [203], к которым относится синдром Аспергера, синдром Ретта, детское дезинтегративное расстройство и неспецифическое первазивное нарушение развития (атипичный аутизм) [35].

Лица с синдромом Аспергера отличаются от лиц с синдромом Каннера отсутствием значительных задержек речевого развития, их познавательная деятельность характеризуется средним и высоким уровнем. Люди с атипичным аутизмом, в основном, страдают от обеднения социальных контактов, но их структура или выраженность в этом или в другом из двух основных доменов является недостаточной для удовлетворения диагностических критериев аутизма [197].

### **1.2.1. Патогенез аутизма: признанные теории и нерешенные вопросы**

Многочисленные эпидемиологические исследования подготовили базу для выявления генетических основ аутизма, было выявлено несколько генов-кандидатов. Однако, несмотря на наличие современных технологий, только у 6-15% лиц с аутизмом может быть установлен генетически идентифицируемый диагноз [116]. Синдром ломкой X-хромосомы (синдром Мартина-Белл) является наиболее распространенной моногенной причиной аутизма, он связан с экспансией тринуклеотидов ЦГГ и недостаточной экспрессией белка FMR1, регулирующего транспорт и трансляцию мРНК. Потеря этого белка изменяет трансляционный контроль и рецептор-опосредованные пути передачи сигнала, что приводит к синаптической дисфункции и характерному поведенческому фенотипу [213]. Стоит отметить синдром Фелана-Макдермида, связанный с дефектом гена SHANK3. SHANK3 – синаптический белок цитоскелета, играющий роль в постсинаптической плотности возбуждающих синапсов, где он взаимодействует с другими многочисленными постсинаптическими белками, в том числе ионотропными и метаботропными глутаматными рецепторами, нейролигинами и компонентами цитоскелета [21]. Для большинства расстройств аутистического спектра предполагается полигенный характер наследования [37].

Генетическая природа заболевания доказана и у синдрома Ретта. Он передается по сцепленному с X-хромосомой доминантному типу наследования и связан с мутациями метил-СрG-связывающего белка (MeCP2), участвующего в

транскрипции генов-супрессоров. Ген MECP2 важен для правильного функционирования мозга: к примеру, он участвует в созревании нейронов и синапсов [75]. При аутизме известен ряд генов-кандидатов: например, CDH9, CDH10 [55], SERT (ген, ассоциированный с секрецией серотонина) [186], GABRB3, GABRA4 (их продукты ассоциированы с секрецией ГАМК [103], neurexin 1 [137], OXTR (ген, кодирующий рецепторы окситоцина) [88]. В организме человека и других млекопитающих такие гормоны, как аргинин-вазопрессин и окситоцин оказывают влияние на многие социальные, эмоциональные и поведенческие черты, в том числе формирование пары, родственные отношения и альтруизм [70]. Вазопрессин также играет роль в высших когнитивных функциях, таких как память и обучение. Обнаружена роль CD38/АДФ-рибозилциклазы/НАД<sup>+</sup>-гликогидролазы в секреции окситоцина: при расстройстве экспрессии кодирующего его гена в клетках гипоталамо-гипофизарной системы могут развиваться отдельные формы аутизма, ассоциированные со снижением центральной и периферической секреции окситоцина [160].

EIF4E – ограничивающий скорость компонент эукариотической инициации трансляции, он играет ключевую роль в процессах обучения и памяти через контроль перевода в синапсах. EIF4E опосредованная трансляция через пути mTOR, PTEN белок синдрома ломкой X-хромосомы (FMRP), которые вовлекаются при аутизме. Связь аутизма с областью eIF4E на хромосоме 4q обнаружена в геноме во многих исследованиях [66].

Последние генетические исследования предполагают, что в некоторых случаях РАС имеет место аномальный гомеостаз Ca<sup>2+</sup> в процессах развития нервной системы. Кроме того, найдены гены, связанные с аутизмом, кодирующие белки либо непосредственно, либо косвенно контролируемые внутриклеточный уровень Ca<sup>2+</sup> [114].

Прямых доказательств участия miRNA в РАС мало; только несколько исследований, связанных с изменениями уровня экспрессии miRNA в биологических тканях. В одном исследовании удалось определить 28 видов

miRNA, которые были обнаружены в посмертных образцах ткани коры мозжечка, по крайней мере у одного из 13 [95]. В других исследованиях изучались уровни экспрессии miRNA в лимфобластоидных клетках с помощью микрочипирования и обнаружены ее виды, связанные с аутизмом [192].

Белок MIG-6 регулирует передачу сигнала за счет способности к взаимодействию с EGFR и другими тирозинпротеинкиназными рецепторами, препятствуя их фосфорилированию и передаче сигнала по типу отрицательной обратной связи. У детей-аутистов отмечалось снижение уровня MIG-6 в плазме крови, в отличие от детей без патологии [177].

В дополнение к генетической предрасположенности, эпидемиологические исследования показывают, что для этих генетических факторов необходимо взаимодействовать с нейротоксичными веществами из окружающей среды [58], например, пренатальное воздействие ксенобиотиков, таких как талидомид и 2-пропилпентаонат/вальпроевая кислота. Талидомид, как было показано, приводит к высокой заболеваемости аутизмом при воздействии с 20 по 24 день беременности, при этом поражаются двигательные ядра черепных нервов, ствол головного мозга укорочен [120]. При введении вальпроевой кислоты отмечается дисфункция серотонинергических нейронов, которая, в свою очередь, обуславливает расстройство серотонин-индуцированного высвобождения окситоцина, дисфункцию глутаматных рецепторов mGluR5, что приводит к развитию стереотипий, также важнейшую роль играет торможение клеточного цикла нейрональных прогениторных клеток в критические сроки эмбриогенеза, с последующей постнатальной гиперактивацией нейрогенеза и синаптогенеза. Описано влияние на развитие аутизма таких препаратов, как этиловый спирт, мизопропрост, принимаемых во время беременности [189].

В числе факторов риска развития аутизма указывают возраст родителей ребенка свыше 35 лет, в связи с увеличением риска развития генетических мутаций [118].

Существует ряд пока неподтвержденных гипотез о влиянии других внешних факторов на риск развития аутизма, например, гестационного диабета, гипоксии,

гипотиреоза беременных. Одно из громких предположений прошлых лет о влиянии тиомерсала и вакцин с его содержанием (АКДС), было полностью опровергнуто [115].

Исследования аутизма в значительной степени посвящены оценке и пониманию многих клинических особенностей заболевания, таких как языковые паттерны, когнитивные навыки, поведенческие проявления, социальное взаимодействие и обработка информации, а также тому, как эти особенности могут быть связаны с анатомией и гистологией, биохимией нервной системы, потенциальными генетическими факторами.

В настоящее время ведется активный поиск нейробиологических основ аутизма. Считается, что нарушение нормального развития нервной системы в эмбриональном периоде, с последующим форсированным нейрогенезом в раннем постнатальном периоде, а также ранним преждевременным ростом нейронов, является фактором риска развития аутизма [47, 89], что в постнатальном периоде сопровождается увеличением объема мозга и гиперплазией его коры [69]. Например, с помощью методов магнитно-резонансной и позитронно-эмиссионной томографии (МРТ, ПЭТ) было определено, что у 90% детей с ранним детским аутизмом в возрасте от двух до трех лет отмечается увеличение объема головного мозга на 10-13% по сравнению с возрастной нормой. Нейроанатомия пациентов с аутизмом характеризуется гиперплазией белого вещества мозжечка и коры в раннем возрасте с последующим нивелированием этого отличия, а также уменьшением червя мозжечка у обследованных лиц всех возрастов [205].

Если смотреть глубже, то расстройства развития при аутизме включают: изменения структуры колонок, синаптических шипиков, которые могут лежать в основе нарушений связей между нейронами; и изменения в пределах корковой области, которая играет важную роль в регулировании коммуникации между регионами зрелого мозга. Такие изменения архитектоники коры головного мозга в пренатальном и перинатальном периоде, вероятно и дают основу поведенческому фенотипу при аутизме [102]. Особенности организации взрослого головного мозга в значительной степени определяется ранними событиями, в том числе

нейрогенезом, нейрональной миграцией, синапто- и дендритогенезом, апоптозом [125, 182]. Другие структурные изменения у лиц с расстройствами аутистического спектра могут произойти на более поздних этапах, могут быть вторичными по отношению к пренатальной патологии.

Многие исследования показывают, что РАС характеризуется гибелью нейронов [125]. По меньшей мере, в семи посмертных исследованиях говорится о значительном сокращении числа клеток Пуркинье в мозжечке людей с РАС [80]. Другие исследования также отметили уменьшение количества нейронов в других областях, например, в миндалине [184]. Отмечено уменьшение размеров и количества нейронов латеральной затылочно-височной извилины, в частности, значительное снижение плотности нейронов в третьем слое, общего числа нейронов в слоях III, V и VI [154]. Посмертные исследования также показывают уменьшение количества пирамидальных клеток в головном мозге людей с РАС [79].

Преэклампсию связывают с формированием РАС. У матери преэклампсия характеризуется дисфункцией плаценты с повреждением сосудов, резистентностью к инсулину; в результате страдает транспорт питательных веществ и развивается окислительный стресс; у плода же отмечается ограничение роста и прогрессирующая гипоксемия [167].

Существует гипотеза о воздействии коротко-цепочечных жирных кислот, например, пропионовой кислоты, влияющих на нейромедиаторные системы, внутриклеточное окисление и выход кальция, метаболизм жирных кислот, щелевые контакты, иммунную функцию, экспрессию генов [124].

### **1.2.2. Роль нейровоспаления в патогенезе аутизма**

Иммунная система может играть определенную роль при аутизме. Гипотеза об участии иммунологического компонента в развитии расстройств аутистического спектра уже давно предположена. Цитокины и хемокины – белки, регулирующие гемопоз, воспаление, и иммунную клеточную пролиферацию и

дифференцировку. Есть множество обзоров, которые касаются роли клеточного и гуморального иммунитета, бактериальных и вирусных инфекций, иммуногенетики и иммунотерапии по отношению к РАС. В семьях больных с аутизмом показана большая предрасположенность к аутоиммунным нарушениям [129]. У детей-аутистов отмечается реактивность антител в сыворотке крови против человеческих корковых и мозжечковых областей головного мозга [36]. Предполагается, что этот процесс начинается в утробе матери и связан с передачей через плаценту материнских аутоантител с негативным влиянием на развитие головного мозга плода [31].

В последнее время роль материнской иммунной активации стала обсуждаемой темой в исследованиях аутизма. Несколько групп ученых обнаружили, что воздействие на развивающийся плод материнских цитокинов обуславливает неврологические, иммунологические и поведенческие нарушения у потомства [130]. Обнаружено повышение уровня MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1, цитокин, относящийся к группе  $\beta$ -хемокинов) и снижение уровня фактора, регулируемого по нормальной активации экспрессии и секреции Т-клеток (RANTES) в крови новорожденных детей, у которых впоследствии был обнаружен аутизм [148].

Среди факторов внешней среды имеют значение врожденные и материнские инфекции, в частности, синдром врожденной краснухи, цитомегаловирусная инфекция [134]. Большинство инфекций, бактериальных или вирусных, обычно приводят к лихорадке. Так как вирусную инфекцию нельзя лечить с помощью антибиотиков, субфебрильная температура может сохраняться в течение более длительного периода времени. Лечение лихорадки жаропонижающими средствами, такими как ацетаминофен, мешает нормальному развитию иммунной системы, в том числе и в головном мозге, что приводит к нарушению развития нервной системы (например, к аутизму). Лечение лихорадки ацетаминофеном приводит к снижению уровня интерлейкина-6 (ИЛ-6) у матери и плода. ИЛ-6 обладает про- и противовоспалительным действием в зависимости от концентрации, является медиатором лихорадки, а его рецепторы экспрессируются на нейронах [201]. Доказано, что ИЛ-6 является важным медиатором развития и



дифференцировки нейронов в центральной нервной системе [175]. ИЛ-6 не только играет важную роль в этиологии аутизма, но и выступает потенциальным биологическим маркером ранней диагностики РАС. Поскольку ИЛ-6 может ослабить ненормальное поведение, вызванное материнской иммунной активацией, он может в будущем быть применен для терапии [83].

Дополнительные исследования, проведенные на мышах, показали, что материнские инфекции могут изменять уровень провоспалительных цитокинов в головном мозге со значительным их влиянием на развитие мозга [169]. Исследования показали, что интерлейкин-1 индуцированная активация сигнальных путей, связанных с-Jun N-терминальными киназами (JNK) в нейронах (в частности, в гиппокампальной зоне), опосредуется через добавочный к рецептору ИЛ-1 белок (X-linked interleukin-1 receptor accessory protein like-1 (IL1RAPL1)), что указывает на новейший патофизиологический механизм, лежащий в основе когнитивных нарушений. Когнитивная дисфункция может быть связана с изменениями в пути JNK в ответ на ИЛ-1 и, следовательно, привести к некорректной синаптической функции. Мутации в IL1RAPL1 могут вызвать спектр неврологических нарушений, начиная от умственной отсталости до высокофункционального аутизма [217].

Индукция провоспалительных цитокинов, в частности, интерлейкина-1 (ИЛ-1) играет важную роль в ухудшениях памяти, связанных с различными неврологическими расстройствами и черепно-мозговой травмой [17]. Интерлейкин 1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) является ключевым провоспалительным цитокином, связанным с возрастным снижением когнитивных функций [123]. В настоящее время доказано, что обучение и память [162], синаптическая пластичность, являются наиболее уязвимыми с возрастом к влиянию ИЛ-1. В гиппокампе отмечается высокая плотность ИЛ-1 рецепторов, вследствие чего отмечается несколько экзогенных эффектов ИЛ-1: он ингибирует приток кальция, протеинкиназу C, высвобождение ацетилхолина и глутамата в гиппокампе [144]. При ограниченном воздействии на ткань ИЛ-1 $\beta$  в низких концентрациях может оказывать нейропротекторный эффект, однако длительное воздействие высоких концентраций может вызвать дегенеративные изменения. Известно о повышенной

экспрессии ИЛ-1 при болезни Альцгеймера и синдроме Дауна [44]. Доказано, что ИЛ-1 $\beta$ -индуцированное ухудшение памяти в головном мозге происходит через сигнальный путь с участием сероводорода (H<sub>2</sub>S), синтезированного цистатионин бета-синтазой (CBS). H<sub>2</sub>S влияет на глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу с помощью сульфгидрации дендритов, что способствует его связыванию с белком-лигазой E3, Siah. Вследствие этого, Siah связывается с PSD95, что приводит к его деградации с помощью убиквитинилирования. Уменьшение потери PSD95 у CBS +/- мышей приводит к улучшению ИЛ-1-индуцированного когнитивного дефицита и нейроповеденческим изменениям [140].

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) выполняет иммунорегуляторную роль, связанную с Т-клетками периферической и центральной нервной системы, может быть вовлечен в развитие ЦНС, участвует в реализации физиологических функций мозга и гомеостатических механизмов репарации, играет роль в их дисфункции и нейродегенерации [61]. Обнаружено, что в сыворотке крови концентрация ИЛ-2 значительно выше у детей-аутистов в сравнении детьми без аутизма [50].

Ключевым медиатором нейровоспаления является S100B – небольшой кальций-связывающий белок, синтезируемый астроцитами. В физиологических условиях он действует как нейротрофический фактор и отвечает за выживание, развитие и функционирование нейронов [71] и за долгосрочную синаптическую пластичность, по результатам электрофизиологических и поведенческих исследований, что приводит к усилению когнитивной функции [90]. Теория нейровоспаления подтверждена и в посмертных исследованиях головного мозга: обнаружены активированная микроглия [138], активированные астроциты [151]. Воспалительный процесс может способствовать неврологической дисфункции и гибели клеток, тем самым запуская «порочный круг», в соответствии с которым воспаление представляет собой существенную причину дальнейшей нейродегенерации [42].

Современные представления об этиологических факторах и патогенезе аутизма представлены на рисунке 1.

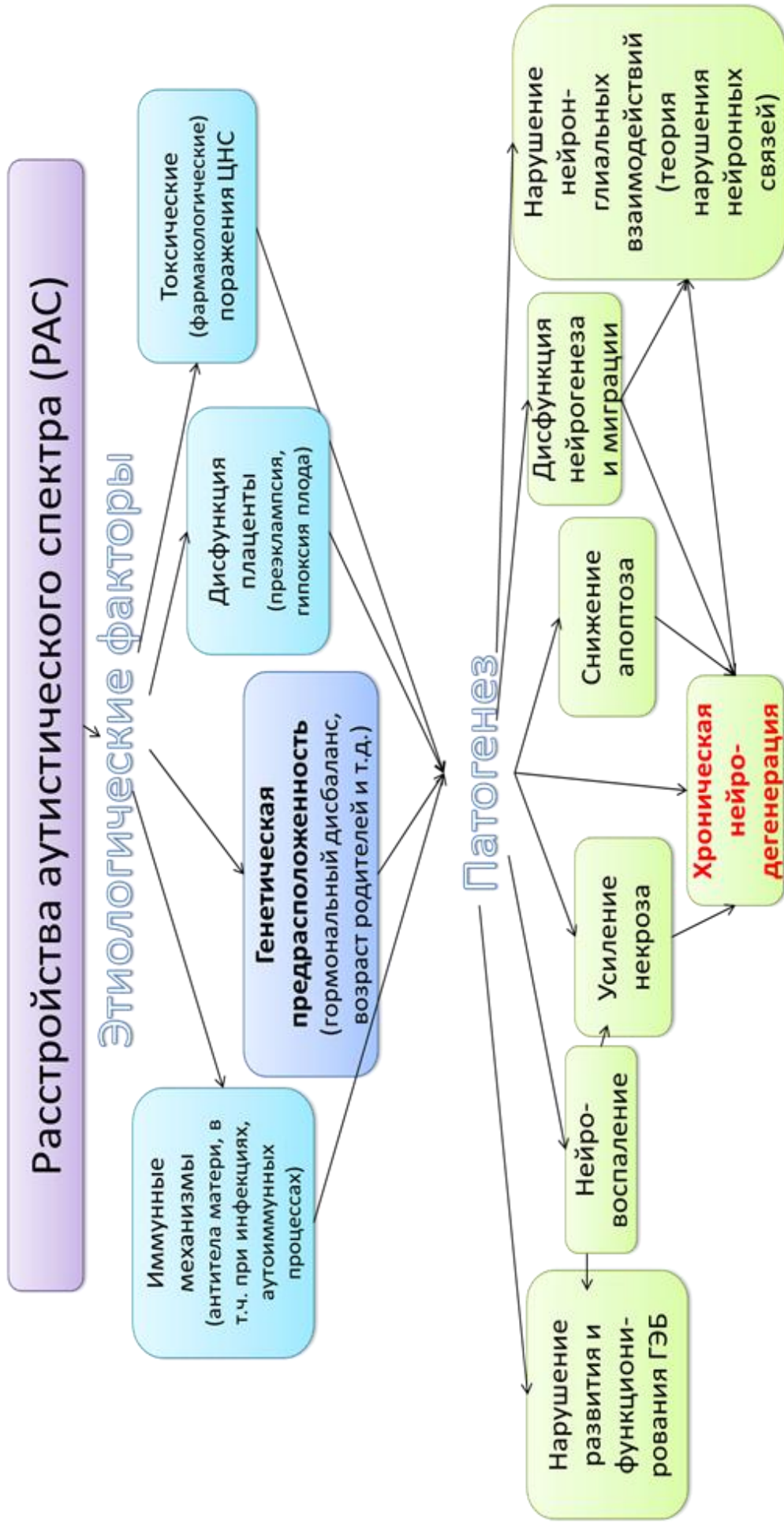


Рисунок 1 – Современные представления об этиопатогенезе расстройств аутистического спектра, согласно литературным данным [31, 37, 42, 47, 58, 75, 89, 95, 114,129, 130, 213].

### 1.3. Современные представления о болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) – результат развития хронической нейродегенерации и выраженного нейровоспаления. Многие клеточно-молекулярные события, характеризующие нейровоспаление, были впервые описаны применительно к этой патологии с использованием клинического материала или экспериментальных моделей БА на животных.

БА - наиболее распространенная форма слабоумия, нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением  $\beta$ -амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, которые состоят из тау-белка и бета-амилоида [5, 18, 94]. Данную патологию связывают с гибелью синапсов и нейродегенерацией, что приводит к нарушению способности создавать недавние воспоминания, неизбежно затрагивает все интеллектуальные функции и приводит к полной зависимости от ухода в повседневной жизни и преждевременной смерти. На сегодняшний день болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой причиной деменции в западных странах. Распространенность БА по всему миру оценивается около 24 млн. людей, ожидается удвоение количества заболевших каждые 20 лет, вплоть до 2040 года [133].

Факторами риска развития БА являются наличие цереброваскулярных заболеваний, артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа. Сосудистые изменения, такие как геморрагические и ишемические инсульты, васкулопатии и изменения белого вещества, увеличивают риск развития деменции. Инсульты могут привести к непосредственному повреждению регионов головного мозга, отвечающих за память, таких как таламус и таламо-кортикальные проекции. Они также могут увеличить отложение амилоидных бляшек, что приводит к ухудшению когнитивных функций и воспалительному ответу. Гипоперфузия может привести к повышенной экспрессии циклин-зависимой киназы 5 (CDK5), серин-треонин киназы, критической для формирования синапсов и синаптической пластичности [51]. Артериальная гипертензия может увеличивать риск БА через воздействие на сосудистую целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), в

результате чего белок поступает из сосудов в ткани головного мозга [112]. В свою очередь, экстравазация белка может привести к повреждению клеток, снижению количества нейронов или синаптической функции, апоптозу и увеличению накопления бляшек и, как следствие, к когнитивным нарушениям [63]. С увеличением возраста эффект повышенного артериального давления на риск возникновения БА уменьшается и даже может оказывать защитный эффект [112].

По данным, полученным на экспериментальных моделях БА и от человеческих аутопсий, показано, что сенильные бляшки и внутринейрональные нейрофибриллярные клубки часто локализованы совместно с активированной глией, что позволяет предположить ключевую патогенетическую роль реактивного глиоза в патогенезе болезни Альцгеймера [11, 57]. Бета-амилоид, вероятно, способствует нейровоспалению через синтез различных цитокинов и провоспалительных посредников. Недавние исследования говорят о важной роли дисфункции астроцитов в процессе старения и патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности БА [212]. Существует также гипотеза о роли каспазы-6 в развитии нейродегенерации при БА. Активация каспазы-6 модулирует бета-амилоид и повышает содержание фосфорилированных тау-белков, которые связаны со стрессом нейронов и клеточных линий [117].

В целом, процессы повреждения нейронов и астроглии, нарушение процессов нейрогенеза при нейроделегаации альцгеймеровского типа тесно связаны с признаками нейровоспаления в головном мозге, что определяется аккумуляцией эффекторных клеток (астроглия, микроглия), формированием инфламмасом, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, прогрессией апоптоза, причем даже в доклинической стадии развития этого заболевания [141, 176].

Интересным является и то, что по ряду признаков существуют определенные патофизиологические аналогии между БА и аутизмом, в частности, в литературе активно обсуждается роль бета-амилоида в возникновении хронической нейродегенерации при БА и нарушении развития головного мозга, связанном с формированием аутистических черт поведения, чему есть

экспериментальные доказательства, полученные с использованием методов системной биологии [28].

Таким образом, изучение нейровоспаления как важного компонента патогенеза заболеваний, связанных с нарушением развития головного мозга или нейродегенерацией, представляет собой актуальную задачу современной патофизиологии, клеточной биологии, нейробиологии, своевременное решение которой определит прогресс в развитии методов профилактики, диагностики и терапии заболеваний головного мозга.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1.1 Объект исследования

Объектом исследования стали крысы обоего пола в возрасте от 1 до 90 суток (периоды молочного кормления и полового созревания, модель аутизма (пренатальное введение вальпроевой кислоты, n=45) и контроль (пренатальное введение физиологического раствора, n=44)), которые были получены от самок репродуктивного возраста белых линейных (линия Wistar) крыс, массой 200-300 г. По достижению необходимого возраста животных подвергали эвтаназии и забирали головной мозг, из которого впоследствии получали парафиновые срезы, гомогенаты аффекированных участков головного мозга (гипоталамус, гипофиз, миндалина). Для моделирования болезни Альцгеймера использовались крысы мужского пола линии Wistar, возрастом 7 месяцев: опытная (интрагиппокампальное введение бета-амилоида) и контрольная (интрагиппокампальное введение фосфатно-буферного раствора) группы (по 7 в группе, всего 14). Эксперименты на животных были одобрены представителями биоэтической комиссии по работе с лабораторными животными при локальном этическом комитете и локальным этическим комитетом КрасГМУ и проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755), национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной практики". Животные содержались в хорошо вентилируемом, освещенном, отапливаемом помещении со своевременной уборкой, при 12-часовом световом цикле, не более пяти в одной клетке и имели свободный доступ к пище и воде.

Критерием включения в группы наблюдения являлось нормальное исходное состояние неврологического статуса (0 баллов по неврологической шкале NSS) крыс до проведения эксперимента. Не включались в исследование другие линии крыс; животные с «грубой» неврологической симптоматикой (более 2 баллов по шкале NSS); животных с инфекционной или соматической патологией. Животные исключались из исследования при присоединении соматической или инфекционной патологии; а также при гибели животного. Животные распределялись на группы в зависимости от модели (экспериментальная модель аутизма обозначалась как «Э», контрольная группа – «К») и возраста (P5 – пятисуточные животные; P15 – животные в возрасте 15 суток; P25, P60, P90 – 25, 60 и 90 суток, соответственно) для хронической нейродегенерации детского возраста; в модели хронической дегенерации старшей возрастной группы использовались 2 группы: группа с экспериментальной болезнью Альцгеймера (БА), контрольная группа ложно-оперированных животных (позитивный контроль, ПК).

Животным с моделью аутизма эвтаназия производилась помощью передозировки хлоралгидратом (150 мг/крысу) с премедикацией ксилазином (0,2-0,4 мл/крысу). После убеждения в отсутствии признаков жизни животного (сердцебиение, дыхание, отсутствие роговичного рефлекса) производилась декапитация животного и забор мозга на льду. Забор материала проводили на 5, 15, 25, 60, 90-е сутки постнатального развития животных с моделью аутизма и контроля. Выделение структур головного мозга для определения окситоцина проводили в соответствии с их расположением по стереотаксическому атласу [163]. Изоляцию гипоталамуса проводили следующим образом: после перерезания зрительного нерва помещали весь мозг нижней стороной вверх, гипоталамус изолировали вблизи зрительных нервов, включая супраоптическое и паравентрикулярное ядра. Заднюю долю гипофиза находили в виде белой глянцеватой части по сравнению с немного красной частью передней доли гипофиза между стволами тройничного нерва параллельно нижней поверхности черепа [159]. Выделение миндалина проводили пошагово: определяли точку



брегма (в качестве маркеров использовали поверхностные сосуды), далее делали корональный срез приблизительно -1 от брегмы, следующий - на -2,75 от брегмы, срез помещали каудальной частью вверх, выделяли базолатеральную часть миндалины, избегая попадания в срез гиппокампа [25]. образцы замораживали при -80°C для хранения. Мозг для парафиновых блоков фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Крысам с БА и ложной операцией проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом (PFA) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10% растворе формалина, после чего погружали в 30% раствор сахарозы на 2 суток, затем производили нарезку срезов на вибротоме. Полученные срезы хранили в растворе PBS с 0,02% азидом натрия. Утилизация биологического материала проводилась следующим образом: производили упаковку трупов животных, доставляли их в специальную морозильную камеру, предназначенную только для хранения трупов животных, после чего фирма, занимающаяся утилизацией биологического материала, централизованно его вывозила.

Осмотр животных, биохимические, морфологические, иммуногистохимические исследования проведены в центре коллективного пользования НИИ молекулярной медицины и патобиохимии при ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

Парафиновые срезы головного мозга готовили на кафедре анатомии и гистологии человека ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России.

### **2.1.2. Создание экспериментальной модели аутизма**

Экспериментальная модель аутизма (рисунок 2) создавалась путем подкожных инъекций беременным самкам крыс на 12-й день после зачатия 500 мг/кг веса вальпроевой кислоты в физиологическом растворе, в контроле - введение растворителя (физиологический раствор) из расчета 1 мл/кг веса. Введение вальпроевой кислоты – одна из «классических» пренатальных

токсических моделей аутизма [39, 67, 120, 183]. Модель обусловлена нарушением функционирования серотонинергических нейронов, которое, в свою очередь, может индуцировать дисфункцию серотонин-опосредованного высвобождения окситоцина, нарушение функционирования рецепторов глутамата mGluR5, приводящего к наличию стереотипного поведения, привести к ингибированию клеточного цикла нейрональных прогениторных клеток в критические сроки эмбрионального развития, при этом впоследствии развивается гиперактивация нейрогенеза и синаптогенеза. Период введения растворов был выбран не случайно: 12-е сутки после зачатия – критический период эмбрионального развития, на который приходится пик нейрогенеза в латеральном ядре обонятельного тракта, ядрах таламуса, в 6-м слое нейронов коры.

# Дизайн эксперимента

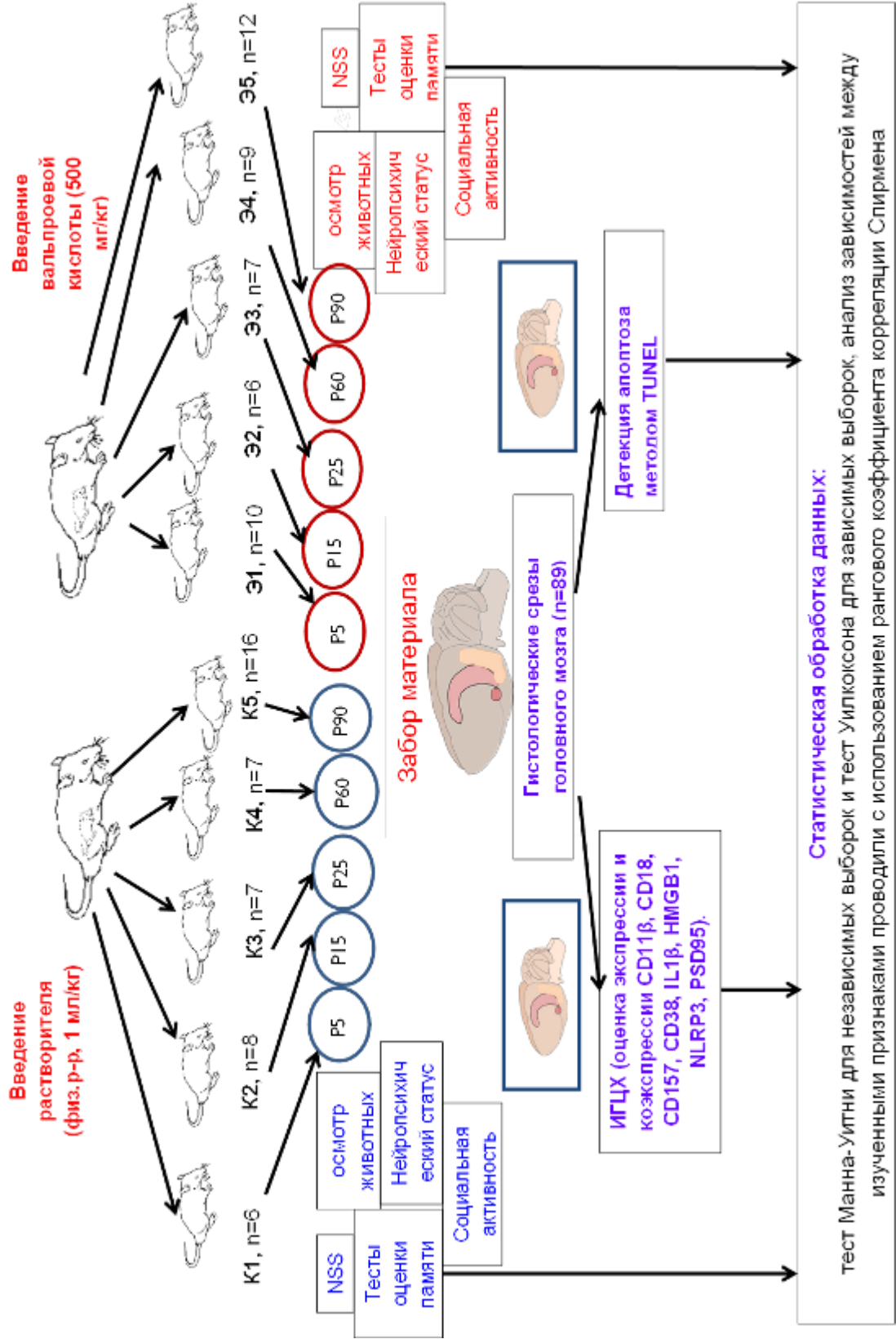


Рисунок 2 – Дизайн эксперимента по моделированию аутизма

### 2.1.3. Создание экспериментальной болезни Альцгеймера

Моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера (рисунок 3) проводилось путем стереотаксического введения животным бета-амилоида [181]. Перед стереотаксической операцией у каждой крысы оценивался вес в граммах с целью расчета дозировки препарата для анестезии (для подавления болевой чувствительности - ксилазин 1 мл/кг веса, для общей анестезии - хлоралгидрат 0,35 мг/кг интраперитонеально). Опытной группе (экспериментальная болезнь Альцгеймера - БА) вводился  $\beta$ -амилоид 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) в СА1 зону гиппокампа билатерально по 5 мкл по стереотаксическим координатам  $ML \pm 2,2$  мм, в AP – 3,0 мм, DV – 2,8 мм. Контрольной группе ложно-оперированных животных (позитивный контроль, ПК) интрагиппокампально по тем же координатам вводился растворитель для бета-амилоида – фосфатно-солевой буфер (PBS, фирма Sigma-Aldrich, USA). Раствор для введения готовили следующим образом: бета-амилоид 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) растворяли в PBS до концентрации 2 мкг/мкл с последующей агрегацией в термостате при 37°C в течение 7 дней. Забор головного мозга осуществляли на 14-е сутки после моделирования.

# Дизайн эксперимента

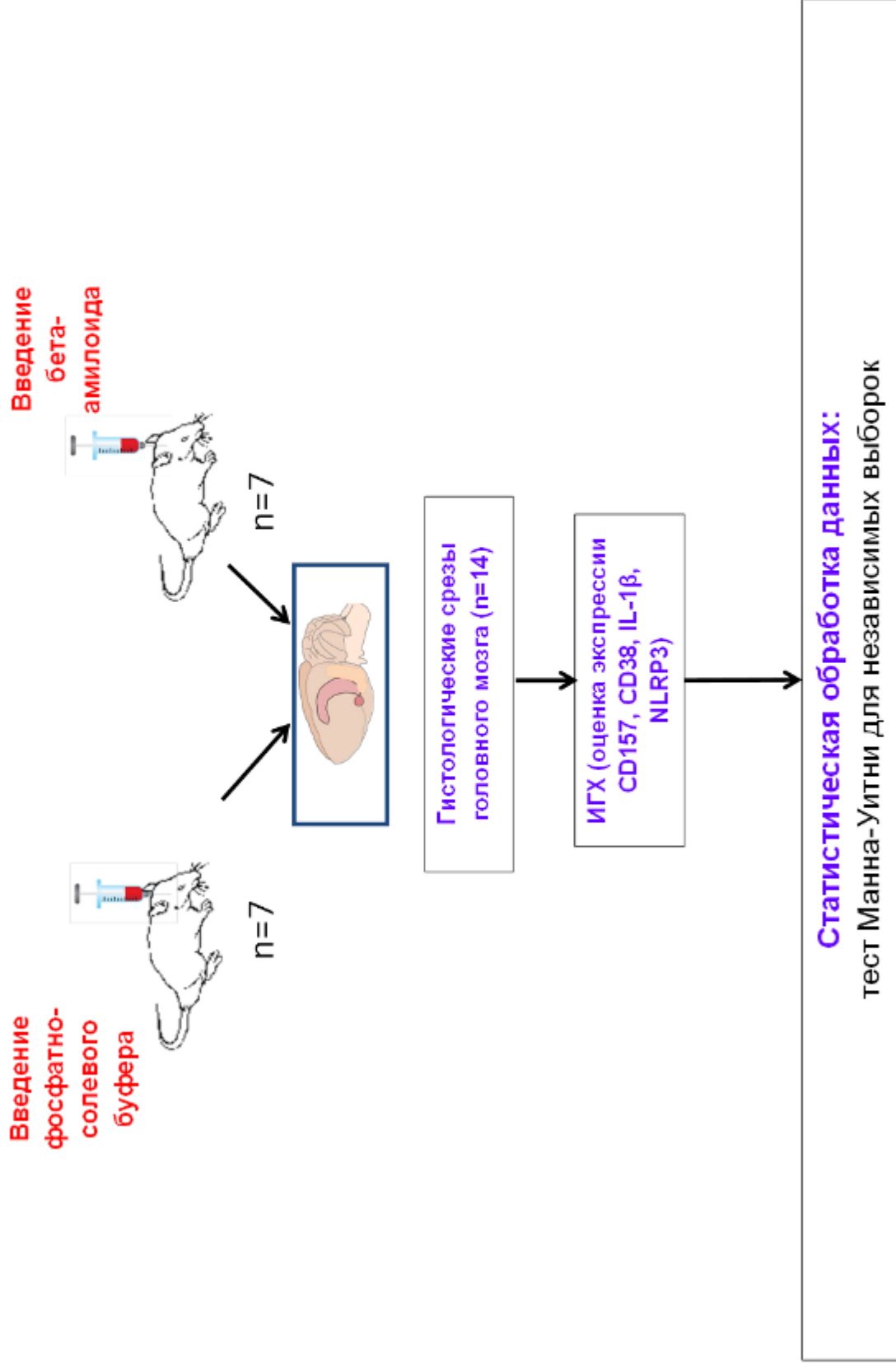


Рисунок 3 – Дизайн эксперимента по моделированию болезни Альцгеймера.

## **2.2 Фенотипирование животных в модели аутизма**

Тесты для поведенческого фенотипирования животных в модели аутизма включали оценку нейropsychического статуса животных с момента рождения по 17-е сутки ежедневно, NSS-тест, тесты для оценки памяти (водный лабиринт Морриса, тест на распознавание нового объекта), социальное поведение (тест с трубой на агрессию, 3-камерная активность, социальный пятипопыточный тест), эмоциональной сферы животных (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт) и подтверждение эффективности создания модели – осмотр на наличие признаков аутизма (аутогруминг, рытье подстилки). Также для подтверждения эффективности создания модели использовалась оценка уровней окситоцина в гомогенатах гипоталамуса, гипофиза и миндалина головного мозга крыс.

### **2.2.1. Осмотр животных на наличие признаков аутизма**

При осмотре животных уделялось внимание оценке присутствия и длительности (в секундах) таких признаков аутизма, как аутоагрессия, наличие стереотипных движений (рытье подстилки, аутогруминг).

Тест на аутогруминг проводился в пустой, протертой 70% спиртом, прозрачной камере, которая в обязательном порядке мылась и обрабатывалась 70% спиртом после каждого протестированного животного. Рытье подстилки оценивалось в аналогичной прозрачной клетке, также обработанной, но с наличием чистого подстила на дне, после каждого теста камера тщательно мылась, обрабатывалась 70% спиртом и осуществлялась замена подстилки на чистую. В течение первых 10 минут после помещения испытуемого животного в камеру им осуществлялось привыкание к новым условиям, видеорегистрация и оценка проводилась в течение последующих 10 минут.

В тесте на аутогруминг оценивали количество актов груминга, их продолжительность в секундах (общее число и продолжительность), наличие и число актов аутоагрессии и их длительность в секундах. В тесте на рытье подстилки подсчитывали продолжительность рытья подстилки животным в секундах [1].

### **2.2.2 Неврологическая шкала NSS (Neurological Severity Score)**

Поражение нервной системы характеризовалось в баллах по степени неврологического дефицита, который оценивали по шкале NSS (стандартный протокол, приложение А) в динамике: на 60-е и 90-е сутки постнатального развития, а также при отборе самок, от которых получали потомство в модели аутизма.

Neurological Severity Score дает возможность осуществить динамическую оценку состояния различных (моторной, сенсорной, координаторной и рефлекторной) функций у исследуемых животных. Эта шкала повреждения позволяет оценить нарушение функций ЦНС от 0 (нормальный неврологический статус) до 18 баллов (выраженное расстройство функций головного мозга) [81].

### **2.2.3 Оценка состояния неврологических рефлексов и физического развития животных при моделировании аутизма**

После рождения животные содержались в клетке совместно с матерью вплоть до 28-30 суток постнатального развития, далее самку отсаживали в другую клетку. Разделение потомства по полу проводили не ранее возраста 30 суток и не позднее 60 суток ввиду достижения крысами половой зрелости. Оценка физического и нейропсихического развития проводилась в период с 1 по 17 сутки после рождения, что заносили в соответствующий протокол (приложение Б). Оценивали общее количество животных и число мертворожденных в помете, смертность на 7-е сутки развития. Из оценки физического развития исследовали массу животных на 7-е и 14-е сутки (в граммах). Отдельно оценивались сроки появления следующих характеристик физического развития: отлипание ушей, прорезывание резцов, открытие глаз, появление отрицательного геотаксиса, появление оволосения, рефлексов переворачивания на плоскости, ольфакторной дискриминации, поиска гнезда, появление опоры на задние лапы и наличие подъема всего тела, подъема головы и передних конечностей [150]. Помимо сроков появления рефлексов, оценивалось выполнение/невыполнение теста. Мышечная сила исследовалась на 15-17 сутки постнатального развития и оценивалась по 5-балльной шкале.

## 2.3 Тесты для оценки когнитивной функции крыс

Известными тестами для исследования когнитивной функции у животных являются тесты «водный лабиринт Морриса», Т-образный лабиринт, тест на распознавание нового объекта и другие. Наличие когнитивного дефицита животных оценивали на 25, 60, 90-е сутки постнатального развития животных.

### 2.3.1 Водный лабиринт Морриса

Водный лабиринт Морриса - тест на пространственную память, позволяющий оценить пластичность обучения. Проводился он в резервуаре, глубиной 25 см, наполненным теплой водой (температура 30 С), «окрашенной» сухим молоком для непрозрачности. Целевая платформа (диаметром 10 см) располагалась на 1-2 см ниже поверхности воды и помещалась в одном из фиксированных квадрантов бассейна. У 2 стенок лабиринта (представляющих «север» и «восток» испытательной камеры) находились источники света, установленные в качестве ориентиров над краем бассейна [15, 104]. Экспериментатор стоял в положении «юг» во время тестирования и оставался неподвижным.

Перед тестированием животным проводили обучение в течение трех дней: во время первых трех попыток животное помещали в одну из фиксированных стартовых точек («север», «юг», «восток», «запад» в каждом из квадрантов бассейна) – основную точку «старта», четвертая же стартовая точка каждый день менялась. Основным критерием выполнения теста считалось достижение животным скрытой под водой платформы, при этом оценивалось время (в секундах), потраченное на поиски. На поиск платформы выделялось около 60 секунд. В один день тестирования проводилось 4 попытки подряд (12 попыток для обучения и 4 попытки в день оценки), между которыми крыса сидела по 20 секунд на платформе для запоминания ее расположения.

Диагностическим критерием нормальных когнитивных функций считалось достижение крысой платформы за 15 и менее секунд в 4 попытке 4 дня тестирования. В «Водном лабиринте Морриса» определяли особенности кратковременной и долговременной памяти крыс по сравнению времени



обнаружения платформы в первый тренировочный день (кратковременная память) и изменению этого времени в четвертую попытку всех 4 дней тестирования крыс (долговременная память).

### **2.3.2 Тест на распознавание нового объекта**

Данный тест основан на стремлении крыс исследовать новый объект взамен знакомого ранее, что отражает процессы изучения, распознавания и запоминания. Для проведения исследования в клетку к животному помещались два одинаковых предмета (кубики), далее шла 10-минутная сессия (с видеорегистрацией) в ходе которой животное запоминало новые объекты и привыкало к ним. Затем животное изымалось из клетки, один кубик менялся на другой, незнакомый ранее объект (пирамидка). Крысу возвращали на место, и далее шла вторая 10-минутная сессия. В ходе обеих сессий регистрировалось время (в секундах), затраченное на исследование новых и уже знакомых объектов [4].

## **2.4 Тесты для оценки социального поведения крыс**

Тесты, применяемые для исследования социальной активности крыс, включают в себя тесты «3-камерная активность», социальный пятипопыточный тест и тест с трубой на агрессию.

### **2.4.1 3-камерная активность**

Тест на социальную активность проводился в трехкамерном аппарате. Аппарат представляет собой пластиковый ящик, разделенный на три камеры неокрашенными перегородками с отверстиями для перехода между ними. Переходы между камерами предназначены для свободного передвижения и исследования крысой разных камер. Тест состоит из трех 10-минутных сессий. Незнакомые для исследуемой крысы того же пола («стимулы») были

«иммобилизованы» в закрытых пластиковых контейнерах с отверстиями, не позволяющими проявлять агрессию к исследуемому животному, но стимулирующие социальный интерес. Во время первой сессии исследуемый грызун помещался в центр 3-камерной установки для адаптации, после чего животное изымалось из камеры на время уборки. Камеры тщательно протирались и обрабатывались 70% этанолом между испытаниями. Затем в один из боковых отсеков камеры помещался стимул, а в центральный отсек высаживали исследуемое животное. Далее шла вторая 10-минутная сессия с видеорегистрацией, в ходе чего «стимул» становился знакомым животным. По окончании второй сессии испытуемый вновь отсаживался, камера обрабатывалась, в противоположный боковой отсек помещался новый «стимул», таким образом, в третьей сессии тестируемое животное находилось в камере с уже известным грызуном и ранее незнакомым [27]. Оценка проводилась по времени, проведенному в каждой камере, по времени обнюхиванию каждого пластикового контейнера и числу входов в каждую камеру. Незнакомые крысы брались из разных клеток, до тестирования никогда не находились в физическом контакте с объектом исследования. Трехкамерный аппарат находился в условиях минимизированного влияния света, температурных, звуковых и других условий окружающей среды, которые могли бы вызвать предпочтение одного из отсеков.

#### **2.4.2 Социальный пятипопыточный тест**

Этот тест позволяет оценить процессы узнавания новой особи. При частых встречах грызуны привыкают друг к другу и времени тратят меньше, чем при интересе к абсолютно новой крысе. В качестве стимулов применяли животных того же возраста, пола и веса, что и испытуемые, лишенных предварительных контактов с ними. Для исследования одного животного использовалось два стимула: во время тестирования проводятся 4 короткие «встречи» одного и того же стимула в клетке, а при последней, пятой попытке, в эту же клетку помещается новый грызун [40]. Каждая сессия длилась одну минуту для социального

взаимодействия (с параллельной видеорегистрацией), между сессиями проводился 10-минутный перерыв.

### **2.4.3 Тест с трубой на агрессию**

Данный эксперимент проводился между животными одного возраста, пола и веса с тестируемыми особями, ранее не вступавшими в контакт. На столе устанавливали пластиковую трубу, с диаметром, не позволяющим грызунам «разойтись» друг с другом внутри нее (в зависимости от размеров животных), вследствие чего один из испытуемых вынужден будет уступить, будет вытесненным из трубы. С двух концов трубы помещали слева тестируемую особь, справа – стимул. Критерием выполнения теста считалось выталкивание одного из животных из трубы, оценивалось количество побед испытуемой крысы и время (в секундах), за которое они достигнуты [113].

## **2.5 Тесты для оценки эмоционального поведения крыс**

### **2.5.1 Тест открытое поле**

Тест «Открытое поле» предназначен для исследования поведения грызунов в новых/стрессогенных условиях, используется для оценки выраженности элементов поведения (например, нарушений двигательной активности); уровня эмоционально-поведенческой реактивности животного (изменение времени «замирания» грызуна, частота груминга); стратегии исследовательского/оборонительного поведения; вегетативной дисфункции (частота урикации, дефекации) [16].

Оценка проводилась на 60 и 90 сутки постнатального развития. Проведение теста «открытого поля» осуществлялось в квадратной площадке площадью 1 м<sup>2</sup> с бортами высотой 45 см. Испытуемое животное находилось в тесте в течение 8 минут, грызун помещался в центр теста, фиксировался латентный период (в

первые пять минут от начала теста поведение животных обусловлено, в большей степени, стрессом и чувством страха), затем, после адаптации определяли исследуемые параметры в течение 3 последних минут. В тесте обращали внимание на такие параметры, как время замирания, число подъемов на задние лапы (стойки), время движений по горизонтальной плоскости, поисковая активность (число заглядываний в отверстия – норковый рефлекс), количество и продолжительность грумингов, после проведения теста регистрировали в протоколе количество дефекаций (болюсов) и уринаций. Часть параметров регистрировалась с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (Stoelting Co., США), остальное оценивалось при анализе видеофайлов.

### **2.5.2 Приподнятый крестообразный лабиринт**

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) является одним из наиболее общепринятых тестов для оценки эмоционального состояния у грызунов, кроме того - уровня тревожности, исследовательской активности в условиях стресса. ПКЛ представляет собой крестообразную установку с двумя закрытыми (защищенными) и двумя открытыми (потенциально опасными) рукавами, размерами 50x10 см, с высотой бортов открытых рукавов 1 см, закрытых – 30 см. Сама установка находится на высоте 1 м от пола. При тестировании животное помещается в центр арены и происходит видеорегистрация поведения грызуна в течение 5 минут. После каждого животного установка проходила обработку дезинфицирующим раствором. В тесте оценивались такие параметры, как время нахождения в открытых и закрытых рукавах, время пребывания животного в центре (на пересечении безопасной и потенциально опасной зон), количество входов/выходов из них. Тревожное поведение животного характеризуется превалированием нахождения в закрытых рукавах, по соотношению времени пребывания в открытых рукавах к времени нахождения в безопасной зоне [8, 16]. Кроме того, время нахождения в открытых рукавах может показывать и исследовательскую активность животного.

## **2.6 Определение уровня окситоцина в гомогенатах ткани головного мозга**

Для определения уровня окситоцина аффекированные регионы головного мозга (гипоталамус, гипофиз и миндалина) крыс забирали и гомогенизировали в 0,4 М уксусной кислоте, используя 1-миллилитровый тефлоновый/стеклянный гомогенизатор. Свежие гомогенаты ткани центрифугировали при 800 оборотах в течение 20 мин при 4°C, затем собирали супернатант и хранили при -80°C до измерения окситоцина. Содержание белка определяли с помощью набора Bio-Rad protein assay kit, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Bio-Rad, Hercules, CA, США). Далее проводили иммуноферментный анализ (ИФА) в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA) (приложение В).

## **2.7 Иммуногистохимическое исследование**

Оценку экспрессии антигенов (CD11 $\beta$ , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, IL-1 $\beta$ , PSD95) проводили на парафиновых срезах головного мозга согласно стандартным протоколам прямого и непрямого методов иммуногистохимии (иммунофлуоресцентный вариант), анализ коэкспрессии антигенов был проведен согласно стандартным протоколам одновременного или последовательного комбинированного окрашивания препарата (иммунофлуоресцентный вариант). Исследуемые участки головного мозга - зубчатая извилина гиппокампа (участок, отвечающий за долговременную память, а также нейрогенез), базолатеральная часть миндалины (отвечающая за эмоциональную память) и энторинальная кора (связующее звено между ассоциативными областями неокортекса и гиппокампом). Участие миндалины, гиппокампа и энторинальной мозга в формировании эмоций и их дисфункций продемонстрировано во многих исследованиях на живом человеческом мозге [59, 85]. Также известна роль миндалины головного мозга организации

кратковременной и долговременной памяти, процессах обучения, в регулировании нейроэндокринных процессов и модуляции активности иммунной системы [2].

Иммуногистохимическая окраска парафиновых срезов осуществлялась следующим образом (приложение Г): депарафинизация проводилась в вытяжном шкафу поочередным погружением стекол (на 5 минут в каждом растворе) с препаратами в 4 смены ксилола, далее в 2 смены 96% этанола, 1 смену 95% этанола, 1 смену 80% этанола. После обработки ксилолом и этанолом различной концентрации препараты погружали в 2 смены раствора PBS (Sigma Aldrich, США) по 5 минут. После депарафинизации осуществлялось нанесение раствора протеиназы К в концентрации 20 мкг/мл в PBS по 15 мкл на срез длительностью 15 минут при комнатной температуре во влажной камере. По истечению времени срезы промывали двумя сменами PBS длительностью по 2 минуты. С целью определения наличия внутриклеточных антигенов проводилась пермеабиллизация препаратов в 0,1% растворе тритона X-100 в течение 5 минут при комнатной температуре. Этап пермеабиллизации проводили при окраске на все маркеры, кроме HMGB1 и IL-1 $\beta$ , так как оценивалась их внеклеточная экспрессия. После пермеабиллизации промывали срезы двумя сменами PBS по 2 минуты. Далее на каждый срез наносилось 15 мкл блокирующей сыворотки (бычий сывороточный альбумин, BSA, в концентрации 10% в растворе PBS) с целью связывания неспецифических антигенов и препараты во влажной камере помещались в термостат (+37°C) на полчаса. После инкубации с BSA на каждый срез наносилось по 15 мкл первичных антител в рабочем разведении 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 в PBS с 1% BSA, препараты во влажной камере помещались на ночь в холодильник при +4°C. Следующий этап окраски проводили в темноте с целью избегания выгорания флуоресцентной метки. Срезы промывали двумя сменами PBS по 5 минут, наносили по 15 мкл вторичных антител (разведение 1:250-1:500 в PBS с 1% BSA) и инкубировали в термостате при +37°C во влажной камере. После инкубации с вторичными антителами препараты вновь промывали 2 сменами PBS.

Приготовление и иммуногистохимическая окраска свободно-плавающих срезов представлены в приложении Д. В качестве финального этапа иммуногистохимической окраски во всех случаях наносили 15 мкл монтирующей жидкости (70% глицерина в PBS + DAPI для окрашивания ядер клеток), на препарат помещали покровное стекло.

Микроскопию препаратов, окрашенных на HMGB1, IL-1 $\beta$  и PSD95, проводили при использовании соответствующего светофильтра на флуоресцентном микроскопе Olympus CX41. Остальные срезы подвергались эпифлуоресцентной или конфокальной микроскопии на полностью автоматизированном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе с водной иммерсией Olympus FV10i-W (Olympus, Япония).

## **2.8 Детекция апоптоза в ткани головного мозга**

Количество апоптотических клеток оценивалось методом TUNEL при помощи набора "In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Abcam Plc, United Kingdom) в соответствии со стандартным протоколом (приложение E). Вышеуказанный метод позволяет распознать разрывы нитей ДНК, при этом на 3'-ОН концы с помощью фермента помещаются искусственно созданные нуклеотиды. Депарафинизация, пермеабелизация проводились таким же образом, как описано в иммуногистохимическом методе, далее на срезы наносилась реакционная смесь с TdT (фермент, с помощью которого помечаются разрывы) и нуклеотиды, меченые FITC. С целью окрашивания ядер клеток добавлялся пропидия йодид на 15 минут при комнатной температуре. Далее препарат промывали двумя сменами PBS по 2 минуты и защищали срезы покровным стеклом, после чего незамедлительно проводилась микроскопия ввиду нестойкости метки. Микроскопия проводилась с помощью микроскопа Olympus CX41 с видеокамерой Olympus DP72, при увеличении x400, при этом отмечались FITC-позитивные клетки при анализе не менее 5 полей зрения на каждый аффецированный регион головного мозга (гиппокамп, миндалина, кора).

## 2.9 Статистический анализ результатов

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Данные представлены в виде: Me (Q1...Q3), где Me – медиана, Q1...Q3 – межквартильный размах. Анализ зависимостей между изученными признаками проводили с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна-Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ .



## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Результаты фенотипирования экспериментальных животных с моделью аутизма

#### 3.1.1. Результаты теста «Открытое поле» в экспериментальной модели аутизма

При исследовании вегетативной дисфункции в тесте «открытое поле» (таблица 1) было выявлено значимое увеличение количества болюсов дефекации в модели аутизма по сравнению с контролем, как на 60-е, так и на 90-е сутки развития животных. При этом количество уринаций значимо отличается лишь в возрасте 60 суток, в более старшем возрасте эта разница нивелируется.

Таблица 1 – Вегетативные расстройства в модели аутизма у крыс

Признаки	Группы			
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)
Количество болюсов дефекации	1 (0...2)	0 (0...2)	5 (2...9)	3 (1,75...6,25)
Уровни значимости	$p_{к-60} < 0,001$ ; $p_{к-90} = 0,001$			
Частота уринаций	0 (0...1)	1 (0,75...2)	1 (1...2)	1,5 (0...2)
Уровни значимости	$p_{к-60} < 0,001$ ; $p_{к-90} = 0,626$			

Увеличение количества болюсов и уринаций, вероятнее всего, может, с одной стороны, свидетельствовать о повышенной тревожности животных, с другой стороны, о дисфункции вегетативной нервной системы [62].

При тестировании животных в «Открытом поле» были выявлены следующие особенности (таблица 2): отмечаются увеличение пройденного

расстояния как в целом, так и отдельно по внешней и средней зонам, средней скорости передвижения животных, количества пересеченных линий в возрасте 60 суток между контрольными и опытными животными, при этом значимых различий на 90 сутки не было получено, причем у крыс с аутизмом с возрастом отмечается тенденция к уменьшению значения вышеуказанных показателей. Полученные данные очень схожи с синдромом гиперактивности и дефицита внимания, характерного для детей-аутистов, согласно литературным данным [7, 185].

Получены значимые отличия времени нахождения животных в средней зоне теста, причем продолжительность пребывания в ней с возрастом животного не увеличивается (как в контроле, так и в опыте). У крыс-аутистов наблюдалось увеличение количества и продолжительности норковых рефлексов в возрасте 60 суток в сравнении с контролем, однако в последующем значения этих показателей более схожи с контрольными животными в возрасте 60 суток, что указывает на задержку психического развития, характерную для большинства пациентов с аутизмом. Увеличение вышеуказанных показателей схоже со стереотипным поведением детей-аутистов [173].

Таким образом, в тесте «открытое поле» у животных с аутизмом в возрасте P60 выявлено наличие вегетативной дисфункции и признаков гиперактивности/стереотипного поведения, задержки психического развития.

Таблица 2 – Признаки, исследованные в тесте «Открытое поле» у крыс с моделью аутизма и у животных

Признаки	Группы				Уровни значимости
	Контроль		Аутизм		
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)	
Пройденная дистанция, м	21,0 (15,8...26,6)	18,9 (10,8...22,4)	32,8 (22,7...35,8)	15,2 (12...20,8)	$P_{x-y60}=0,006$ ; $P_{x-y90}=0,643$
Средняя скорость м/с	0,044 (0,033...0,055)	0,0395 (0,0225...0,04675)	0,068 (0,047...0,075)	0,032 (0,0245...0,04325)	$P_{x-y60}=0,006$ ; $P_{x-y90}=0,61$
Количество эпизодов замирания	44 (33,5...52,5)	39 (31...51,75)	36 (29...47)	39 (30,75...42,75)	$P_{x-y60}=0,307$ ; $P_{x-y90}=0,593$
Суммарное время замирания, с	127,1 (106,7...242,3)	169,1 (112...194,8)	114,8 (93,6...180,6)	154,95 (128,25...187,5)	$P_{x-y60}=0,445$ ; $P_{x-y90}=0,578$
Время во внутренней зоне, с	9,5 (2...24,85)	3,35 (0...7,7)	16 (3,8...24,1)	9,95 (5,2...12,575)	$P_{x-y60}=0,503$ ; $P_{x-y90}=0,086$
Дистанция во внутренней зоне, м	0,667 (0,32...2,331)	0,389 (0...1)	1,138 (0,62...2,229)	0,709 (0,50...0,93)	$P_{x-y60}=0,589$ ; $P_{x-y90}=0,403$
Время в средней зоне, с	33,1 (11,7...44,85)	12,1 (1,85...48,3)	54,9 (29,5...80,5)	56,7 (43...63,85)	$P_{x-y60}=0,015$ ; $P_{x-y90}=0,016$
Дистанция в средней зоне, м	2,162 (0,96...3,613)	1,3435 (0,24275...3,79)	4,695 (3,017...6,416)	3,7205 (2,36...4,16)	$P_{x-y60}=0,008$ ; $P_{x-y90}=0,15$
Время во внешней зоне, с	443 (419,65...461,85)	463,3 (415,9...477,9)	407 (379,1...434,5)	416,9 (410,5...426,3)	$P_{x-y60}=0,012$ ; $P_{x-y90}=0,1$
Дистанция во внешней зоне, м	17,935 (14,53...21,8)	15,794 (9,73...18,32)	23,832 (15,4...28,78)	11,3395 (8,9...15,175)	$P_{x-y60}=0,019$ ; $P_{x-y90}=0,15$
Количество пересеченных линий	102 (79,5...141)	87 (45,5...125,5)	181 (106...193)	86 (64...107,25)	$P_{x-y60}=0,004$ ; $P_{x-y90}=0,871$
Количество норковых рефлексов	11 (5...18,5)	9,5 (5,75...13,75)	19 (12...26)	11 (8,75...16,5)	$P_{x-y60}=0,076$ ; $P_{x-y90}=0,531$
Время, затраченное на обнюхивание «норок», с	4,8 (2,65...9,3)	2,95 (2,1...5,7)	10,4 (7,5...17,5)	5,4 (3,175...9,725)	$P_{x-y60}=0,037$ ; $P_{x-y90}=0,237$

### 3.1.2 Оценка проявлений аутизма

Как известно, аутизм, помимо нарушения социальных контактов, характеризуется наличием стереотипных движений: в данном случае – «рытья подстила», аутогруминга («умывания»), аутоагрессии. Оценка проявлений аутизма проводилась в тестах на «повторяющееся» поведение.

В тестах на стереотипное поведение (таблица 3) выявлено значимо более продолжительное умывание, увеличение времени рытья подстила и частоты повторяющихся движений у животных с экспериментальным аутизмом на сроках 60 и 90 суток, отмечается тенденция к удлинению этого времени с возрастом. Эпизодов аутоагрессии не выявлено.

Таблица 3 – Наличие стереотипного поведения у крыс в модели экспериментального аутизма, в сравнении с контролем

Признаки	Группы			
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)
Общее количество умываний	2 (1...3,5)	2,5 (1,75...3,25)	13 (11...18)	19,5 (9,5...22)
Уровни значимости	$p_{к-э60} < 0,001$ ; $p_{к-э90} < 0,001$			
Общая продолжительность умываний, с	43 (28...76,5)	51 (27...92,5)	189 (165...255)	283,5 (192,5...335,25)
Уровни значимости	$p_{к-э60} < 0,001$ ; $p_{к-э90} < 0,001$			
Количество эпизодов аутоагрессии	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)
Уровни значимости	$p_{к-э60} = 0,805$ ; $p_{к-э90} = 0,781$			
Количество эпизодов рытья подстила	3 (1,5...3)	2,5 (1,75...3,25)	8 (4...10)	13,5 (12...15,25)

Уровни значимости	$p_{к-э60} < 0,001; p_{к-э90} < 0,001$			
Продолжительность рытья подстилки, с	29 (21...50,5)	43 (29,75...45)	114 (85...162)	171 (144,5...209)
Уровни значимости	$p_{к-э60} < 0,001; p_{к-э90} < 0,001$			

Таким образом, чем старше животное с моделью аутизма, тем сильнее усугубляется его поведение наличием стереотипий.

### 3.1.3 Исследование эмоционального поведения животных в вальпроевой модели аутизма

У 50% людей с расстройствами аутистического спектра встречается тревожность, более выраженная у молодого поколения [211]. При этом молодые люди более склонны испытывать тревогу из-за их значительного коммуниктивного и социального дефицитов (например, трудности в понимании социальных сигналов) [216], повышенную чувствительность и сложность регуляции эмоций [33].

У крыс с экспериментальным аутизмом в 60-суточном возрасте значительно увеличилось время подвижности в приподнятом крестообразном лабиринте (таблица 4), в то время как животные из контрольной группы показали большую неподвижность. Такие результаты могут соответствовать синдрому гиперактивности и дефицита внимания, который, по последним исследованиям, характерен примерно для 30% детей с аутизмом [24]. Однако, уже в возрасте 90 суток, значимой разницы по этим показателям не получено.

В возрасте 60 суток значительно увеличено количество входов в закрытые рукава теста у группы с введением вальпроевой кислоты. Время нахождения в открытых рукавах у контрольных животных выше, причем отмечается тенденция к его увеличению в старшем возрасте, в то время как у животных с аутизмом тенденция обратная: крысы не стремятся проводить время в потенциально

опасной зоне, предпочитая закрытые, безопасные рукава. Эти данные свидетельствуют о повышенной тревожности аутистичных животных. Интересно отметить, что в экспериментальной группе время нахождения в центре, на пересечении потенциально опасной и безопасной зон, практически не изменяется с возрастом, в то время как у контроля оно уменьшается. Все вышеуказанное говорит о наличии у 60-суточных животных из группы с аутизмом поведенческого аналога синдрома гиперактивности и дефицита внимания, который с возрастом заметно регрессирует.

Таблица 4 – Оценка эмоционального поведения крыс в «Приподнятом крестообразном лабиринте» при пренатальном введении вальпроевой кислоты и физиологического раствора

Признаки	Группы				Уровни значимости
	Контроль		Аутизм		
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)	
Время подвижности, с	146,4 (125,4...181,5)	140,9 (129,35...150,6)	183 (152,5...210,8)	127,3 (110...144,2)	$P_{x-y0}=0,023$ ; $P_{x-y0}=0,205$
Время иммобильности, с	153,6 (118,5...174,6)	159,1 (149,5...170,7)	117 (89,2...147,5)	172,75 (155,8...189)	$P_{x-y0}=0,023$ ; $P_{x-y0}=0,205$
Количество пересеченных линий	34 (21...42)	29,5 (16,8...37)	41(28...51)	29 (25,5...35,3)	$P_{x-y0}=0,06$ ; $P_{x-y0}=0,547$
Количество входов в «закрытые» рукава	8 (4,5...10,5)	6,5 (4,8...9,3)	11(7...13)	8 (7...10,3)	$P_{x-y0}=0,091$ ; $P_{x-y0}=0,186$
Продолжительность нахождения в закрытых рукавах, с	108,7 (49,4...159,8)	63,6 (49,6...72,8)	141,4 (126,6...154,8)	193,6 (170,2...218,8)	$P_{x-y0}=0,042$ ; $P_{x-y0}=0,001$
Количество входов в «открытые» рукава	8 (6...11,5)	8 (5...11,25)	9 (9...12)	7 (5...8,25)	$P_{x-y0}=0,196$ ; $P_{x-y0}=0,516$
Продолжительность нахождения в открытых рукавах, с	136,3 (95,9...185,2)	209,8 (197,7...216,5)	98,3 (87,2...116,4)	54,1 (45,3...76)	$P_{x-y0}=0,034$ ; $P_{x-y0}=0,001$
Количество входов в центр	17 (11...21)	14,5 (8,8...18,5)	21 (14...26)	15 (12,8...18,3)	$P_{x-y0}=0,059$ ; $P_{x-y0}=0,423$
Продолжительность нахождения в центре, с	50,1 (35,8...71,7)	24,5 (18,3...33,2)	48,2 (38,5...67)	46,95 (35,2...65,9)	$P_{x-y0}=0,716$ ; $P_{x-y0}=0,039$

Таким образом, у крыс с вальпроевой моделью аутизма зафиксировано нарушение эмоционального поведения в виде появления тревожности и синдрома гиперактивности и дефицита внимания, характерных также, согласно последним данным, и для расстройств аутистического спектра.

### **3.1.4. Исследование неврологических рефлексов, физического развития животных, массы тела и головного мозга при пренатальном введении вальпроевой кислоты**

При пренатальном нарушении развития головного мозга крыс с помощью введения вальпроевой кислоты отмечается отставание по таким рефлексам, как открывание глаз и уровень мышечной силы на 15-е сутки (таблица 5), при этом уже на 16-е сутки мышечная сила этих животных практически не отличается от этого же показателя у контроля. В обеих группах животных отмечалось более раннее появление рефлекса переворачивания на плоскости (считается, что в среднем это происходит на 6-7 день). В целом, уровень нейропсихического и физического развития у обеих групп животных значимо не отличается, что свидетельствует об отсутствии значимой задержки нейропсихического развития в модели с пренатальным введением вальпроевой кислоты. Уровень рождаемости в группах примерно одинаков, случаев мертворождения и смерти на 7-е сутки развития не зафиксировано.



Таблица 5 – Оценка нейропсихического и физического развития животных при пренатальном введении вальпроевой кислоты (группа с аутизмом) и физиологического раствора (группа контроля)

Признаки	Группы		Уровень значимости
	Контроль	Аутизм	
Количество мертворожденных	0 (0...0)	0 (0...0)	p=0,584
Количество мертвых животных на 7 сутки	0 (0...0)	0 (0...0)	p=0,584
Количество животных в помете	7 (7...8)	6,5 (4,5...7,75)	p=0,465
Появление рефлекса «Отрицательный геотаксис»	7 (7...7,75)	7 (6,25...7)	p=0,704
Отлипание ушей	3 (3...3)	3 (3...3)	p=0,518
Прорезывание резцов	8,5 (8...9)	8 (7...8)	p=0,184
Появление рефлекса поднимания головы и передних лап	8,5 (8...9)	9 (8...9)	p=0,69
Появление рефлекса переворачивания на плоскости	3,5 (3...4)	4 (3,25...4)	p=0,518
Появление рефлекса поиска гнезда	10 (9,25...10)	10 (10...11)	p=0,074
Появление рефлекса ольфакторной дискриминации	11 (10...11)	10,5 (10...11)	p=0,805
Появление волосяного покрова	5 (5...5)	5 (4...5)	p=0,271
Появление опоры на задние конечности	14 (14...14)	14 (14...14)	p=0,894
Открытие глаз	15 (15...15,75)	16 (15...17)	p=0,014
Вес животных на 7 сутки	13,5 (10,25...15)	13 (12...14,75)	p=0,704
Вес животных на 14 сутки	23 (19,25...23,75)	21,5 (15...26)	p=0,569
Уровень мышечной силы на 15 сутки (по 5-балльной системе)	4 (4...5)	4 (3...4)	p=0,035
Уровень мышечной силы на 16 сутки (по 5-балльной системе)	5 (4...5)	4 (4...5)	p=0,27
Уровень мышечной силы на 17 сутки (по 5-балльной системе)	5 (5...5)	5 (5...5)	p=0,184

Оценка неврологического статуса животных по шкале NSS (таблица 6) не выявила значимых различий между группами с введением вальпроевой кислоты и физиологического раствора, что говорит об отсутствии неврологического дефицита у этих животных.

Таблица 6 – Неврологический статус крыс по шкале NSS при экспериментальном аутизме

Признаки	Группы			
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)
Сумма баллов	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)
Уровни значимости	$p_{к-э60} = 0,589$ ; $p_{к-э90} = 0,89$			

Таким образом, вальпроевая кислота не оказывает значимого патогенного воздействия на общее развитие сенсорной, двигательной, координаторной сферы.

Оценка массы тела и головного мозга проводилась на 5, 15, 25, 60, 90 сутки постнатального периода. При экспериментальном аутизме отмечается значимое увеличение массы головного мозга (таблица 7) по сравнению с контролем на протяжении всего постнатального периода. В то же время, у животных с аутизмом наблюдается тенденция к увеличению массы тела, которая достигает максимального различия с контрольной группой на 25-е сутки, а затем меняется в противоположную сторону: на 90-е сутки зафиксировано отставание в наборе массы тела от животных с пренатальным введением изотонического раствора NaCl.

Таким образом, при экспериментальном аутизме отмечается увеличение массы головного мозга, что согласуется с литературными данными о превышающем возрастные нормы увеличении головного мозга при аутизме у детей [205], тенденция сначала к чрезмерному набору веса до 25 суток, а затем снижение массы тела, по сравнению с контролем.

Таблица 7 – Оценка веса тела и головного мозга животных с моделью аутизма и контроле

Группа	Вес тела, г	Вес мозга, г	Уровень значимости
Контроль P5 (n=6)	10,8 (10,35...11,33)	0,94 (0,88...0,99)	$P_{\text{к-э тело}}=0,786$
Аутизм P5 (n=10)	10,6 (10,18...11,53)	1,02 (0,99...1,05)	$P_{\text{к-э мозг}}=0,074$
Контроль P15 (n=8)	23,75 (22,63...25,25)	1,09 (1,02...1,14)	$P_{\text{к-э тело}}=0,651$
Аутизм P15 (n=6)	24,5 (22,95...25,75)	1,31 (1,22...1,34)	$P_{\text{к-э мозг}}=0,001$
Контроль P25 (n=7)	47,5 (44,5...48,25)	1,25 (1,18...1,28)	$P_{\text{к-э тело}}=0,001$
Аутизм P25 (n=7)	62,5 (61,25...62,93)	1,6 (1,5...1,63)	$P_{\text{к-э мозг}}=0,001$
Контроль P60 (n=7)	119,5 (105...121,25)	1,5 (1,42...1,56)	$P_{\text{к-э тело}}=0,012$
Аутизм P60 (n=9)	128 (125...134)	1,66 (1,61...1,69)	$P_{\text{к-э мозг}}=0,006$
Контроль P90 (n=16)	224 (187...252,75)	1,73 (1,66...1,76)	$P_{\text{к-э тело}}=0,186$
Аутизм P90 (n=12)	194 (189,5...205,5)	1,91 (1,82...1,95)	$P_{\text{к-э мозг}}=0,001$

### 3.1.4 Социальное распознавание в вальпровой модели аутизма

Социальная активность является одним из ключевых объектов исследования при расстройствах аутистического спектра, так как именно нарушения в социальной сфере наиболее характерны для любого из этих расстройств. Оценка участия крыс в социальных взаимодействиях с другими животными проводилась в тестах «социальный пятипопыточный» на 25-е сутки развития (таблица 9), «3-камерная активность» (таблицы 10, 11), «с трубой на агрессию» (таблица 8) на 60-е и 90-е сутки.

Для аутизма, как известно, характерно поражение социального взаимодействия, которое может проявляться как обеднением социальных контактов, уменьшением их количества, нарушением распознавания других особей, так и проявлением агрессии к ним. В тесте на агрессию с трубой (таблица 8) выявлено значимое различие между опытом и контролем как на 60-е, так и на 90-е сутки постнатального развития, в сторону увеличения количества побед животных с моделью аутизма, что согласуется с литературными данными о повышенной агрессивности у людей с аутизмом [6, 26, 195].

Таблица 8 – Оценка социального взаимодействия крыс в тесте с трубой на агрессию в опыте и контроле на 60 и 90 сутки постнатального периода

Признаки	Группы			
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)
Наличие агрессии (количество побед при выполнении теста)	2 (1...3)	2 (1...3)	3 (2...4)	3 (2...4)
Уровни значимости	$p_{к-э60}=0,004$ ; $p_{к-э90}=0,012$			

Таким образом, при экспериментальном аутизме отмечается повышенный уровень агрессии, в сравнении с контролем.

У крыс с экспериментальным аутизмом заметно страдает социальная память (таблица 9), о чем свидетельствует отсутствие различий между временем

распознавания старого животного (4 попытка) и нового (5 попытка) ( $p=0,14$ ), в то время как в контрольной группе время, затраченное на контакт с «новым» животным, значимо выше ( $p < 0,001$ ). При этом значимые различия в сравнении с контролем отмечаются уже с 3-й попытки – при пренатальном введении физиологического раствора от первой до четвертой попытки отмечается выраженная тенденция к снижению продолжительности контакта (социального интереса), что обусловлено адаптацией к уже знакомому животному, и увеличение время контакта в пятой попытке при подсаживании нового интродера (нового социального «стимула»).

Таким образом, при экспериментальном аутизме страдает социальное распознавание: знакомое животное воспринимается как ранее не знакомое.

Таблица 9 – Оценка социального интереса у крыс в социальном пятипопыточном тесте на 25-е сутки после рождения при экспериментальном аутизме

Группа животных	Время контакта с интродером, с				
	1 попытка	2 попытка	3 попытка	4 попытка	5 попытка
Контроль	48 (42...51)	41 (35...44,5)	36 (30,5...37)	25 (21...32,5)	45 (38,5...49)
Аутизм	45 (39...48)	42 (40...46)	41 (37...45)	41 (36...44)	41 (38...46)
Уровни значимости	$p=0,069$	$p=0,105$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,145$

По литературным данным, у пациентов с аутизмом расстройства социальной сферы связывают с ухудшением социального интереса, с нарушением функции программирования и контроля. Такие данные говорят об отсутствии гибкости поведения, о снижении участия в социальном взаимодействии, требующем быстрого анализа и подбора подходящей реакции на изменение внешних условий [1].

При анализе поведения животных в тесте «3-камерная активность» обнаружено несколько значимых изменений в опытной группе в сравнении с контролем (таблицы 10, 11): во второй сессии (при помещении иммобилизованного «незнакомца» в одну из камер) в группе с пренатальным

введением вальпроевой кислоты выявлено увеличение количества входов в правый отсек (без незнакомого животного) и времени, проведенном в нем на 60-е сутки по сравнению с контролем, причем в контрольной группе можно проследить тенденцию к уменьшению входов этот отсек, но при этом увеличивается продолжительность времени нахождения в нем. Во второй сессии также обнаружено значимое увеличение числа входов в центральный отсек у группы с аутизмом на 90-е сутки развития.

Таблица 10 – Особенности социального взаимодействия крыс, выявленные в тесте «3-камерная активность», 2 сессия.

Признаки	Группы			Уровни значимости
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР90 (n=12)	
Количество входов в левый отсек (с имобилизованным «незнакомцем»)	7 (3...15,5)	9 (4,75...16,25)	8 (5...11,25)	$p_{\text{к-э}0}=0,793$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,318$
Время в левом отсеке (с имобилизованным «незнакомцем»)	77,5 (20,5...220,35)	75,35 (39,7...165)	62,4 (18,8...97,875)	$p_{\text{к-э}0}=0,227$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,546$
Количество входов в правый отсек	14 (4...17,5)	6,5 (4...14)	23 (14...46)	$p_{\text{к-э}0}=0,009$ ; $p_{\text{к-э}0}<0,001$
Время в правом отсеке	137,6 (19,45...262,9)	201,75 (67,03...312,63)	287,95 (170,33...359,35)	$p_{\text{к-э}0}=0,027$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,816$
Количество входов в центр	10 (4...16)	11 (6,75...16)	12,5 (9...15)	$p_{\text{к-э}0}=0,495$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,002$
Время в центре	183 (54,8...254,2)	180,35 (73,25...264,5)	126,55 (84,75...190,13)	$p_{\text{к-э}0}=0,773$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,353$
Количество обнюхиваний «незнакомца»	11 (2,5...27,5)	32 (9...41,75)	28 (8,5...68)	$p_{\text{к-э}0}=0,098$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,365$
Время контакта с «незнакомцем»	31,2 (10,9...57,85)	65,55 (39,8...72,5)	64,1 (29,08...107,375)	$p_{\text{к-э}0}=0,059$ ; $p_{\text{к-э}0}=0,07$

Таблица 11 – Оценка социального взаимодействия у крыс в 3 сессии теста «Зкамерная активность»

Признаки	Группы			Уровни значимости
	Контроль		Аутизм	
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	
Количество входов в левый отсек имобилизованным «знакомым»)	7 (1...14)	3 (0...8,5)	ЭР90 (n=12) 18 (7,75...29,75)	$P_{x-s60}=0,016$ ; $P_{x-s60}=0,002$
Время в левом отсеке (с имобилизованным «знакомым»), с	60,3 (2,05...279,4)	33,15 (0...82,8)	109,6 (74,7...174,3)	$P_{x-s60}=0,864$ ; $P_{x-s60}=0,046$
Количество входов в правый отсек (с имобилизованным «незнакомцем»), с	10 (3,5...18,5)	5,5 (3...19,25)	17,5 (8,5...22)	$P_{x-s60}=0,168$ ; $P_{x-s60}=0,227$
Время в правом отсеке (с имобилизованным «незнакомцем»), с	184 (48,4...286,05)	233,5 (162,65...343,48)	167,65 (102,55...219,88)	$P_{x-s60}=0,753$ ; $P_{x-s60}=0,115$
Количество входов в центр	8 (1...12,5)	6 (1...10)	14 (9...21,25)	$P_{x-s60}=0,045$ ; $P_{x-s60}<0,001$
Время в центре, с	86,7 (39,25...254,35)	146,55 (83,85...272,43)	271,8 (213,8...372,25)	$P_{x-s60}=0,478$ ; $P_{x-s60}=0,023$
Количество обнюхиваний ранее знакомого	5 (0...7,5)	3 (0...11,5)	25 (9,75...41)	$P_{x-s60}=0,003$ ; $P_{x-s60}=0,005$
Время контакта с ранее знакомым, с	4 (0...33,9)	4,35 (0...20,45)	65,95 (19,03...100,85)	$P_{x-s60}=0,004$ ; $P_{x-s60}=0,002$
Количество обнюхиваний «незнакомца»	12 (4,5...36,5)	12,5 (5,5...21,25)	14 (7...25)	$P_{x-s60}=0,937$ ; $P_{x-s60}=0,963$
Время контакта с «незнакомцем», с	47 (27,55...78)	28,7 (21,7...48,6)	28,25 (15,4...53,3)	$P_{x-s60}=0,194$ ; $P_{x-s60}=0,33$



В ходе третьей сессии (с иммобилизированными «знакомым» в левом и «незнакомым» в правом отсеке) отмечаются более частые входы в левый отсек у животных с аутизмом на сроках 60 и 90 суток от рождения с тенденцией к их учащению, причем на 90-е сутки отмечается и увеличение продолжительности нахождения в указанном отсеке у этих животных. При этом у группы контроля отмечается уменьшение времени пребывания и входов в отсек с ранее знакомым животным. Чем старше животное, тем меньше становятся эти показатели. Крысы с РАС значимо чаще входят и больше по времени пребывают в центральном отсеке без иммобилизированных интродеров, что говорит, вероятно, о стереотипном поведении и стремлении животных избегать социальных контактов. У группы экспериментальных животных обнаружено и нарушение социального контакта в виде значимого увеличения продолжительности взаимодействия с ранее знакомым животным при сравнении с животными из контрольной группы, при этом нарушения социального интереса к новому животному не выявлено.

Таким образом, при экспериментальном аутизме отмечается нарушение социальной коммуникации, которое прогрессирует с возрастом.

### **3.1.5 Оценка когнитивных функций при пренатальном нарушении развития головного мозга и в контроле**

Память - одно из ключевых свойств нервной системы, направленное на сохранение информации о событиях внешнего мира и реакциях организма на эти события, а способность неоднократно воспроизводить и изменять эту информацию. Память как у людей, так и у животных, в основном, регулируется гиппокампом.

Тест на распознавание нового объекта позволяет оценить пластичность обучения и непространственную память у животных на такие свойства объектов, как текстура, форма, запах (таблица 12). Оценка проводилась на 25-е сутки развития.

Таблица 12 – Оценка непространственной памяти в тесте на распознавание нового объекта у крыс контрольной и экспериментальной групп

Признаки	Группы		Уровень значимости
	Контроль	Аутизм	
Продолжительность обнюхивания кубиков в 1 сессии, с	68 (55,5...99)	87 (77...114)	$p_{к-э}=0,091$
Продолжительность обнюхивания кубика («знакомый» объект) во 2 сессии, с	26 (16...35)	28 (15...33)	$p_{к-э}=0,991$
Продолжительность обнюхивания пирамидки («незнакомый» объект) во 2 сессии, с	67 (45...86,5)	65 (54...78)	$p_{к-э}=0,991$

В данном тесте обнаружено отсутствие когнитивных расстройств в контроле и при экспериментальном аутизме. При этом отмечается высокая пластичность обучения, которая выражается в значимо большей ( $p<0,001$ ) продолжительности обнюхивания незнакомого, нового объекта, по сравнению с уже известным в обеих группах.

Пространственная кратковременная и долговременная память исследовалась при помощи «Водного лабиринта Морриса» (таблица 13). Критерием нормальной когнитивной функции при исследовании считается достижение спрятанной под водой платформы менее, чем за 15 секунд во время 4-й попытки 4-го дня тестирования. В данном тесте значимых различий между группами контроля и эксперимента в возрасте 60 и 90 суток не обнаружено.

Таблица 13 – Оценка пространственной памяти крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

Признаки	Группы				Уровни значимости
	Контроль		Аутизм		
	КР60 (n=23)	КР90 (n=16)	ЭР60 (n=21)	ЭР90 (n=12)	
1 попытка 1 дня теста	60 (54,5...60)	27,5 (21,25...57,75)	60 (57...60)	53 (28,25...60)	$p_{x-y60}=0,888$ ; $p_{x-y90}=0,246$
2 попытка 1 дня теста	48 (38,5...60)	22 (13,5...39,75)	53 (38...60)	41 (24,25...60)	$p_{x-y60}=0,698$ ; $p_{x-y90}=0,088$
3 попытка 1 дня теста	36 (29,5...59)	12,5 (9...23)	41 (25...60)	32 (7,5...43,75)	$p_{x-y60}=0,833$ ; $p_{x-y90}=0,237$
4 попытка 1 дня теста	15 (10...39)	16,5(11...40,25)	37 (22...60)	20 (15,75...27,25)	$p_{x-y60}=0,148$ ; $p_{x-y90}=0,835$
4 попытка 2 дня теста	28 (18,5...46)	11,5 (7,75...18,5)	40 (9...58)	7,5 (5,5...25,25)	$p_{x-y60}=0,953$ ; $p_{x-y90}=0,307$
4 попытка 3 дня теста	18 (9,5...26)	11 (8...15,5)	22 (9...47)	6,5 (3...13,5)	$p_{x-y60}=0,488$ ; $p_{x-y90}=0,926$
4 попытка 4 дня теста	12 (8,5...19)	8,5 (6,75...17)	12 (7...22)	12 (8...16,25)	$p_{x-y60}=0,934$ ; $p_{x-y90}=0,472$

Таким образом, при пренатальном введении вальпроевой кислоты не наблюдается нарушений пространственной и непространственной памяти на исследуемых сроках развития, однако, возможно отсроченное влияние на когнитивные функции.

### **3.1.6 Уровень окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и миндалине на 60 и 90 сутки развития при экспериментальном аутизме и в контрольной группе**

Окситоцин – пептидный гормон, вырабатывающийся в гипоталамусе и накапливающийся в задней доле гипофиза. Недостаточная секреция окситоцина ассоциирована с развитием аутизма [49]. В последнее время появилась информация об его влиянии на функционирование лимбической системы: связывание окситоцина с рецепторами в клетках гиппокампа регулируется глюкокортикоидами, окситоцин корректирует поведенческие реакции гиппокампа за счет влияния на глюкокортикоидный механизм [97].

Оценка уровня окситоцина проводилась методом ИФА и выражалась в пг/мл. Исследование показало значимые различия между контрольной и опытной группами (приложение Ж). Наиболее выраженные различия отмечались в гипоталамо-гипофизарной системе с тенденцией к увеличению разницы в возрасте P60 и P90 (рисунки 4, 5), в миндалине головного мозга - на 90-е сутки развития (рисунок 6).

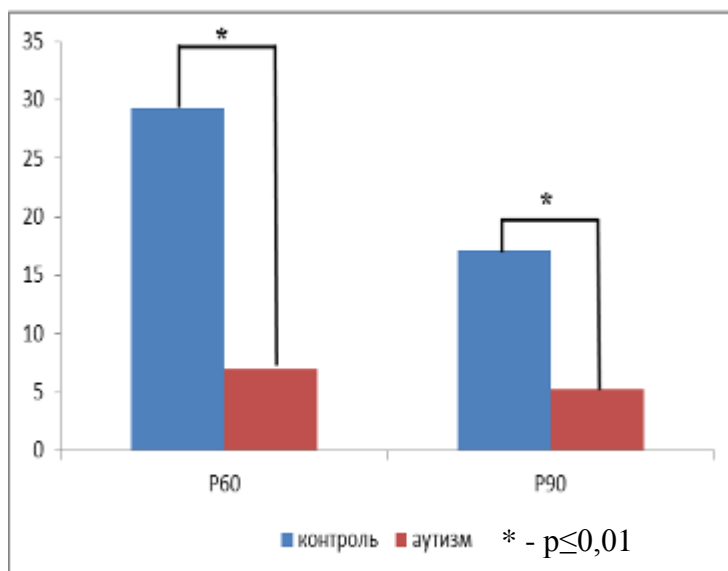


Рисунок 4 – Уровень окситоцина в гипоталамусе на 60 и 90 сутки у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

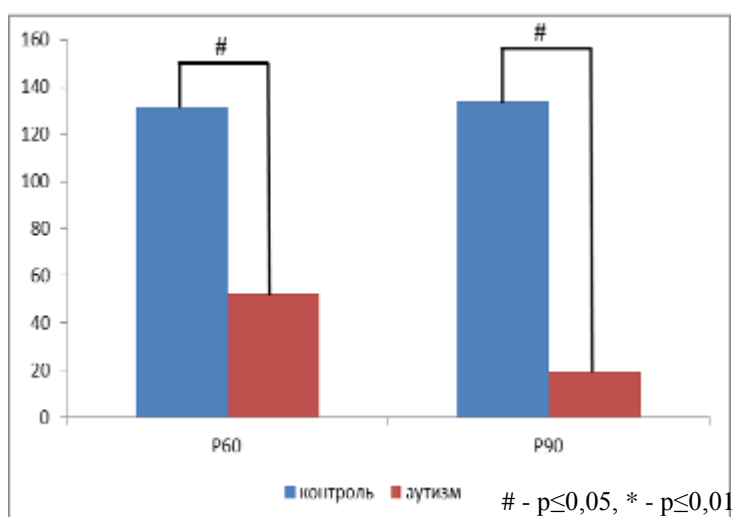


Рисунок 5 – Уровень окситоцина в гипофизе на 60-90 сутки у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

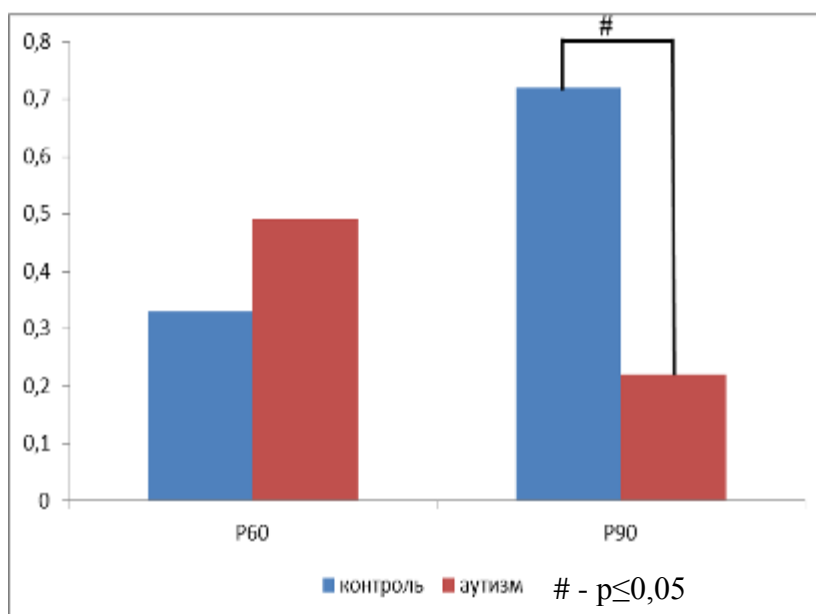


Рисунок 6 – Уровень окситоцина в базолатеральной миндалине на 60 и 90 сутки развития крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Таким образом, при экспериментальном аутизме выявлен низкий уровень окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе в период постнатального развития P60-P90 и в лимбической системе на P90, что, с одной стороны, подтверждает воспроизводимость симптомов аутизма при использованной модели с учетом ключевого патогенетического звена (недостаточность центральной секреции окситоцина), с другой стороны, свидетельствует о снижении уровня окситоцина в миндалине головного мозга, демонстрирующей выраженные признаки нейровоспаления.

### **3.2 Оценка экспрессии маркеров нейровоспаления, синаптогенеза и апоптоза в ткани головного мозга**

В нашем исследовании мы сфокусировали свое внимание на оценке экспрессии маркеров нейровоспаления, синаптогенеза и апоптоза в клетках базолатеральной миндалины, зубчатой извилины гиппокампа и энторинальной коры головного мозга крыс (рисунок 7).

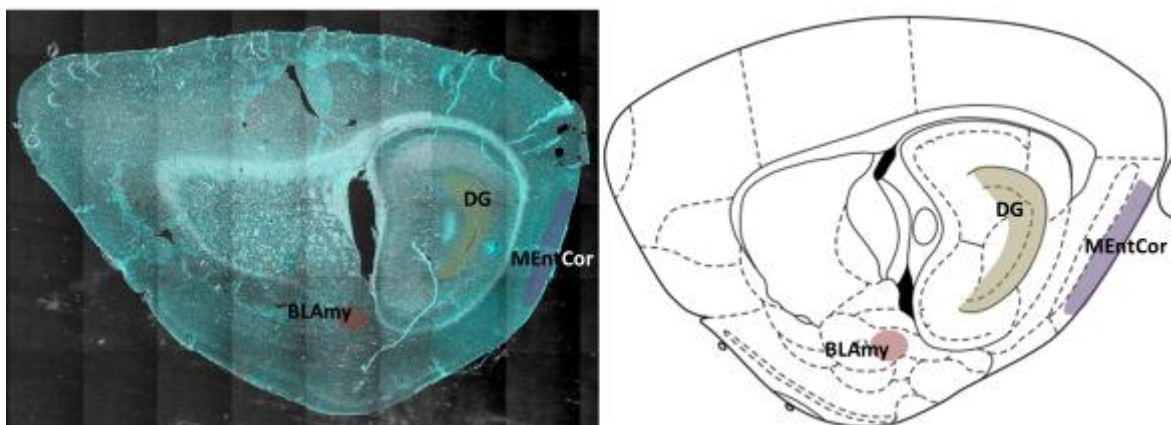


Рисунок 7 – Исследуемые зоны головного мозга крыс (обозначены цветами) на парафиновом срезе (DAPI+фазовый контраст) и рисунке из стереотаксического атласа G. Paxinos [163]: DG (оливковый цвет) – зубчатая извилина гиппокампа, BLAmy (розовый цвет) – базолатеральная миндалина (ядра), MEntCor (фиолетовый цвет) – энторинальная кора (медиальная часть).

### 3.2.1 Оценка апоптоза в клетках головного мозга крыс при пренатальном введении вальпроевой кислоты

Определение апоптоза проводилось методом TUNEL на срезах головного мозга крыс. Срезы окрашивались согласно стандартному протоколу (приложение Е). Подсчитывались FITC-позитивные клетки (рисунок 8) и вычислялся процент апоптотических клеток.

Выявлено значимое уменьшение количества апоптотических клеток во всех регионах мозга в группе экспериментального аутизма, за исключением коры, в возрасте 60 и 90 суток и гиппокампа на 90-е сутки постнатального развития (таблица 14). В пользу торможения апоптоза говорят показатели уровня клеточности (количество клеток в поле зрения, которое определялось по числу ядер, окрашенных пропидия йодидом, таблица 15) – при экспериментальном аутизме отмечается тенденция к увеличению числа в клеток в исследуемых регионах в сравнении с контролем и значимо отличается в гиппокампе на 60-е и 90-е сутки, коре на 5-е и 15-е сутки и миндалине на всех сроках, кроме 25 суток.

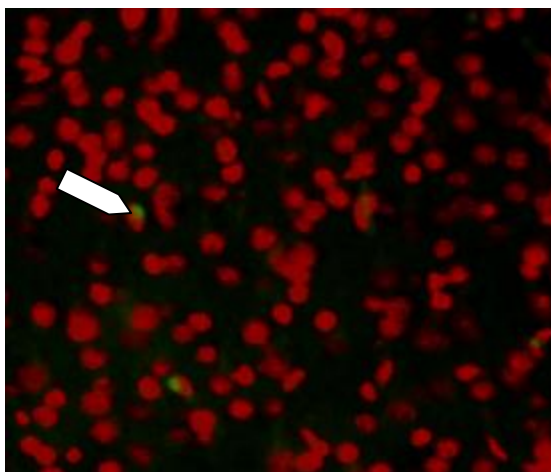
Таблица 14 - Количество апоптотических клеток в головном мозге крыс с экспериментальной моделью аутизма и в контроле, %

	Гиппокамп		Кора		Миндалина	
	контроль	аутизм	контроль	Аутизм	контроль	аутизм
P 5	9,87 (8,41...10,71)	2,05 (1,59...2,99)	14,43 (10,46...16,67)	2,27 (1,88...2,92)	12,96 (12,85...13,2)	4,09 (3,77...4,41)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,011	
P 15	11,13 (8,7...14,62)	4,08 (3,29...5,48)	14,92 (12,8...16,64)	5,14 (4,85...7,72)	9,6 (6,93...10,75)	2,88 (2,56...4,13)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,003	
P 25	9,82 (8,19...11,85)	4,06 (3,12...4,92)	9,72 (8,11...14,23)	4,99 (4,09...6,45)	8,65 (6,98...8,9)	2,2 (1,35...4)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,011	
P 60	6,42 (5,52...7,62)	3,93 (3,07...4,83)	5,95 (5,57...7,1)	5,31 (4,18...6,55)	7,83 (7,67...8,2)	5,58 (5,22...6,12)
Уровень значимости	p<0,001		p=0,141		p=0,025	
P 90	5,89 (5,1...6,24)	6,52 (4,86...7,83)	6,85 (6,09...7,54)	5,12 (4,35...6,55)	6,90 (6,84...6,97)	3,44 (2,46...4,47)
Уровень значимости	p=0,459		p=0,141		p=0,025	

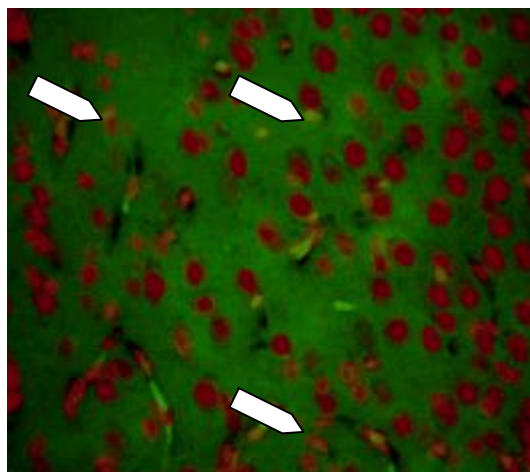


Таблица 15— Число клеток в исследуемых регионах мозга у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

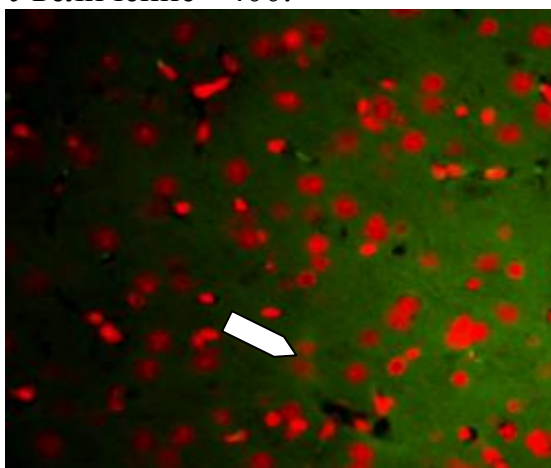
	Гиппокамп		Кора		Миндалина	
	контроль	аутизм	контроль	Аутизм	контроль	аутизм
P 5	914 (790,5...1039,5)	1080 (829...1154)	688 (617,8...928,5)	957 (842,5...1097)	463 (447,25...479,5)	1003 (949...1062)
Уровень значимости	p=0,121		p=0,004		p=0,02	
P 15	594 (565...664,5)	677 (597...710)	517 (475,5...559,25)	590 (531...711)	576 (560...649,5)	672 (630,5...740,75)
Уровень значимости	p=0,146		p=0,016		p=0,013	
P 25	442 (302...543,5)	516 (487,5...569)	445 (428,25...674,75)	551 (529...639,5)	331 (255,5...541,5)	364 (316,75...646,25)
Уровень значимости	p=0,067		p=0,059		p=0,273	
P 60	361 (327,75...427)	477 (451,5...516)	398 (354,75...491,5)	448 (376,5...483,5)	266 (224...277,25)	388 (326,5...409,5)
Уровень значимости	p<0,001		p=0,648		p=0,044	
P 90	677 (650...734,5)	311 (286...437,5)	354 (331...391)	430 (407...464,25)	354 (310...398)	418 (384,75...485)
Уровень значимости	p<0,001		p=0,003		p=0,042	



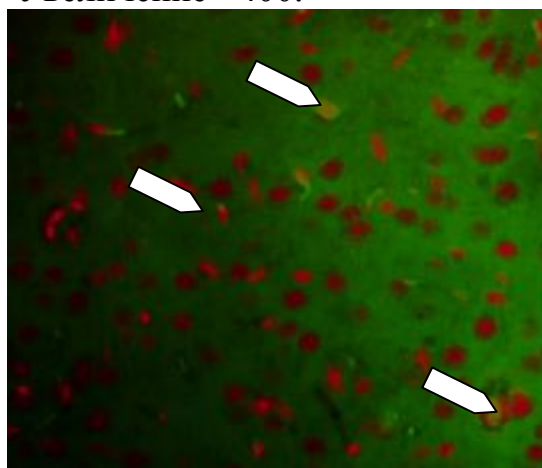
А. Гиппокамп крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$ .



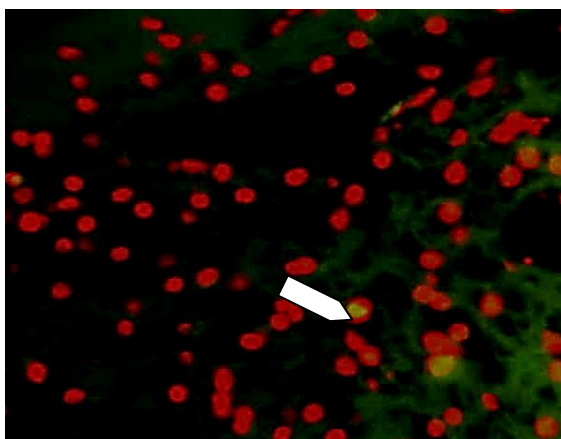
Б. Гиппокамп крысы из группы контроля  
Увеличение  $\times 400$ .



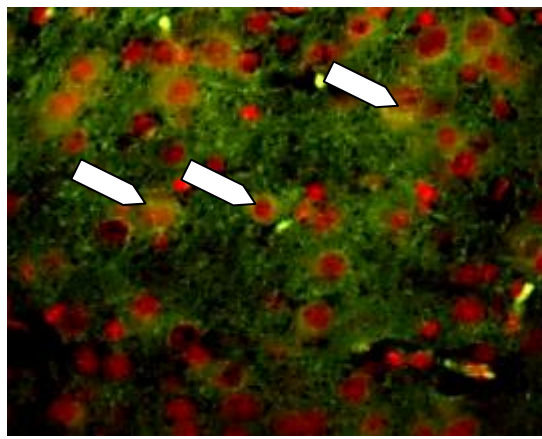
В. Кора крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$ .



Г. Кора крысы из группы контроля  
Увеличение  $\times 400$ .



Д. Миндалины крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$



Е. Миндалины крысы из группы контроля  
Увеличение  $\times 400$

Рисунок 8 – Апоптоз в гиппокампе (А, Б), коре (В, Г) и миндалине (Д, Е) головного мозга крыс Р60 в вальпроевой модели аутизма и контроле (стрелками указан TUNEL+-материал).

Таким образом, пренатальное введение вальпроевой кислоты сопровождается уменьшением апоптоза в гиппокампе, коре и миндалине, что свидетельствует об угнетении физиологической гибели при экспериментальном аутизме. Это согласуется с имеющимися данными об изменении апоптоза при аутизме: отмечаются процессы его торможения в эмбриональном и постнатальном периодах [214].

### **3.2.2 Уровень экспрессии интерлейкина-1 $\beta$**

Интерлейкин-1 $\beta$  является одним из провоспалительных цитокинов, уровень которого значимо возрастает при нейровоспалении. При оценке внеклеточной экспрессии интерлейкина-1 $\beta$  (таблица 16) выявлено значимое ее увеличение при экспериментальном аутизме в сравнении с контролем (рисунки 9, 10), отмечается тенденция к ее увеличению от 5 до 25 суток, а затем – значимое снижение к 90-м суткам развития. При этом, в контрольной группе имеется обратная тенденция к уменьшению экспрессии с 5 до 25 суток, а на 60-х и 90-х сутках ее вовсе не отмечается. Если рассматривать хроническую нейродегенерацию в зрелом возрасте, то при экспериментальной болезни Альцгеймера также отмечается высокий уровень интерлейкина-1 $\beta$ : его относительная площадь экспрессии составляет в гиппокампе 3,58 (2,08...4,66), в коре 4,17 (3,52...6,5), в миндалине 4,42 (3,08...5,86) (рисунок 11).

Таким образом, выявлена повышенная экспрессия интерлейкина-1 $\beta$  в аффектированных регионах мозга при хронической нейродегенерации и при нарушении развития головного мозга.

Таблица 16 - Относительная площадь экспрессии, %, интерлейкина-1 $\beta$ , в ткани головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

	Гиппокамп		Кора		Миндалина	
	контроль	аутизм	контроль	Аутизм	контроль	аутизм
P 5	0,62 (0,49...0,69)	5,86 (4,17...6,47)	0,53 (0,28...0,67)	6,16 (4,58...7,15)	-	-
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001			
P 15	0,17 (0...0,26)	10,18 (5,32...12,34)	0,13 (0...0,22)	12,83 (9,53...17,71)	0,09 (0...0,21)	9,19 (8,41...9,55)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,001	
P 25	0,02 (0...0,15)	14,55 (12,28...16,5)	0 (0...0,03)	11,67 (10,19...13,29)	0,08 (0...0,29)	7,4 (5,97...9,22)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,002	
P 60	0 (0...0)	5,4 (4,68...8,74)	0 (0...0)	9,5 (5,26...10,54)	0 (0...0)	6,93 (5,89...7,17)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
P 90	0 (0...0)	6,18 (4,41...6,44)	0 (0...0)	5,6 (4,69...6,77)	0 (0...0)	4,08 (3,78...5,49)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	

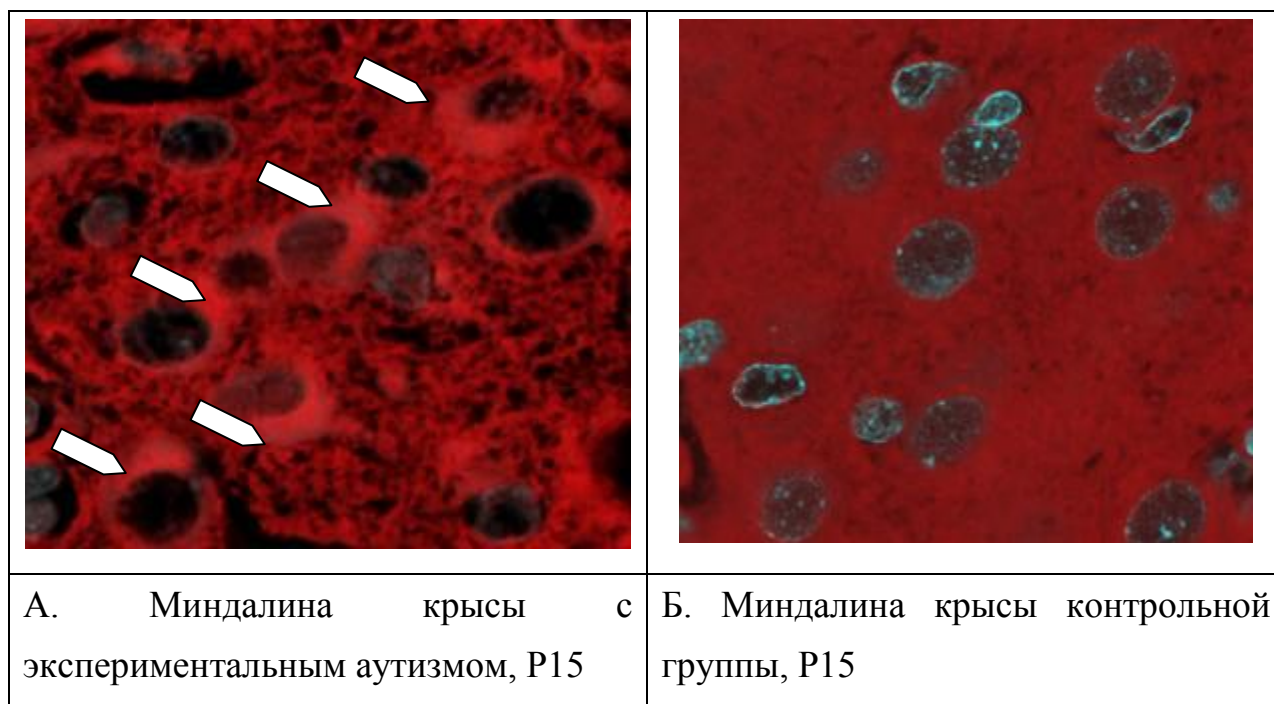


Рисунок 9 – экспрессия интерлейкина-1 $\beta$  в базолатеральной миндалине головного мозга крыс с пренатальным введением вальпроевой кислоты (А) и физиологического раствора (Б), увеличение x1800.

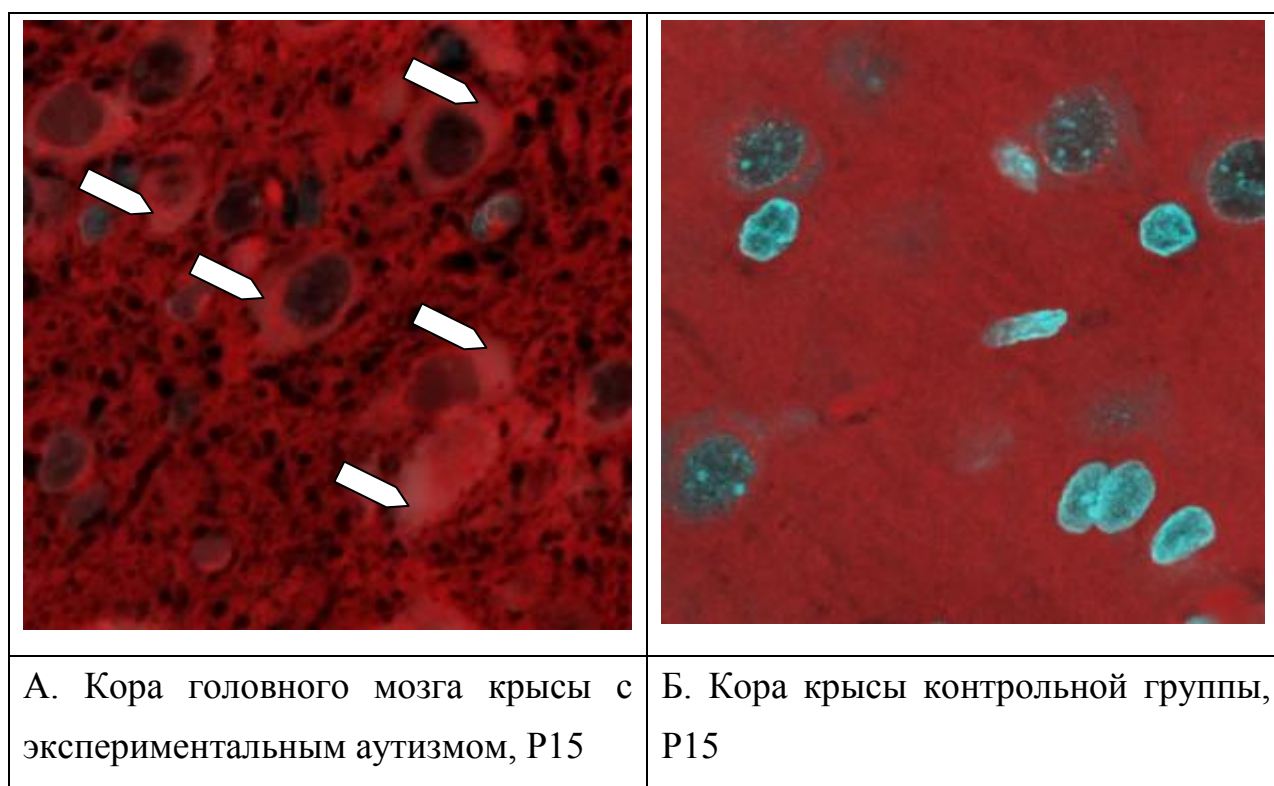


Рисунок 10 – экспрессия интерлейкина-1 $\beta$  в энторинальной коре головного мозга крыс с пренатальным введением вальпроевой кислоты (А) и физиологического раствора (Б), увеличение x1800.

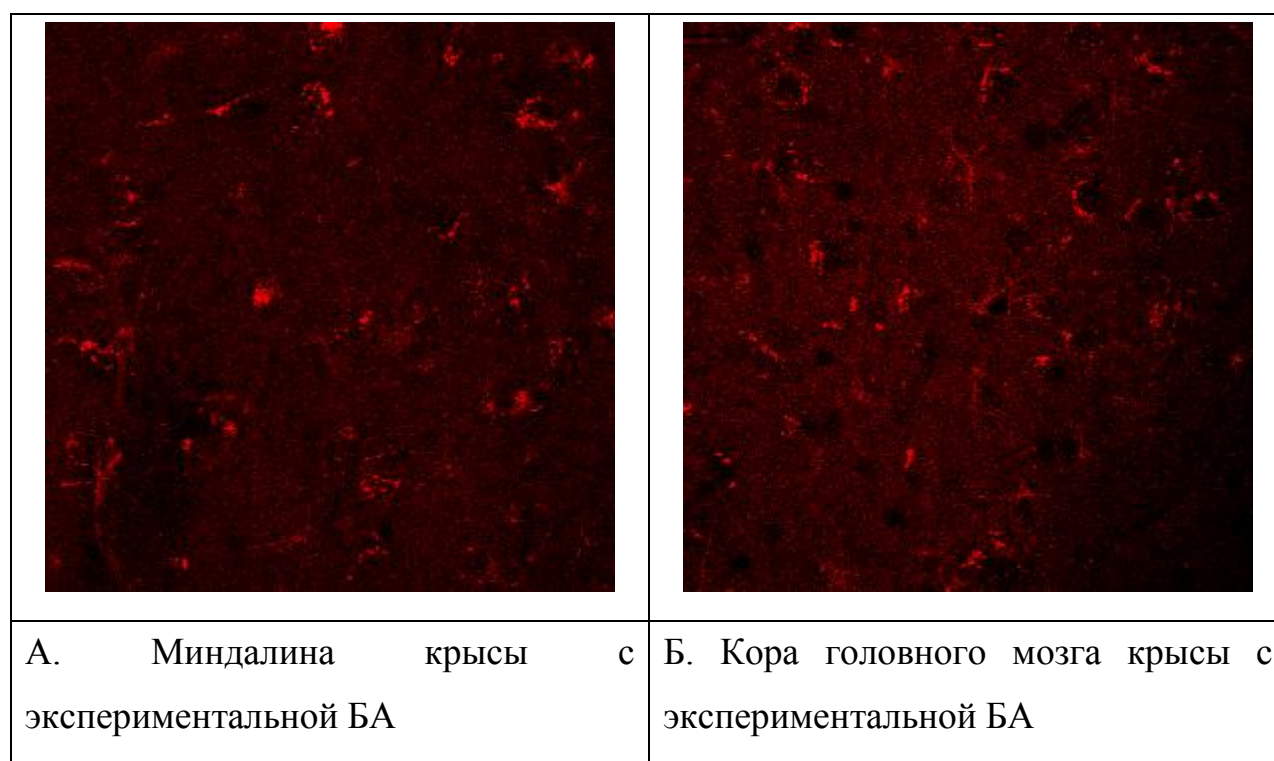


Рисунок 11 – экспрессия интерлейкина-1 $\beta$  в базолатеральной миндалине (А) и в энторинальной коре (Б) головного мозга крыс при экспериментальной болезни Альцгеймера, увеличение  $\times 600$ .

### 3.2.3 Уровень экспрессии HMGB1

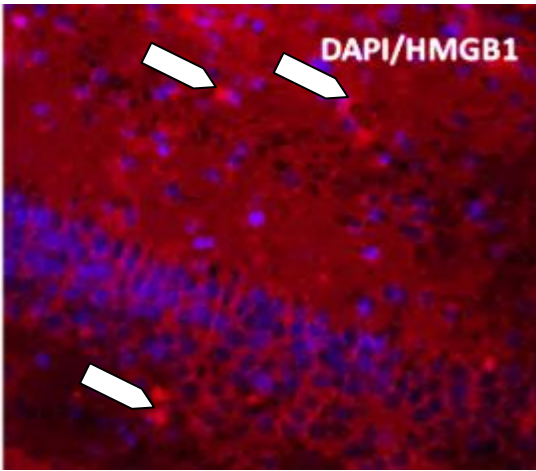
HMGB1 – белок, эндогенный сигнал опасности или «алармин», который выступает посредником активации врожденного иммунного ответа, включая хемотаксис и высвобождение провоспалительных цитокинов. Уровень экспрессии HMGB1 (таблица 17), как и в случае интерлейкина, оценивали по относительной площади экспрессии (рисунок 12). При анализе отмечается значимое увеличение площади экспрессии HMGB1 при экспериментальном аутизме во всех исследуемых регионах головного мозга с тенденцией к увеличению площади с 5-х к 25 суткам в гиппокампе; в коре и миндалине аналогичное изменение наблюдалось с 5-х до 15-х суток, затем была выявлена тенденция к уменьшению площади экспрессии. В контрольной группе отмечались изменения, напоминающие динамику в экспериментальной группе, но с меньшим уровнем экспрессии HMGB1.

Таким образом, при пренатальном введении вальпроевой кислоты зарегистрирована повышенная экспрессия HMGB1 в гиппокампе, коре, миндалине, что соответствует увеличению высвобождения этого белка во внеклеточное пространство при повреждении клеток, где он становится сигналом для активации эффекторных клеток воспаления, экспрессирующих Mas1 (микроглия), или TLR-рецепторов, стимулирующих формирование инфламмосом в клетках.

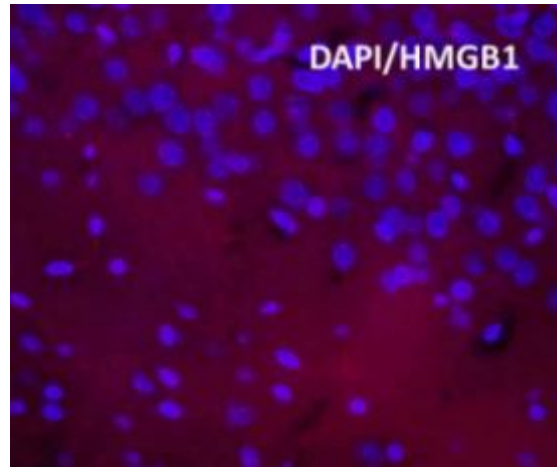
Таблица 17 - Относительная площадь экспрессии, %, HMGBl, при пренатальном нарушении развития головного мозга крыс

	Гиппокамп		Кора		Миндалина	
	контроль	аутизм	контроль	Аутизм	контроль	аутизм
P 5	0,23 (0,18...0,52)	8,2 (7,52...9,33)	0,24(0,18...0,52)	15,05 (13,34...15,97)	0,65 (0,47...0,83)	5,27 (5,05...5,48)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p=0,121	
P 15	0,39 (0,1...0,68)	16,97 (15,65...18,65)	0,94(0,43...1,16)	17,52 (15,21...18,43)	0,42 (0,34...0,84)	9,6 (6,69...10,87)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
P 25	0,29 (0,23...0,6)	20,23 (16,1...26,21)	0,7 (0,37...0,73)	10,24 (9,13...12,26)	0,07 (0,04...0,08)	7,64 (4,97...8,56)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
P 60	0,04(0...0,07)	6,94 (5,75...9,09)	0,12 (0,07...0,15)	7,54 (5,77...8,88)	0 (0...0)	4,61 (3,69...5,96)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
P 90	0 (0...0)	7,81 (6,21...8,96)	0,04 (0,02...0,1)	5,93 (4,8...7,21)	0 (0...0)	2,97 (2,36...3,29)
Уровень значимости	p<0,001		p<0,001		p<0,001	

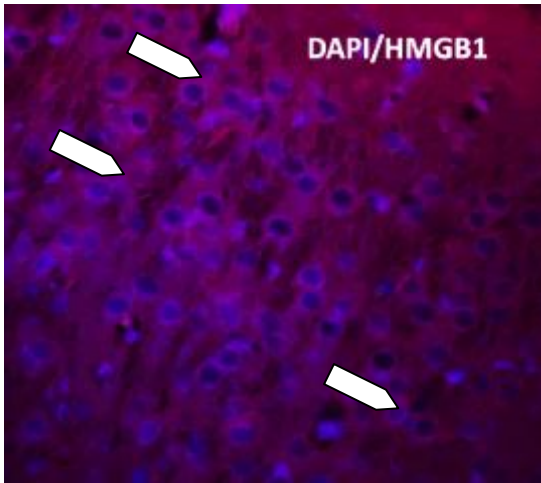




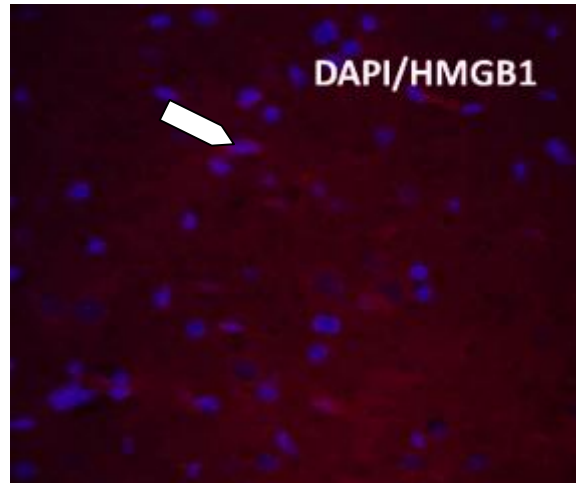
А. Гиппокамп крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$ .



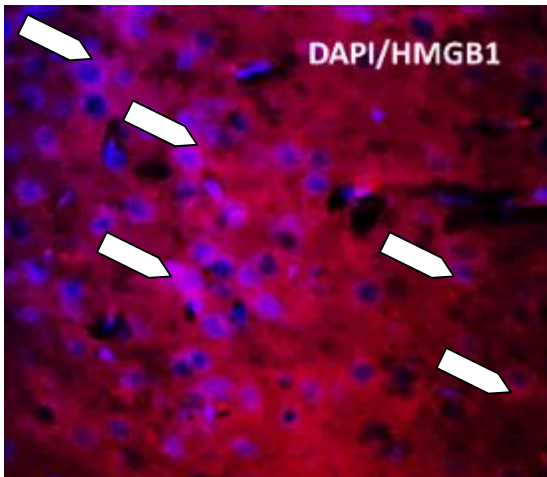
Б. Гиппокамп контрольного животного  
Увеличение  $\times 400$ .



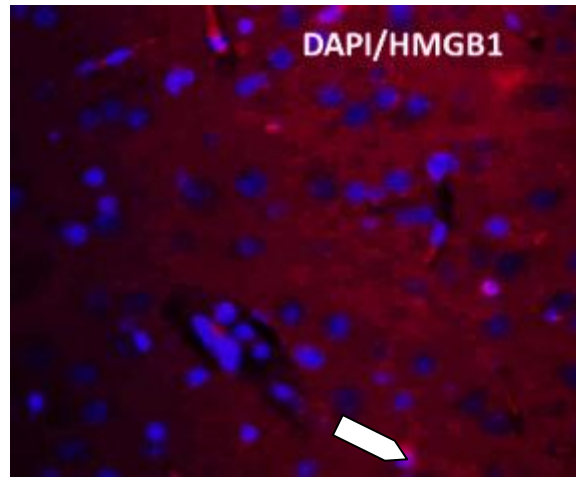
В. Кора крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$ .



Г. Кора контрольного животного  
Увеличение  $\times 400$ .



Д. Миндалина крысы с моделью аутизма  
Увеличение  $\times 400$



Е. Миндалина контрольного животного  
Увеличение  $\times 400$

Рисунок 12 – Экспрессия HMGB1 в головном мозге при экспериментальном аутизме и в контроле (красный – внеклеточная экспрессия HMGB1, синий – окрашенные ядра, DAPI).

### 3.2.4 Результаты экспрессии CD157 на клетках микроглии при пренатальном введении вальпроевой кислоты

CD157 является одним из НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов, участвующих в процессах внутриклеточной сигнализации и связанным с интегринами. CD18 и CD11 $\beta$  – маркеры микроглии, компоненты комплекса Mac-1. При оценке препаратов головного мозга подсчитывалось абсолютное количество позитивно окрашенных клеток. Исследование окрашенных срезов головного мозга показало регион-специфичный характер экспрессии маркеров микроглии. При микроскопии гиппокампа обнаружен значимо более низкий уровень экспрессии CD157 при экспериментальном аутизме (рисунок 13) на 5-е и 15-е сутки постнатального развития, с последующим увеличением количества CD157-позитивных клеток, вплоть до 90-х суток после рождения. Экспрессия CD18 (рисунок 14) значимо уменьшалась при пренатальном нарушении развития головного мозга на ранних сроках развития (P5, P15), а на более поздних (P60, P90) сроках отмечалось ее значимое увеличение, в сравнении с контролем. При экспериментальном аутизме экспрессия CD157 на клетках микроглии со временем увеличивалась. Коэкспрессия CD157/CD18 (экспрессия CD157 на клетках микроглии, рисунок 15, приложение 3) значимо увеличивалась в контроле на 5 сутки постнатального периода, затем уменьшалась к 60-м суткам, снова немного увеличиваясь к 90-м суткам.

Если сравнить коэкспрессию Neun (neuronal nuclear marker, один из основных маркеров нейронов) и CD157 в гиппокампе, то значимых различий между группой с стереотаксическим введением  $\beta$ -амилоида и группой контроля (введением фосфатно-солевого буфера) не получено ( $p=0,201$ ). При ложной операции процент коэкспрессирующих клеток составил 93,14 (82,66...96,14), при экспериментальной болезни Альцгеймера - 81,25 (69,57...83,33).

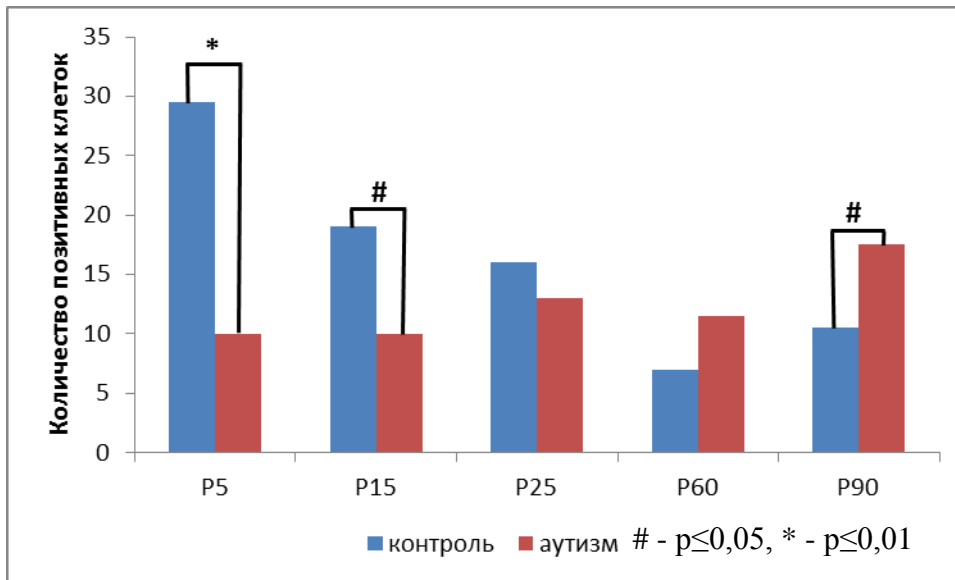


Рисунок 13 - Динамика экспрессии CD157 в гиппокампе головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

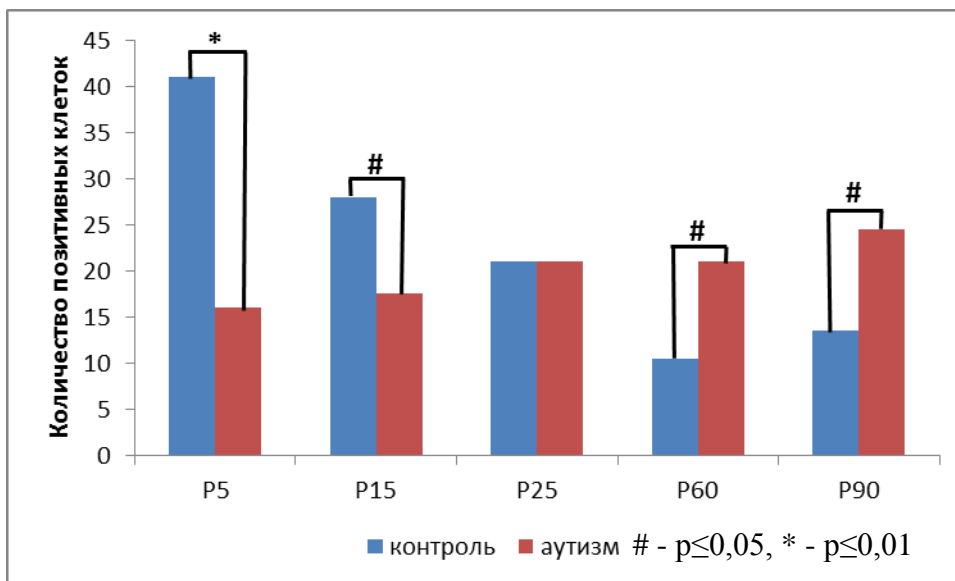


Рисунок 14 - Экспрессия CD18 в гиппокампе головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

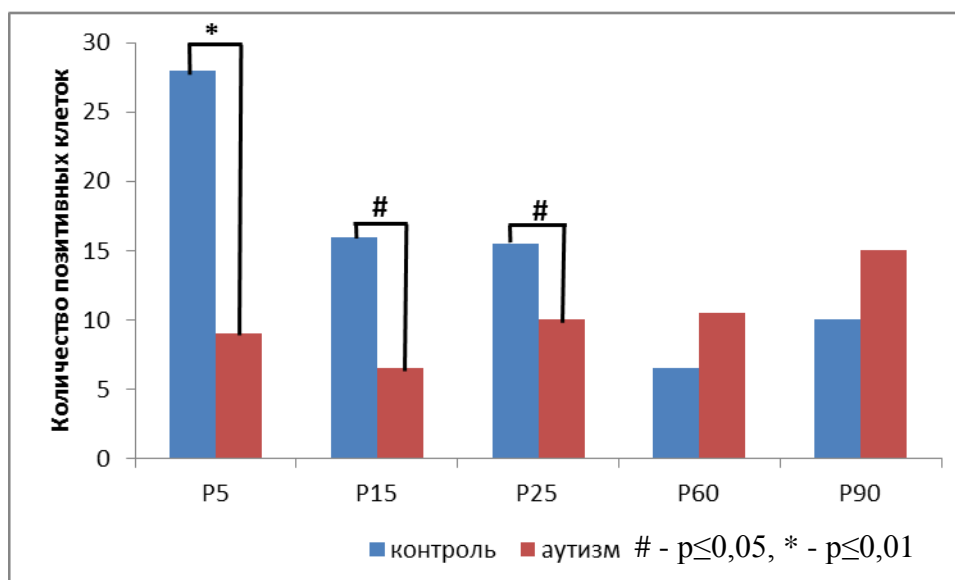


Рисунок 15 - Экспрессия CD157 на клетках микроглии гиппокампа головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

В коре отмечалась несколько иная тенденция: снижение экспрессии CD157 и CD18 с 15-х по 25-е сутки развития (рисунки 16, 17), что свидетельствует об активации микроглии на 5 день постнатального развития, более выраженной в контроле, а их коэкспрессия (рисунок 18) значительно различается в возрасте P15 (количество позитивных клеток больше при аутизме) и P60 (более выраженная экспрессия в контроле).

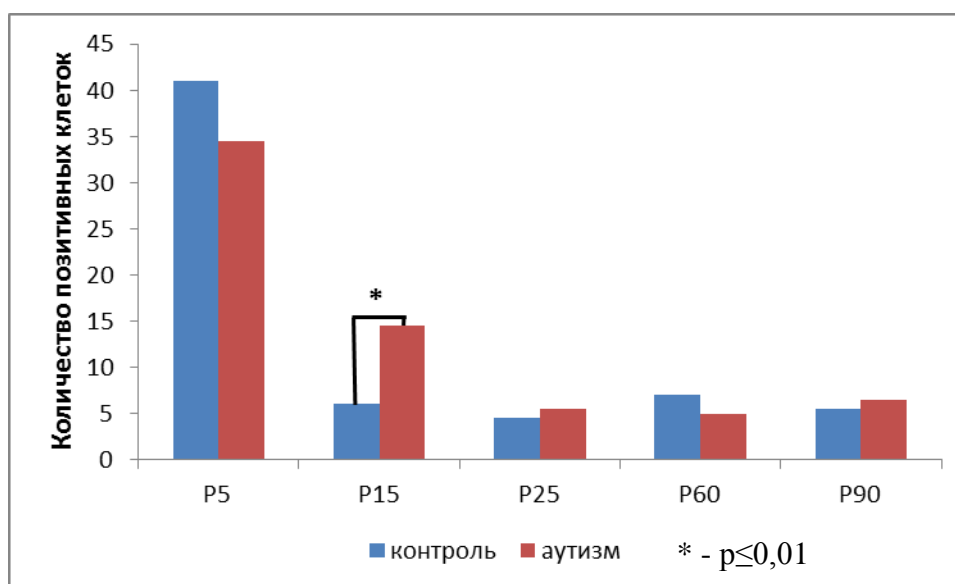


Рисунок 16 – Экспрессия CD157 в клетках коры головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

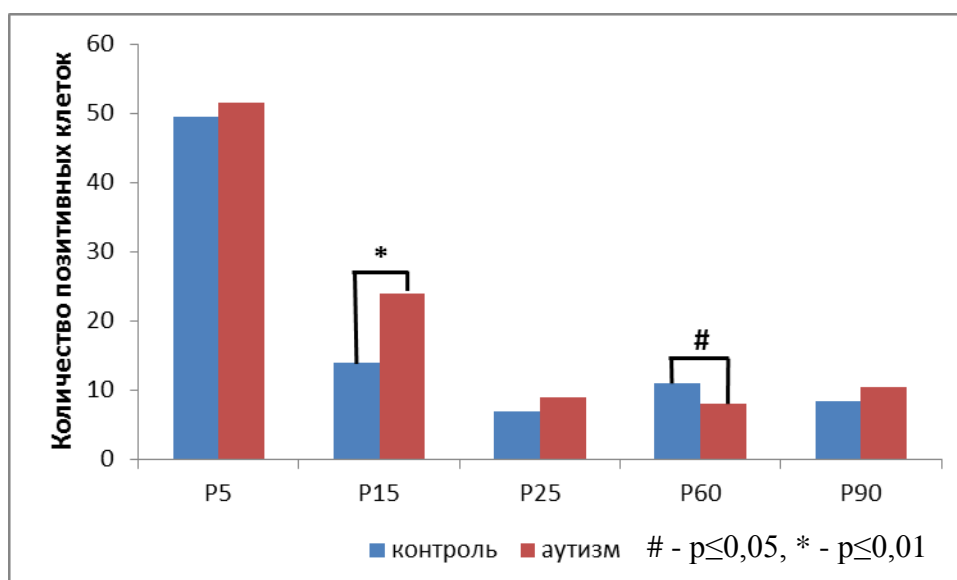


Рисунок 17 – Уровень экспрессии CD18 в коре головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

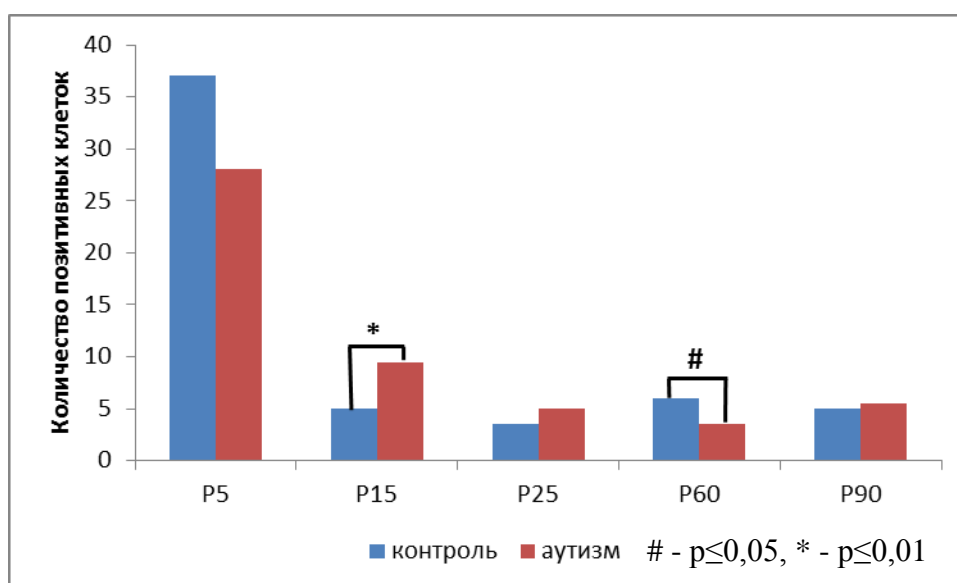


Рисунок 18 – Экспрессия CD157 на клетках микроглии коры головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

В миндалине отмечается тенденция к более высокому уровню экспрессии CD157 (рисунок 19) и CD18 (рисунок 20) при аутизме как по отдельности, так и совместно (коэкспрессия CD157/CD18, рисунок 21).

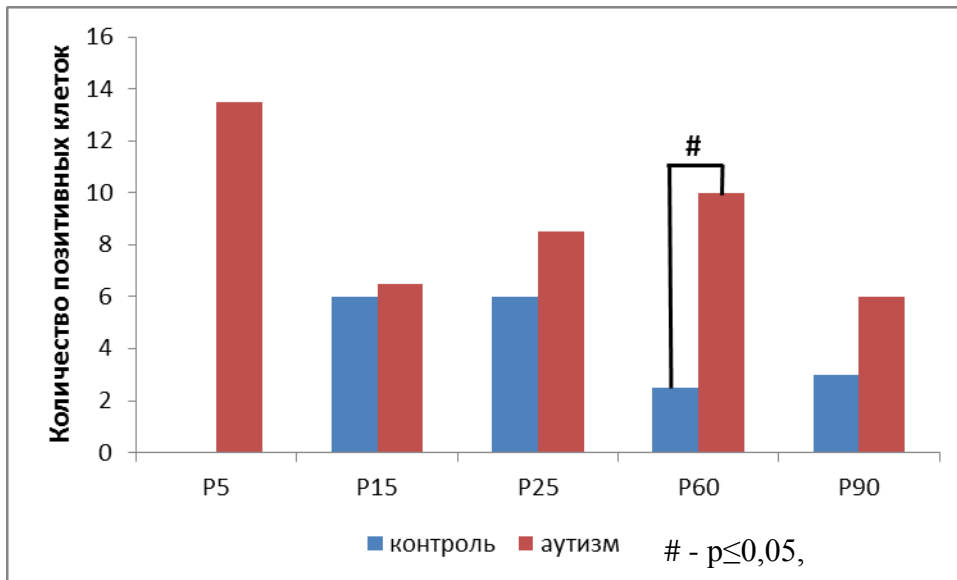


Рисунок 19 – Уровень экспрессии CD157 в миндалине головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

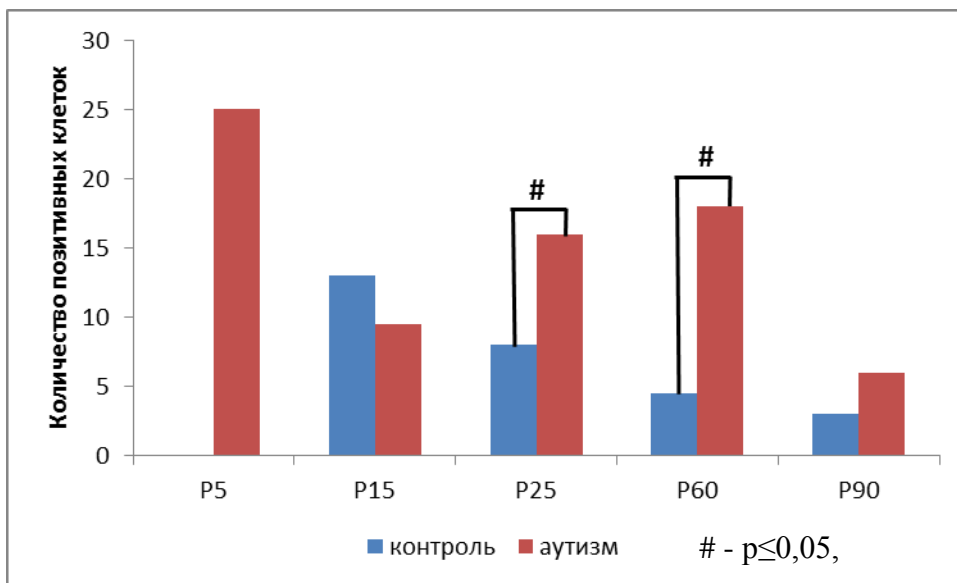


Рисунок 20 – Оценка количества CD18-позитивных клеток миндалины головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

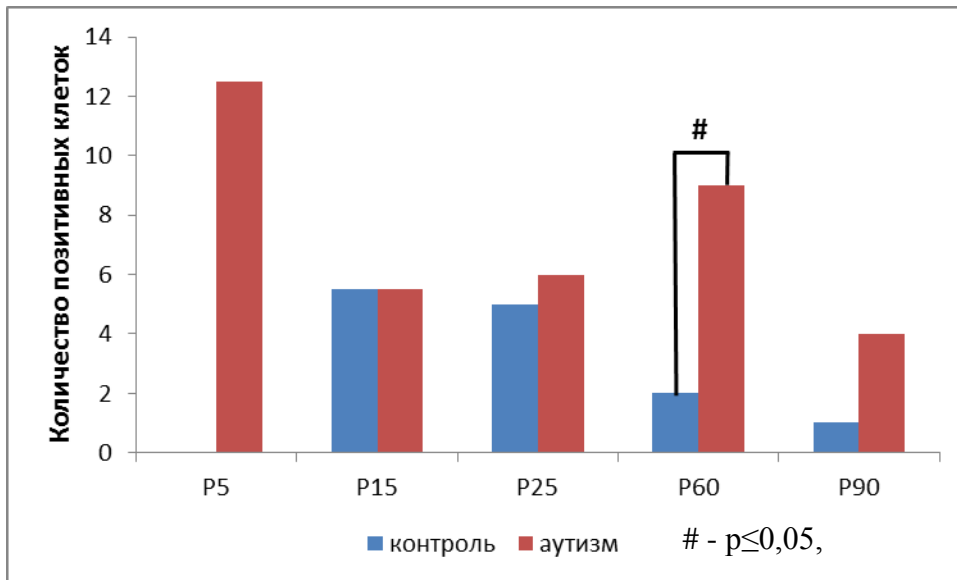


Рисунок 21 – Оценка коэкспрессии CD157 и CD18 в срезах миндалина головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Таким образом, экспрессия CD157 на клетках микроглии носит регион-специфичный характер, активация микроглии приходится на 15-е сутки в гиппокампе и на 5-е сутки в коре и миндалине.

### 3.2.5 Анализ экспрессии CD38 на клетках микроглии при экспериментальном аутизме

При оценке экспрессии CD38 на клетках микроглии, как и в случае CD157, выявлен регион-специфичный характер (приложение II). В гиппокампе отмечается значимое различие количества CD38- и CD18-позитивных клеток (рисунки 22-24) между группами с экспериментальным аутизмом и контролем (их превалирование у последнего), однако уже с P15 картина меняется – отмечается увеличение их экспрессии в группе с пренатальным введением вальпроевой кислоты.

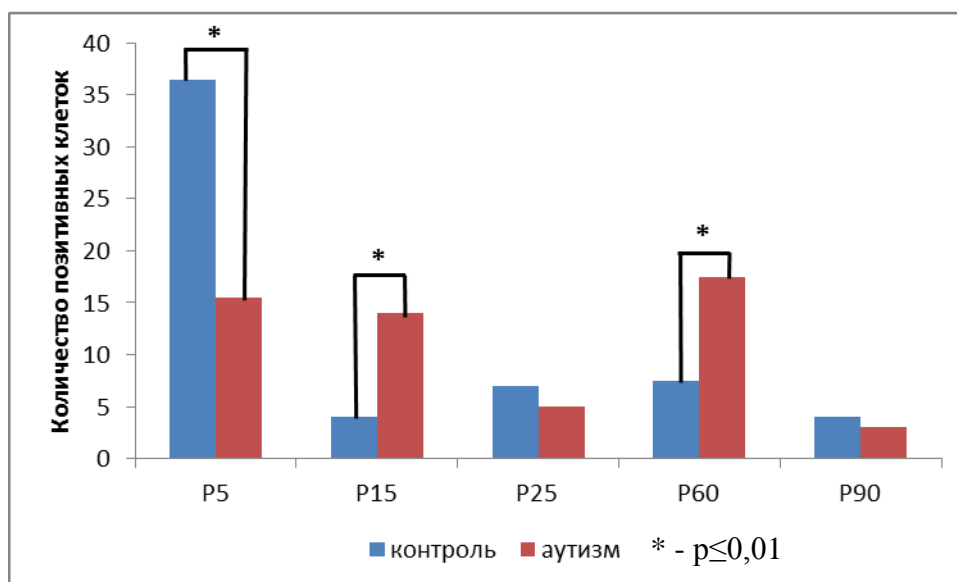


Рисунок 22 – Количество CD38-позитивных клеток в гиппокампе крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

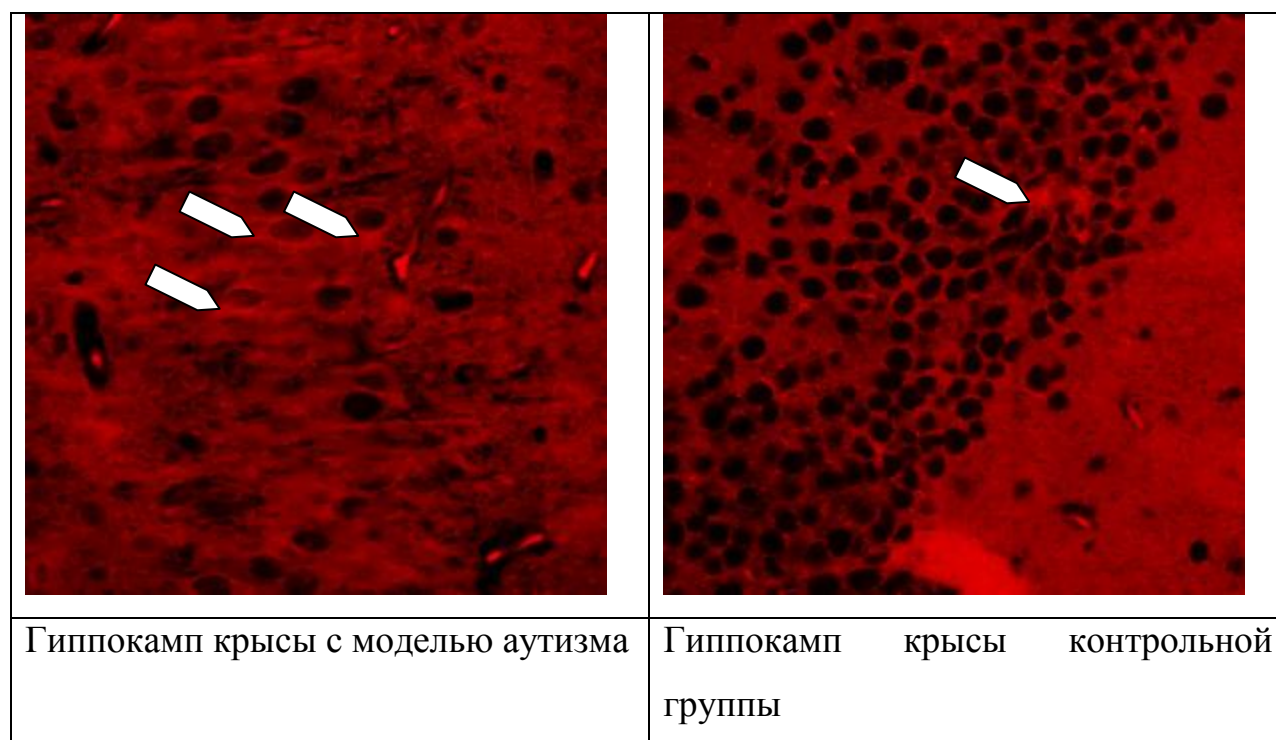


Рисунок 23 – Экспрессия CD38 в гиппокампе головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме, увеличение х600.



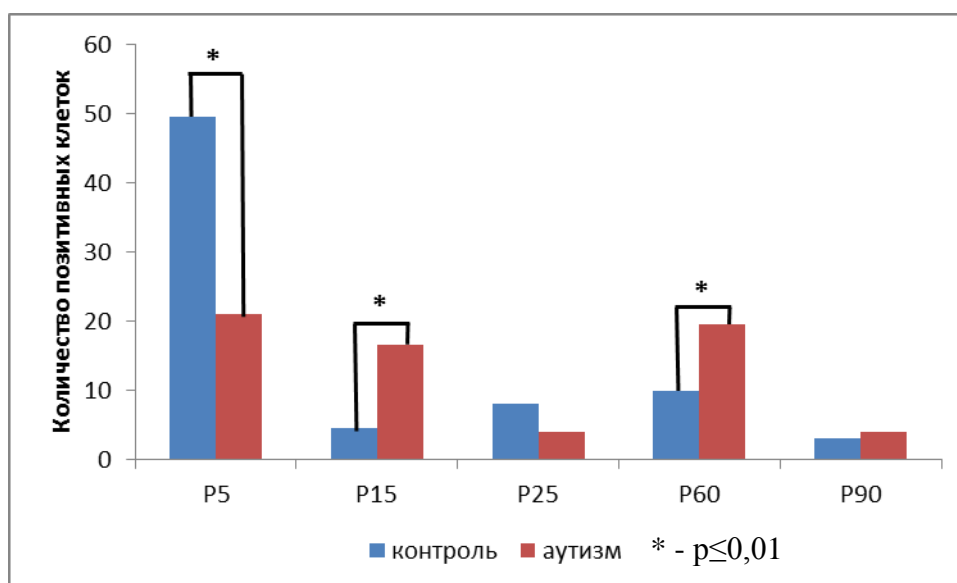


Рисунок 24 – Экспрессия CD18 в гиппокампе головного мозга у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

Подобные изменения отмечены и при анализе коэкспрессии CD38/CD18 в гиппокампе (рисунок 25).

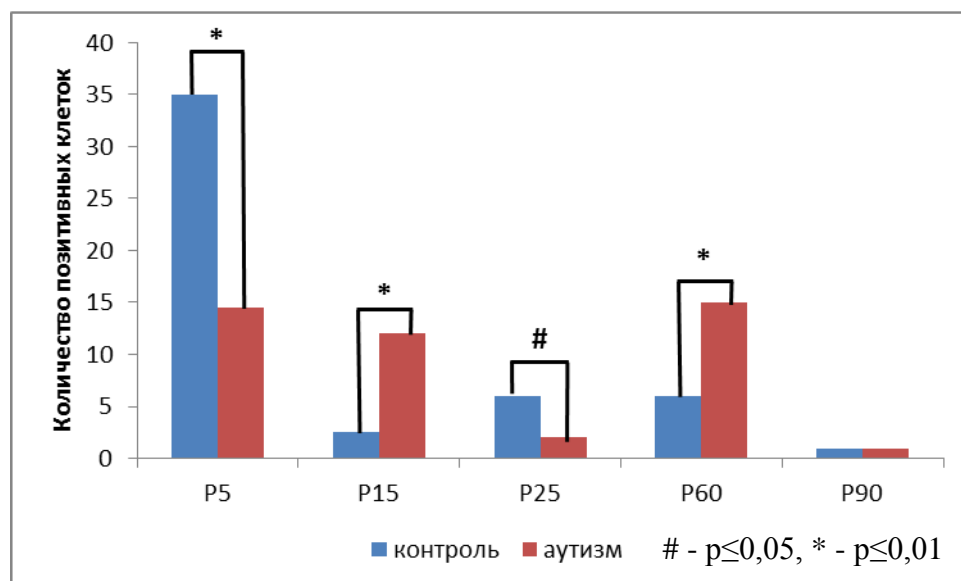


Рисунок 25 – Коэкспрессия CD38 и CD18 в гиппокампе головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

Для сравнения, при экспериментальной болезни Альцгеймера процент экспрессии CD38 на нейронах (маркер NeuN) гиппокампа составила 68,42 (62,96...68,75), при проведении ложной операции - 41,17 (39,34...63,45), то есть

значимо не отличается ( $p=0,456$ ), несмотря на тенденцию в группе позитивного контроля к более низкой коэкспрессии.

В энторинальной коре головного мозга ситуация отличается: на 5-е сутки постнатального периода развития различий экспрессии CD38 между группами не отмечается (рисунок 26), а в возрасте P15 и P60 значимо превалирует экспрессия при аутизме. По количеству CD18-позитивных клеток (рисунок 27) отмечается сходство с гиппокампом: отмечается значимое усиление экспрессии этого маркера на 15-е сутки постнатального развития, далее наблюдается значимое отличие экспрессии между контрольной и опытной группами, несмотря на тенденцию к уменьшению экспрессии CD18 в целом. Коэкспрессия маркеров увеличивается в возрасте P15 (рисунок 28) в модели с пренатальным нарушением развития головного мозга, а затем постепенно снижается.

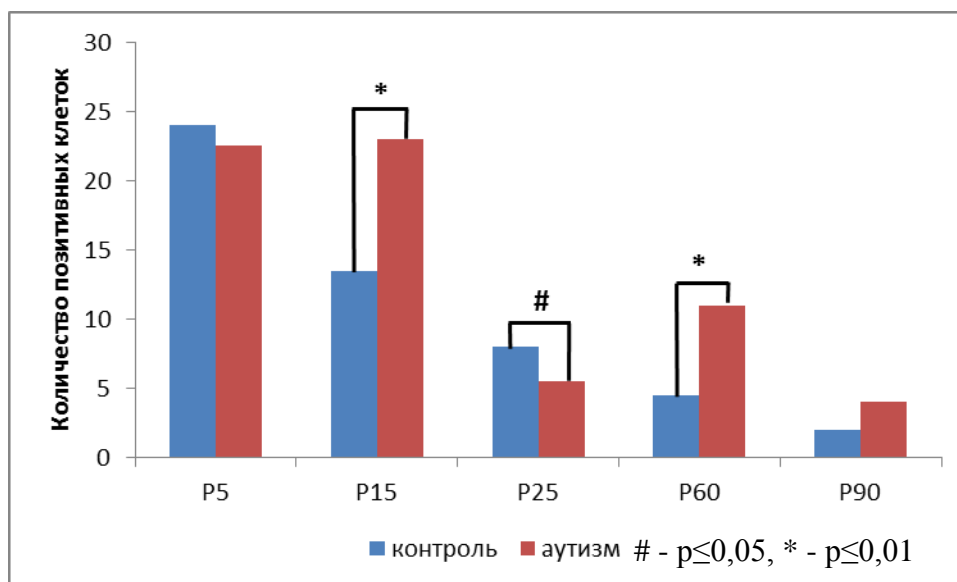


Рисунок 26 – Оценка количества CD38 коры головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

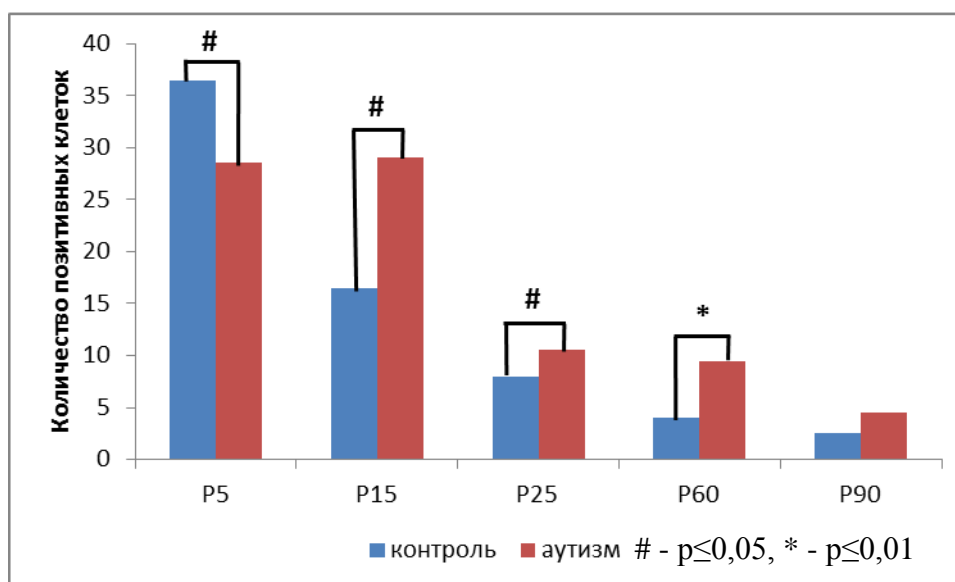


Рисунок 27 – Экспрессия CD18 в коре крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

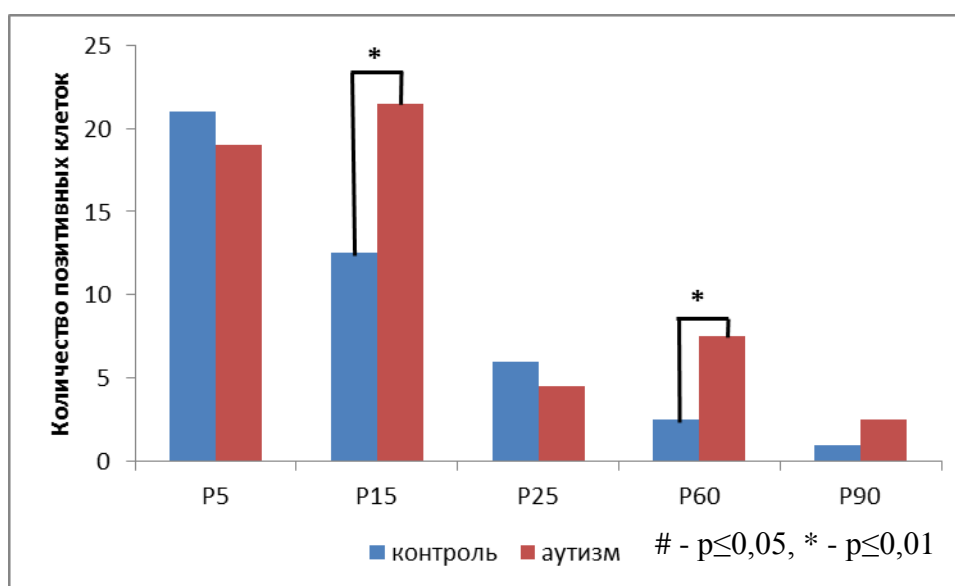


Рисунок 28 – Совместная экспрессия CD38 и CD18 в коре головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Анализ экспрессии маркера микроглии CD18 и НАД<sup>+</sup>-метаболизирующего фермента CD38 в базолатеральной миндалине показал сходство с корой животных с экспериментальным аутизмом: выявлено значимое увеличение количества CD38-позитивных клеток в возрасте P15 (рисунок 29) с тенденцией к уменьшению к P25 и повышению в период P60-P90; пик экспрессии CD18 на 15-е

сутки развития с постепенным снижением экспрессии до 90 суток постнатального периода (рисунок 30); пик совместной экспрессии CD38/CD18 в возрасте P15 (рисунок 21) с тенденцией к уменьшению на последнем исследуемом сроке жизни (P90).

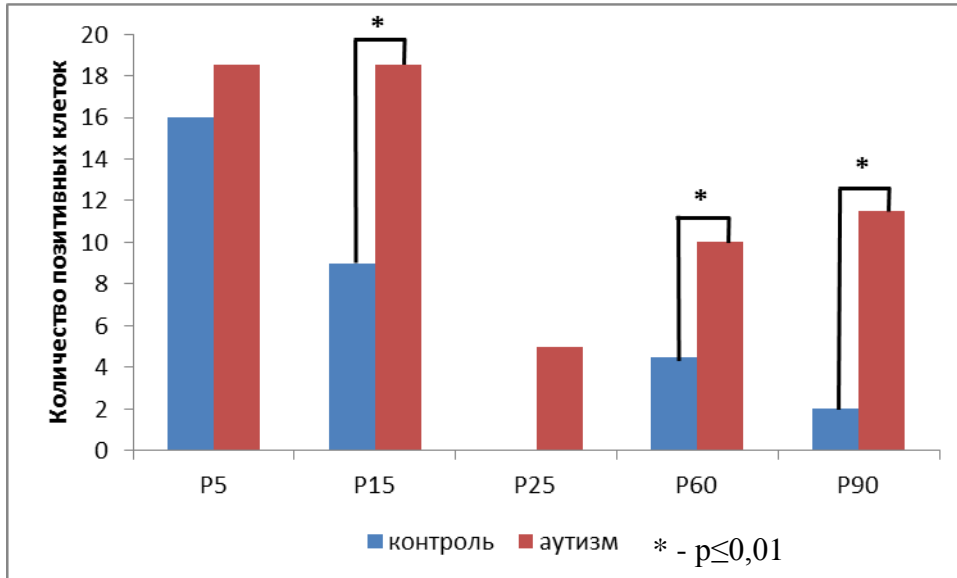


Рисунок 29 – Экспрессия CD38 в миндалине головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

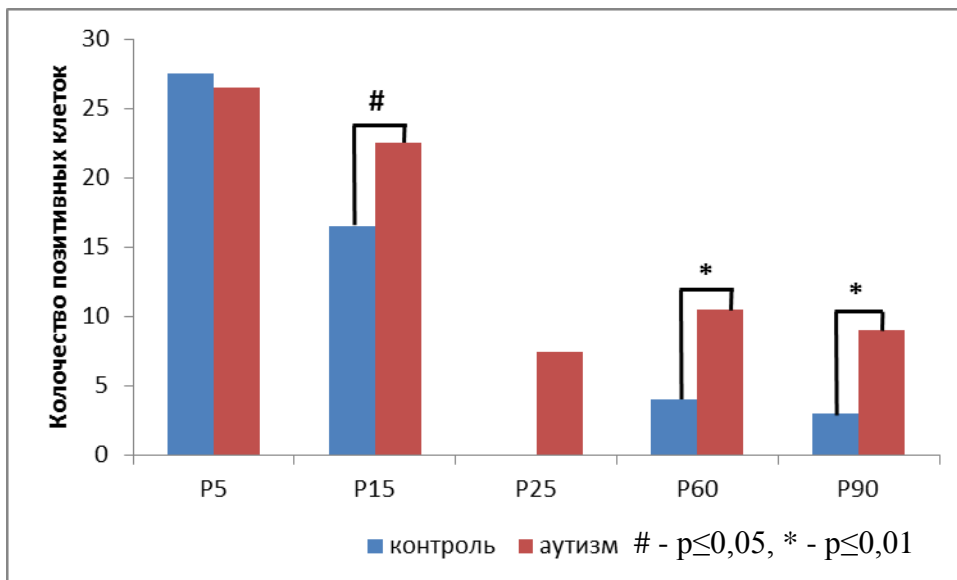


Рисунок 30 – Количество CD18-позитивных клеток миндалины головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

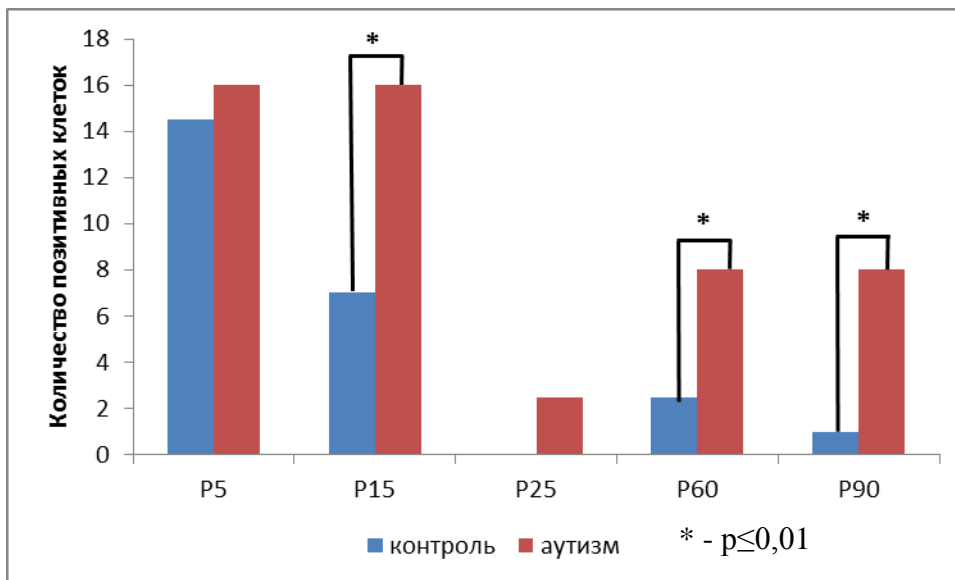


Рисунок 31 – Коэкспрессия CD38 и CD18 в базолатеральной миндалине крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Таким образом, при исследовании экспрессии CD38 на клетках микроглии выявлены следующие особенности: экспрессия носит регион-специфичный характер; активация микроглии приходится на 15-е сутки в гиппокампе и на 5-е сутки в энторинальной коре и базолатеральной миндалине, что согласуется с полученными данными по анализу экспрессии CD157 на клетках микроглии; активация экспрессии CD38 отмечается в среднем на 60-е сутки во всех исследуемых регионах.

### 3.2.6 Оценка экспрессии NLRP3 и коэкспрессии NLRP3 с CD11 $\beta$ при пренатальном нарушении развития головного мозга

NLRP3 – инфламмосома, играющая роль в развитии нейровоспаления. При изучении экспрессии NLRP3 и коэкспрессии с CD11 $\beta$  был выявлен ряд особенностей (приложение К). В гиппокампе отмечается повышенный уровень экспрессии NLRP3, начиная с 5-х суток постнатального периода (рисунок 32) при экспериментальном аутизме в сравнении с контролем, далее наблюдалась тенденция к снижению экспрессии инфламмосомы в возрасте P15 и P25, затем –

возобновление увеличение количества NLRP3-позитивных клеток при сохранении значимой разницы с контрольной группой.

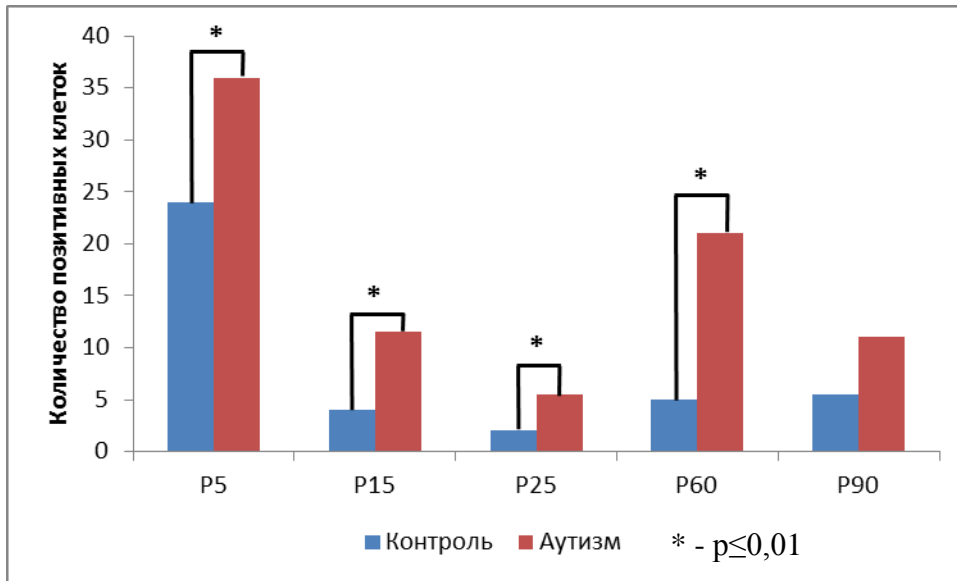


Рисунок 32 – Экспрессия NLRP3 в гиппокампе крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

Динамика экспрессии CD11 $\beta$  в гиппокампе имеет сходства с экспрессией NLRP3 (рисунок 33): пик экспрессии приходится на возраст P5, наиболее выраженный при пренатальном нарушении развития головного мозга, затем выявлено снижение его экспрессии с сохранением значимых различий.

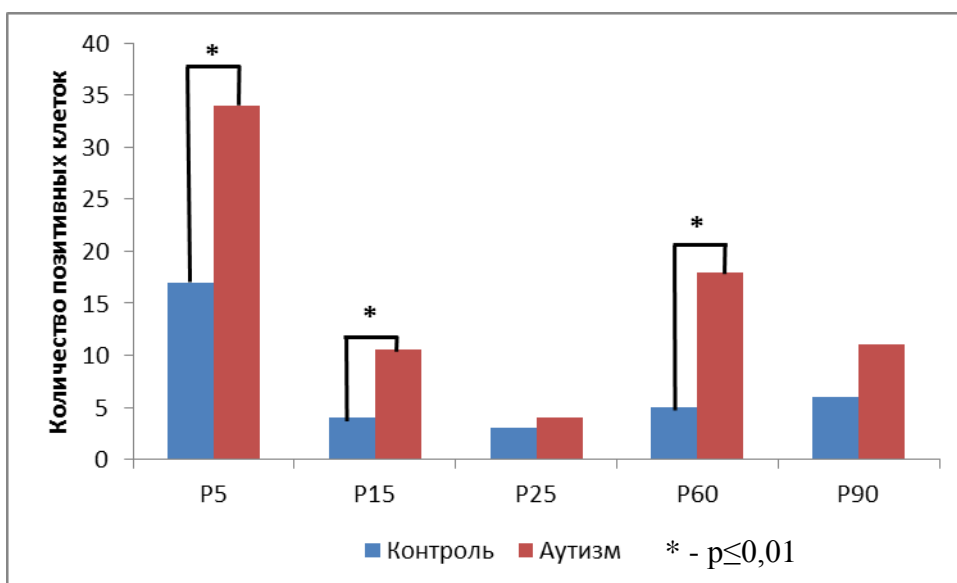


Рисунок 33 – Оценка количества CD11 $\beta$ -позитивных клеток гиппокампа крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

При оценке коэкспрессии NLRP3/CD11 $\beta$  на клетках гиппокампа выявлены значимые отличия (рисунок 34) между опытными и контрольными группами, проявляющиеся в увеличении количества клеток с коэкспрессией у крыс с аутизмом.

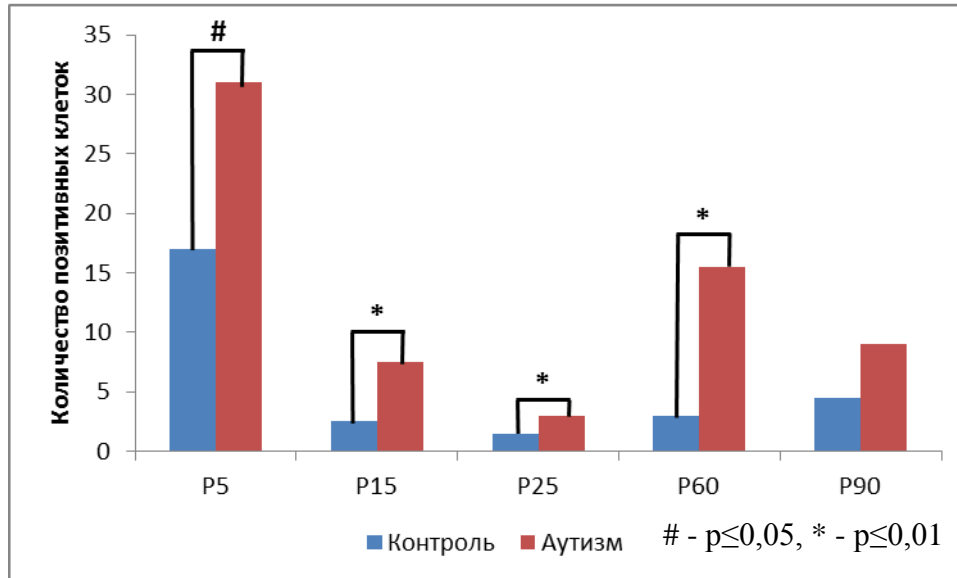


Рисунок 34 – Оценка количества клеток гиппокампа, коэкспрессирующих NLRP3 и CD11 $\beta$ , у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

При этом, если рассматривать процессы нейровоспаления в гиппокампе, у ложно-оперированных животных процент клеток, экспрессирующих NLRP3 и GFAP, составляет 77,38 (47,85... 86,46), а у животных с моделированием экспериментальной болезни Альцгеймера 29,17 (18,75...38,33), что значимо ( $p=0,031$ ) различается. Это может свидетельствовать о роли нейровоспаления как нейропротективного механизма, либо об отсроченной реакции астроглии.

В коре головного мозга животных с аутизмом пик экспрессии NLRP3 приходится на период P5 и значимо отличается от аналогичного периода в контрольной группе (рисунок 35).

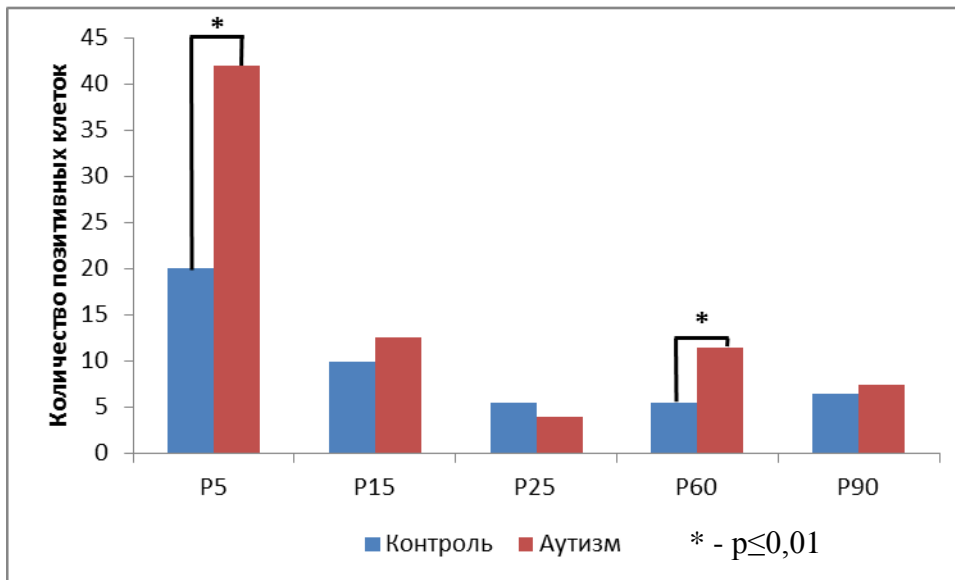


Рисунок 35 – Количественный анализ NLRP3-позитивных клеток коры головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Экспрессия CD11 $\beta$  значимо выше в первом исследуемом сроке (P5) в группе с аутизмом, что может свидетельствовать о запуске микроглия-зависимого нейровоспаления (рисунок 36).

Коэкспрессия NLRP3/CD11 $\beta$  в целом не отличается от совместной экспрессии этих маркеров в гиппокампе (рисунок 37). Пик коэкспрессии при экспериментальном аутизме приходится на P5 (рисунок 38).

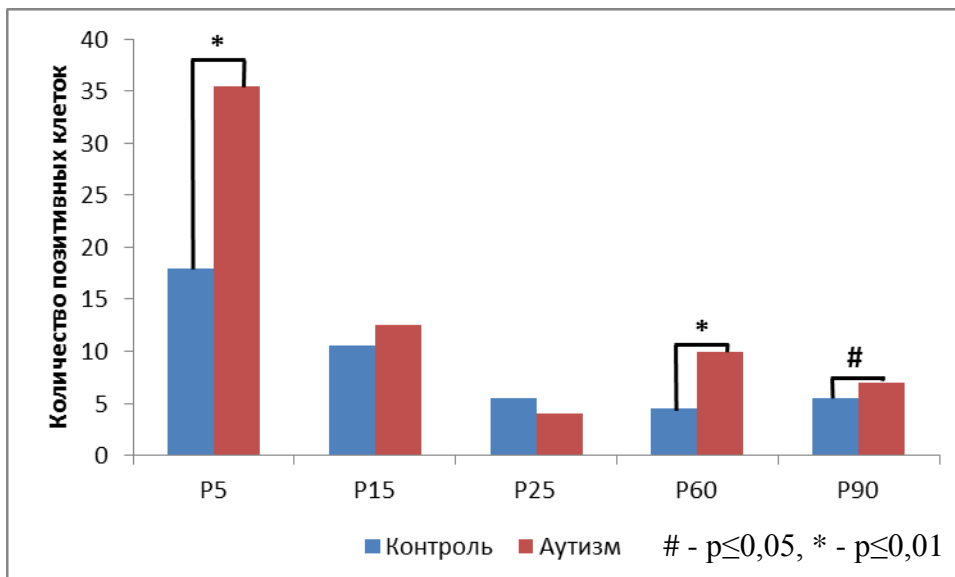


Рисунок 36 – Оценка экспрессии CD11 $\beta$  в коре крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.



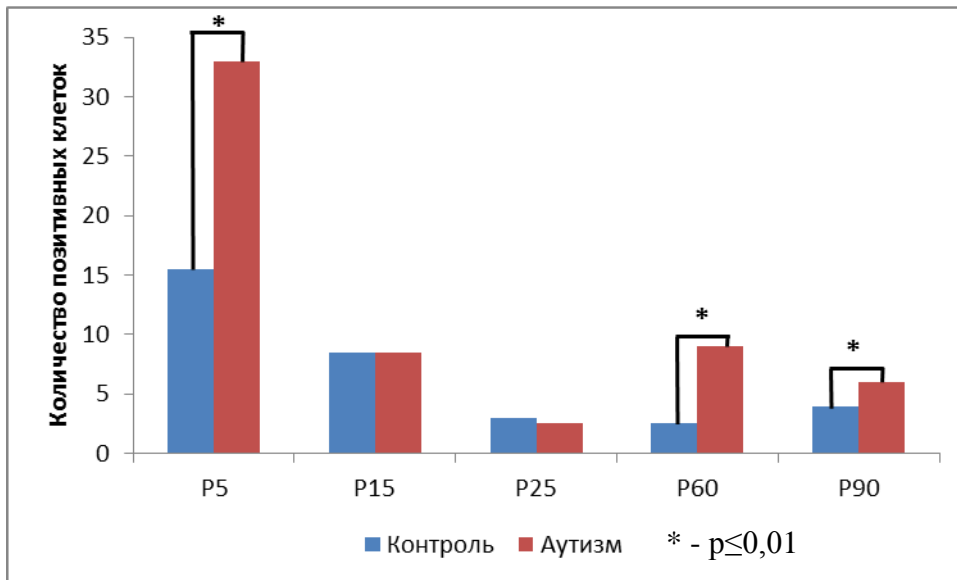
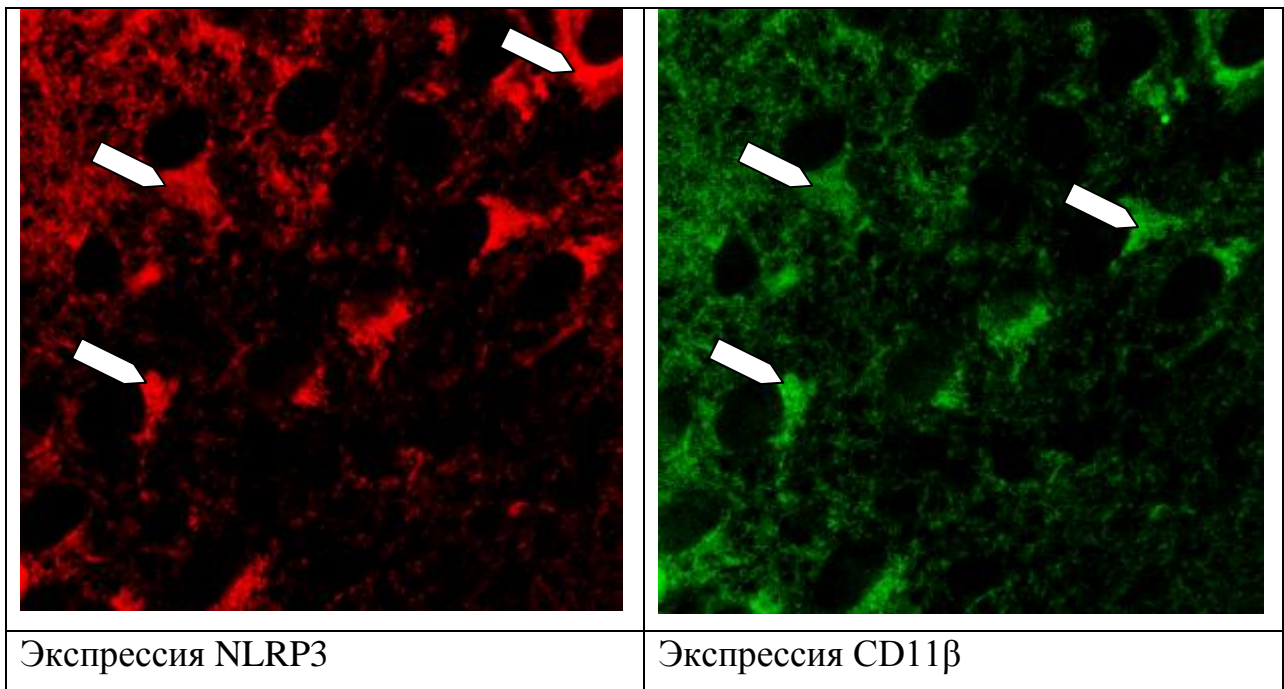


Рисунок 37 – Оценка коэкспрессии NLRP3 и CD11 $\beta$  в коре крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.



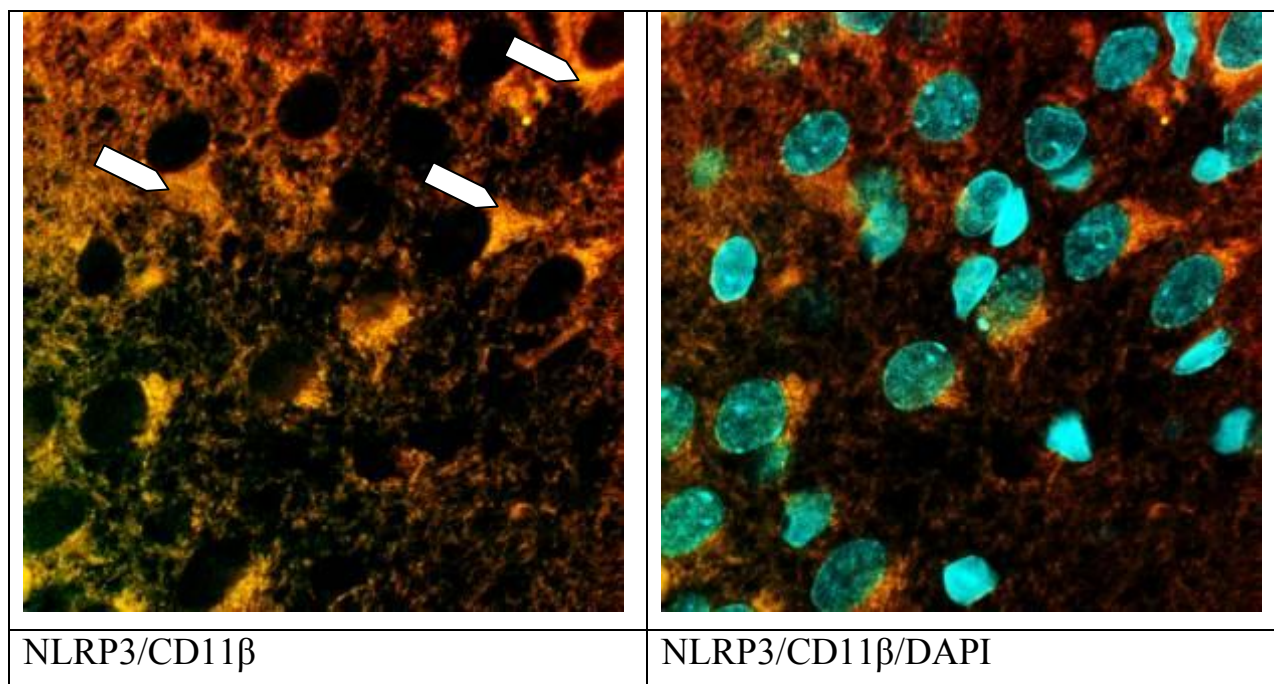


Рисунок 38 – Экспрессия и коэкспрессия NLRP3 и CD11β в энторинальной коре крыс с экспериментальным аутизмом, P5, увеличение x1800.

В миндалине пик экспрессии NLRP3 в модели аутизма приходился на 15-е сутки (рисунок 39) постнатального периода и значительно отличался с контрольной группой (отмечалось значимое увеличение экспрессии в группе с аутизмом), при этом на 5-е сутки в опытной группе отмечался более низкий уровень экспрессии NLRP3 при сравнении с группой контроля.

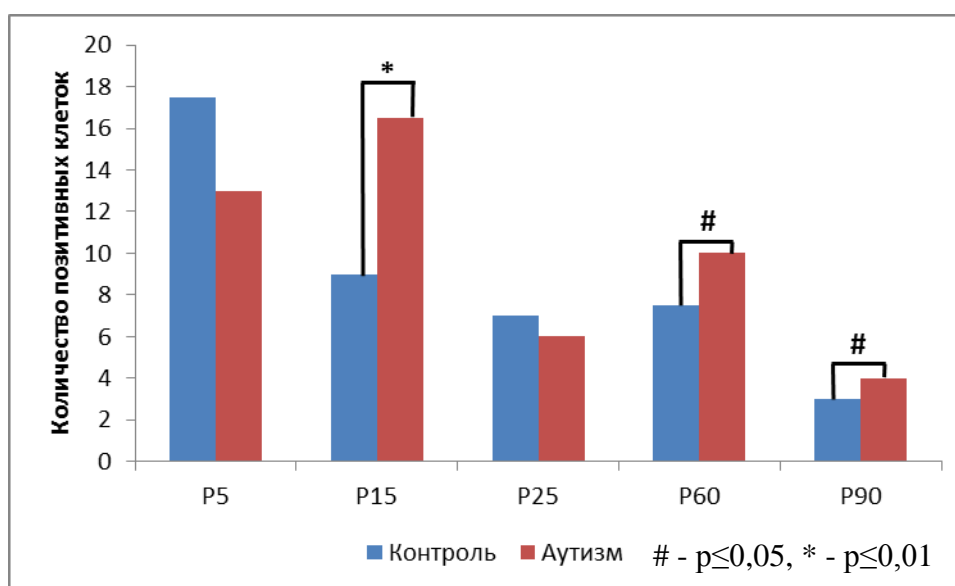


Рисунок 39 – Оценка количества клеток базолатеральной миндалины головного мозга, экспрессирующих NLRP3, у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

При оценке экспрессии CD11 $\beta$  в миндалине головного мозга крыс (рисунок 40) выявлено сходство с экспрессией NLRP3 – в контрольной группе пик экспрессии приходится на возраст P5 с постепенным снижением количества экспрессирующих клеток; в группе с экспериментальным аутизмом пик приходится на 15-е сутки постнатального развития со значимо более высоким уровнем по сравнению с контролем.

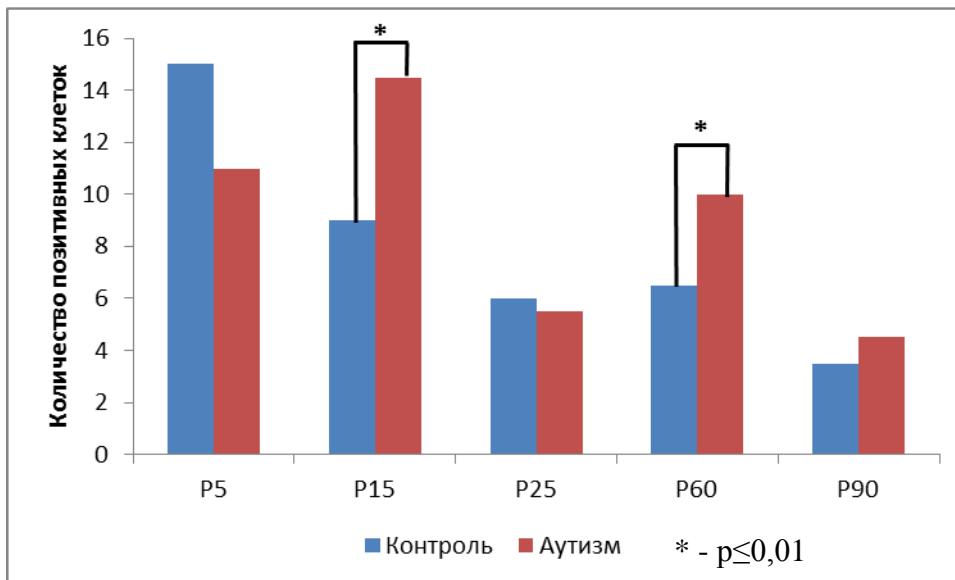


Рисунок 40 – Экспрессия CD11 $\beta$  в базолатеральной миндалине головного мозга крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Анализ коэкспрессии NLRP3/CD11 $\beta$  в базолатеральной миндалине выявил значимые отличия (рисунок 41) между контрольными и экспериментальными группами, выражающиеся в увеличении количества клеток с коэкспрессией у крыс с аутизмом с периода P15.

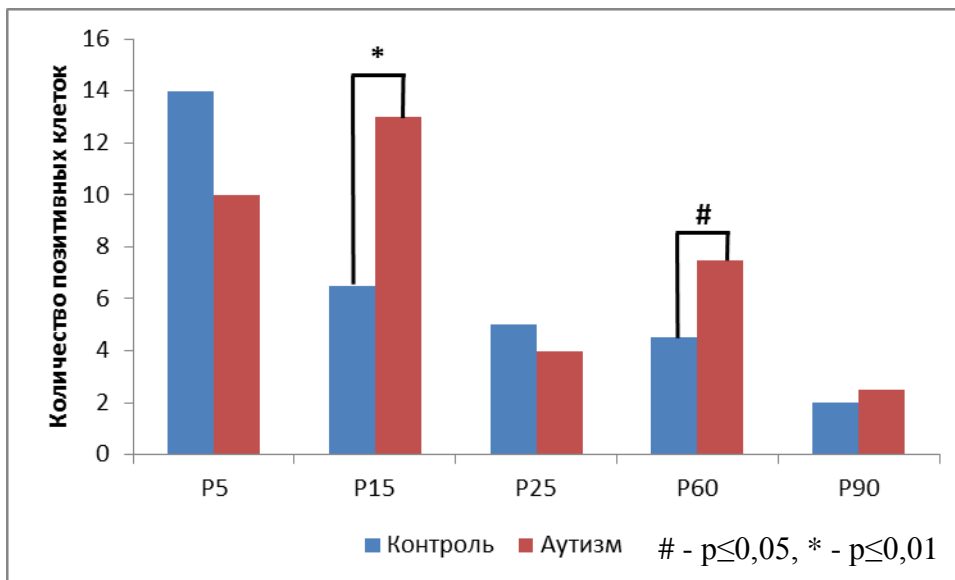


Рисунок 41 – Количественная оценка клеток миндалина головного мозга, коэкспрессирующих NLRP3 и CD11 $\beta$ , у крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме

Таким образом, отмечается регион-специфический характер экспрессии NLRP3 и CD11 $\beta$  по отдельности и совместно: пик их экспрессии и коэкспрессии в гиппокампе и коре приходился на возраст P5, в миндалине – P15; в период P60-P90 регион-специфических изменений не наблюдается – во всех случаях экспрессия NLRP3 и CD11 $\beta$  и их коэкспрессия превалировала при аутизме.

### 3.2.7 Оценка экспрессии PSD95 при экспериментальном аутизме

PSD95 является основным маркером синаптогенеза и показывает уровень развития синаптических связей, а также – косвенно – микроглия-опосредованные процессы конкурентной элиминации синапсов, сопровождающей процессы запоминания.

Уровень экспрессии PSD95 оценивался в программе ImageJ, при этом определялась интенсивность флуоресценции PDS95 и DAPI и их отношение. Была выявлена тенденция к более низкой экспрессии PSD95 (таблица 18) во всех исследуемых регионах головного мозга при аутизме в сравнении с контролем на

сроках до 25-х суток включительно. Его экспрессия восстанавливается к 60 суткам, а на 90 становится выше, чем в группе с пренатальным введением физиологического раствора. Эти данные согласуются с имеющейся информацией о синаптогенезе при аутизме: его интенсификация происходит в более поздние сроки [86].

Таким образом, при экспериментальном аутизме отмечается уменьшение экспрессии PSD95 во всех исследуемых регионах головного мозга в возрасте от 5 до 25 суток, а затем ее усиление на 60-е и 90-е сутки постнатального развития, что может свидетельствовать о подавлении и интенсификации синаптогенеза, соответствующим изменению активности клеток микроглии.

Таблица 18 – Оценка экспрессии PSD95 в ткани головного мозга крыс в норме и при экспериментальном аутизме

	Гиппокамп		Кора		Миндалина	
	контроль	аутизм	контроль	Аутизм	контроль	аутизм
P 5	4,79 (3,94...6,55)	1,98 (1,62...2,94)	3,73 (2,62...5,17)	2,81 (2,33...3,17)	1,44 (1,04...1,8)	3,66 (3,13...4,19)
Уровень значимости	p=0,015		p=0,189		p=0,053	
P 15	2,91 (2,29...3,71)	2,02 (1,72...2,24)	2,8 (2,31...4)	1,95 (1,46...3,22)	1,77 (1,35...2,3)	1,32 (0,72...1,67)
Уровень значимости	p=0,004		p=0,054		p=0,208	
P 25	3,86 (2,48...4,6)	2,52 (1,71...2,89)	3,52 (3,09...5,13)	2,34 (1,99...3,17)	1,14 (0,77...1,43)	2,88 (2,51...3,07)
Уровень значимости	p=0,01		p=0,01		p=0,009	
P 60	1,92 (1,44...2,81)	2,4 (1,21...2,78)	2,54 (2,07...2,87)	2,39 (2,3...2,85)	2,45 (1,94...2,88)	2,78 (1,59...3,09)
Уровень значимости	p=0,95		p=0,576		p=0,734	
P 90	2,02 (1,56...2,26)	2,25 (1,72...2,63)	1,4 (0,99...2,07)	2,32 (2,1...4,53)	1,41 (1,21...1,67)	2,32 (1,93...2,74)
Уровень значимости	p=0,223		p=0,004		p=0,03	

### **3.3 Корреляционный анализ экспрессии клеточных маркеров нейровоспаления при экспериментальном аутизме**

При оценке корреляционных взаимосвязей между группами контроля и опыта выявлены следующие особенности (приложение Л): при исследовании связей между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина  $1\beta$  в выявлена значимая отрицательная средняя по силе связь в коре, положительная средняя по силе связь в миндалине при пренатальном введении вальпроевой кислоты в возрасте 25 суток, а также в высокозначимая положительная средняя по силе связь в миндалине при экспериментальном аутизме на 90-е сутки постнатального развития. Значимых корреляционных связей между относительной площадью экспрессии интерлейкина  $1\beta$  и абсолютным количеством клеток, экспрессирующих NLRP3, в контрольной и опытной группе не выявлено.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие нейровоспаления – неотъемлемый компонент патогенеза заболеваний головного мозга (ишемия, нейродегенерация, нарушения развития, нейроинфекция). Менее всего изучены механизмы развития нейровоспаления при заболеваниях аутистического спектра. Вместе с тем, исследования последних 2-3 лет убедительно показывают существенный вклад механизмов воспаления в развитие аутизма [190], в том числе признаки нейровоспаления (зарегистрированные морфологически по появлению признаков реактивного астроглиоза) выявлены у животных с примененной в нашем исследовании моделью с введением вальпроевой кислоты в пренатальном периоде онтогенеза [70]. В этой же модели хорошо воспроизводятся нарушения поведенческих функций и синаптической пластичности (регистрируемые по отдаленным изменениям экспрессии NMDA рецепторов и параметров LTP) [127]. Таким образом, воспроизведение ключевых нейропатологических событий при аутизме в выбранной нами экспериментальной модели гарантирует возможность экстраполяции полученных данных на патогенез аутизма в целом. Активация микроглиальных клеток, ассоциированная с формированием инфламмосом вследствие высвобождения во внеклеточное пространство белков-аларминов, не была изучена ранее. В фокусе нашего исследования оказались механизмы развития нейровоспаления, опосредованные активированной микроглией, в разных регионах головного мозга, отвечающих за формирование когнитивных функций и запоминания (гиппокамп), эмоциональную память, в том числе при социализации (миндалины), и ассоциацию неокортекса и гиппокампа (энторинальная кора).

В головном мозге животных с аутизмом мы наблюдали регион-специфический характер развития повреждений (рисунки 42-47): в гиппокампе процессы нейровоспаления и апоптоза носят отсроченный характер по сравнению с миндалиной и корой головного мозга: в коре и миндалине головного мозга наиболее выраженное снижение апоптоза и интенсивная активация



нейровоспаления наблюдается в возрасте P5-P15, в гиппокампе интенсификация нейровоспаления и снижение апоптоза наиболее выражены в возрасте P25. Отсроченный характер указанных изменений нейровоспаления и апоптоза в гиппокампе, вероятнее всего, связан с активацией процессов в гиппокампе в ответ на «запрос» из миндалины и/или коры головного мозга в ответ на их повреждение. В дальнейшем нейровоспаление во всех регионах снова интенсифицируется («второй пик» нейровоспаления) в возрасте P60-P90, что совпадает с наиболее выраженной неврологической симптоматикой. Апоптоз же, напротив, начинает восстанавливаться к окончанию периода P90. Полученные данные согласуются с представлениями о процессах апоптоза в эмбриональном развитии [214].

Вальпроевая кислота (VPA, 2-пропилпентановая кислота) является признанным индуктором экспериментального аутизма [109], а также препаратом для терапии при эпилепсии. И, хотя VPA хорошо переносится пациентами, она может вызвать врожденные дефекты при приеме на ранних сроках беременности, такие как дефекты закрытия нервной трубки [146]. Доказано, что вальпроевая кислота уменьшает репрессию факторов транскрипции, которые привлекают к участию гистондеацетилазы (HDAC). Вальпроевая кислота вызывает гиперацетилирование N-концевых хвостов гистонов H3 и H4 в пробирке и в естественных условиях. Она ингибирует активность HDAC, скорее всего, путем связывания с каталитическим центром и тем самым блокируя доступ к субстрату. Ингибирование гистоновых деацетилаз приводит к индукции дифференцировки и/или апоптоза измененных клеток [19, 208].

В случае экспериментального аутизма нельзя исключить прямое влияние вальпроевой кислоты на НАД<sup>+</sup>-зависимые деацетилазы (сиртуины), участвующие в эпигенетической регуляции ключевых клеточных функций, в том числе в процессе нейрогенеза. Этот механизм в действии вальпроевой кислоты был недавно убедительно показан в работе J. C. Ximenes и других [209], интересно, что в этой же работе продемонстрировано противовоспалительное действие вальпроевой кислоты при экспериментальной болезни Паркинсона. Однако,

пренатальное введение вальпроевой кислоты, вероятнее всего, воспроизводит ключевые нейрпатологические события при аутизме именно за счет подавляющего влияния на активность сиртуинов, а также снижения формирования ингибиторных синапсов [109, 210], что также характерно для аутизма. Локализованное ремоделирование хроматина и динамические изменения в нуклеосомной упаковке ДНК являются ключевыми шагами в регуляции экспрессии генов, следовательно, влияющие на правильную функцию клеток, дифференциации и пролиферации. Однако, прямое влияние вальпроевой кислоты на апоптоз клеток головного мозга остается предметом дискуссии [122].

Нами впервые установлено, что увеличение клеточности у животных с аутизмом связано со снижением апоптоза в регионах головного мозга (в коре, миндалине – с P5 по P15 сутки постнатального развития; в гиппокампе – в возрастном периоде P60-P90), что соответствует данным об увеличении объема головного мозга у пациентов с аутизмом [65].

Мы впервые обнаружили, что для энторинальной коры головного мозга и миндалины, в отличие от гиппокампа, характерна более ранняя секреция интерлейкина-1 $\beta$  («пик секреции» интерлейкина-1 $\beta$  в коре и миндалине наблюдается в возрасте P15, а в гиппокампе – P25), что может быть связано с отсроченным характером развития нейровоспаления, как было описано выше.

Секреция интерлейкина-1 $\beta$  коррелирует с уровнем HMGB1 (инициатора запуска секреции ИЛ-1 путем активации NLRP3 инфламмасом), высвобождающегося во внеклеточное пространство при повреждении и некрозе клеток, при аутизме в коре головного мозга (наблюдается значимая отрицательная корреляция средней силы) и миндалине (наблюдается значимая положительная корреляция средней силы) на 25-е сутки развития, что может свидетельствовать об участии внеклеточного белка HMGB1 в запуске секреции интерлейкина при аутизме. В литературе ранее была описана роль повышения уровня HMGB1 в сыворотке крови у людей с аутизмом [106], а так же у людей-аутистов с гастроинтестинальными расстройствами [105], гиперактивностью детей с аутизмом [178].

Указанные изменения могут быть связаны не только с активацией инфламмасом NLRP3 типа (однонаправленные изменения уровня HMGB1, NLRP3 и ИЛ-1 $\beta$  в миндалине животных возрастом P15-P25 и во всех исследуемых структурах в возрасте P60-P90, что позволяет предположить в эти периоды NLRP3-зависимый характер секреции ИЛ-1 $\beta$  в ответ на действие HMGB1), но и с активацией других видов инфламмасом. Так, доказано участие NLRP1, NLRP6, NLRP10, NLRP12 в секреции и созревании интерлейкина-1 $\beta$  [41, 73, 199]. Также возможен инфламмасома-независимый путь секреции интерлейкина через активацию сериновых протеаз [108]. Изучение роли инфламмасом других подтипов и возможного «прямого пути» секреции интерлейкина может являться предметом дальнейшего изучения.

Для миндалины формирование инфламмасом NLRP3 подтипа (NLRP3-зависимая секреция интерлейкина-1 $\beta$ ) является критическим процессом для животных с аутизмом в возрасте P5-P90, а для гиппокампа и коры – P60-P90, что может свидетельствовать о более раннем реагировании лимбической системы.

Известно, что HMGB1, действуя на клетки микроглии, опосредуют свой эффект через комплекс Mac1, способствуя тем самым развитию нейровоспаления [96]. В клетках микроглиальной природы Mac1 (CD11 $\beta$  и CD18) могут быть функционально сопряжены с молекулой CD157, как это ранее было продемонстрировано для полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови [48]. Мы обнаружили, что экспрессия маркеров метаболизма НАД<sup>+</sup> (CD38, CD157) и микроглии (CD18 и CD11 $\beta$  – компоненты комплекса Mac1) имеет отличия у животных с аутизмом в сравнении с контролем: у животных с аутизмом в гиппокампе увеличивается экспрессия CD38 и его коэкспрессии с CD18 в возрасте P15 и P60, в энторинальной коре увеличивается экспрессия CD38, CD157 и их коэкспрессия с CD18 в возрасте P15 и P60, в миндалине увеличивается экспрессия CD18 в возрасте P25-P90, экспрессия CD38 и его коэкспрессия с CD18 P15-P90, что в целом «совпадает» с пиками нейровоспаления в изучаемых структурах головного мозга. Превалирование экспрессии маркера микроглии CD18, в отличие от CD11 $\beta$ , особенно в комплексе с CD38 и CD157,

свидетельствуют, вероятнее всего, об усилении взаимодействий микроглии с другими типами клеток (по данным литературы, это могут быть нейрон-глиальные, глия-глиальные, микроглия-эндотелиальные и лейкоцит-микроглиальные взаимодействия), поскольку CD18 является  $\beta 2$ -интегрином, отвечающим за процесс межклеточного взаимодействия [193]. Таким образом, для животных с аутизмом характерен реактивный регион-специфический микроглиоз, характер изменения которого совпадает с изменением секреции интерлейкина-1 $\beta$  и может быть зарегистрирован по изменению коэкспрессии CD157/CD11 $\beta$ /CD18 в клетках микроглии.

Схожие изменения экспрессии интерлейкина-1 $\beta$ , NLRP3, CD38 и CD157 мы наблюдали и в экспериментальной модели болезни Альцгеймера, что в целом характеризует хроническую нейродегенерацию, и в целом, позволяет судить о степени выраженности воспалительной реакции в ткани головного мозга при экспериментальном аутизме относительно «классической» модели нейровоспаления с использованием бета-амилоид-индуцированной модели БА.

Усиление нейрогенеза при повреждении головного мозга при экспериментальном аутизме носит компенсаторный характер, что ранее нами было показано в исследовании, поддержанном в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы «Молекулярные механизмы нейрон-глиального сопряжения и организации интегративных функций мозга при реализации сложных форм поведения в норме и патологии» (2012-2013 гг.). При исследовании головного мозга 70-дневных домашних мышей (*Mus musculus*) линии CD1-ICR с пренатальным введением вальпроевой кислоты и физиологического раствора нами были получены следующие результаты (вычислялось относительное количество клеток, экспрессирующих маркер, %). В гиппокампе уровень Рахб (белок аниридии II типа, окулоромбин, тканеспецифический транскрипционный фактор) составил 21,7 (15,5...34,3) в контроле и 88,5 (64,7...97) у экспериментальных животных ( $p \leq 0,01$ ), в миндалинах эти значения составили 35,2 (31,3...40,9) и 55,7 (53...61,5) соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Во время неокортикогенеза

высокие концентрации Рах6 индуцируют экспрессию Ngn2 (Neurogenin2), также являющегося одним из транскрипционных факторов [68]. Исследования показали его значимое ( $p \leq 0,05$ ) увеличение при аутизме в миндалине 69,1 (55,5...73,6) при 43,8 (41,4...47,6) в контроле, и высоко значимые различия ( $p \leq 0,01$ ) в гиппокампе (аутизм - 95,5 (76,2...104,8), контроль 20,3 (14,3...23,4)). В свою очередь Ngn2 вызывает выход из клеточного цикла, когда начинает экспрессироваться NeuroD1 [68]. Сравнительно недавно выявлена роль NeuroD1, транскрипционного фактора bHLH, как маркера терминально дифференцирующихся нейронов [149]. Его уровень составил 87,3 (65,2...117,6) в гиппокампе контрольных животных и 234,3 (170,7...311,6) у экспериментальной группы, что является высоко значимым различием ( $p \leq 0,01$ ), однако в миндалине по этому маркеру значимых отличий нет (контроль - 106,2 (96,1...107,8), аутизм 108,9 (103,5...120)). NeuN является наиболее широко используемым маркером зрелых нейронов [143]. По нему была выявлена самая значительная разница ( $p \leq 0,01$ ) – как в миндалине (контроль - 21,0 (18,4...28,3), аутизм 102,3 (97...124,1)), так и в гиппокампе (контроль 50,8 (46,9...63,1), аутизм 268,7 (181,4...357,8)). Вероятно, причиной такой экспрессии NeuN в миндалине является миграция активно пролиферирующих клеток из гиппокампа.

В настоящем исследовании было установлено, что изменению нейрогенеза предшествует нарушение синаптогенеза: во всех изучаемых регионах головного мозга в период P5-P15 синаптогенез снижен у животных с аутизмом в сравнении с контрольными (за исключением миндалины в возрасте P5, что может быть связано с эмоциональными переживаниями животных в период «информационного всплеска»), в возрасте P60-P90 отмечается регион-специфичный характер: в миндалине и гиппокампе немного усилен синаптогенез в период P60-P90, в коре головного мозга синаптогенез восстанавливается до уровне контроля в возрасте P60, немного увеличивается в сравнении с контролем в возрасте P90.

В целом, во всех регионах головного мозга у контрольных и экспериментальных животных в возрасте P5-P15 отмечаются признаки усиления

апоптоза, нейровоспаления и синаптогенеза, в сравнении с другими временными периодами, что может быть связано с активным изучением животными окружающей среды – «информационного всплеска» (в связи с отлипанием ушной раковины и «сбором» звуковой информации, появлением у животных поисковой активности и ольфакторной дискриминации, открытия глаз и появления интенсивной «зрительной информации»), однако многие из этих параметров несколько «отстают» по времени у животных с аутизмом. Второй пик нейровоспаления, выраженное снижение апоптоза, но разнонаправленные изменения синаптогенеза, наблюдаются только у экспериментальных животных в возрасте P60-P90 и могут быть связаны с реализацией программы нейровоспаления в ответ на ее «запуск» при нейродегенерации на предыдущих «этапах» развития повреждений (пренатальное действие вальпроевой кислоты, раннее постнатальное изменение апоптоза, клеточности и запуск нейровоспаления).

Примечательно, что в это же время (возраст P60-P90, соответствующий «подростковому» и «юношескому» периодам развития человека) доминируют нарушения сложных форм поведения (признаки усиления тревожности, гиперактивности, агрессии; усугубление стереотипий; нарушение социального контакта и распознавания) с сохранением нормальных когнитивных функций (но с тенденцией к их усугублению к возрасту P90). Известно, что при дисфункции гиппокампа преобладают когнитивные расстройства, при дисфункции миндалины – эмоционально-поведенческие расстройства (социальный дефицит, депрессия, тревожность) [145], энторинальная кора является связующим звеном между гиппокампом и неокортекса ее нарушения могут быть связаны как с эмоционально-поведенческими, так и когнитивными расстройствами [198].

Указанные изменения поведения могут быть связаны с более ранним характером повреждения коры головного мозга и миндалины (хотя миндалина более устойчива к действию повторного стресса, в сравнении с корой), в отличие от гиппокампа, повреждения которого носят отсроченный характер (так, когнитивные нарушения у мышей с моделями стресса раннего периода жизни зафиксированы только в возрасте P150) [52, 164].

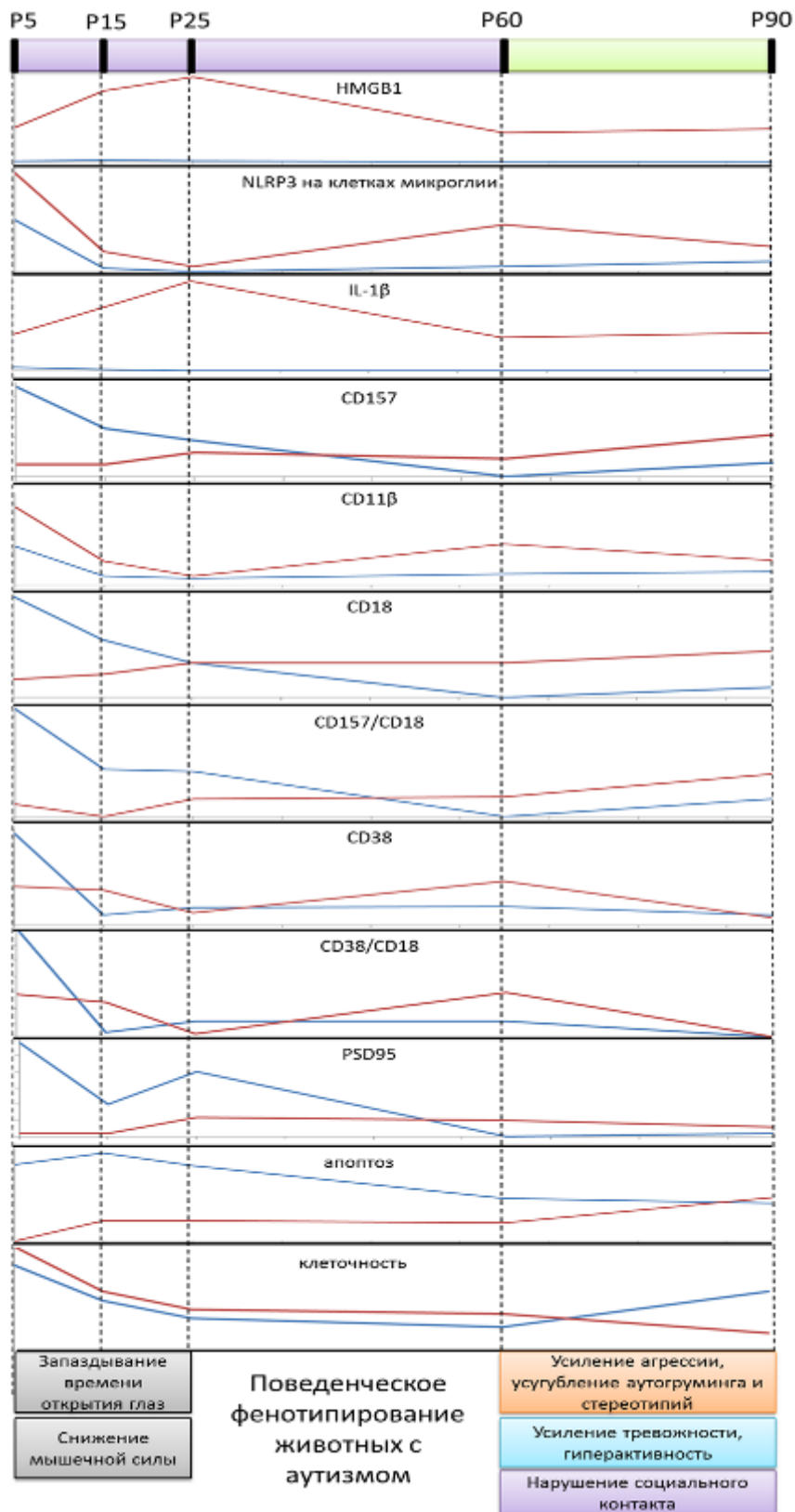


Рисунок 42 – Динамическое изменение уровня экспрессии молекул нейровоспаления/микроглии, апоптоза и клеточности в гиппокампе экспериментальных и контрольных животных в возрасте P5-P90.

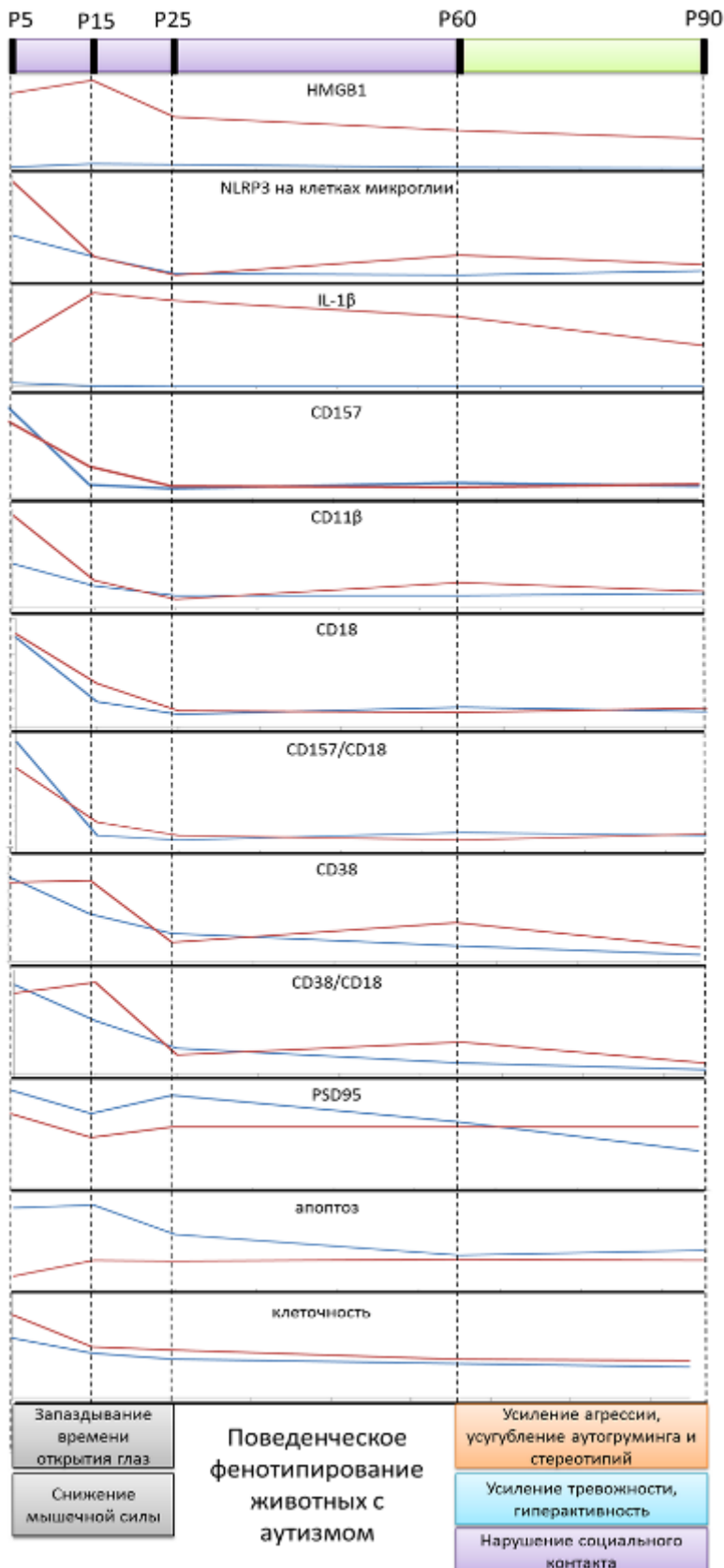


Рисунок 43 – Динамическое изменение уровня экспрессии молекул нейровоспаления/микроглии, апоптоза и клеточности в энторинальной коре экспериментальных и контрольных животных в возрасте P5-P90.



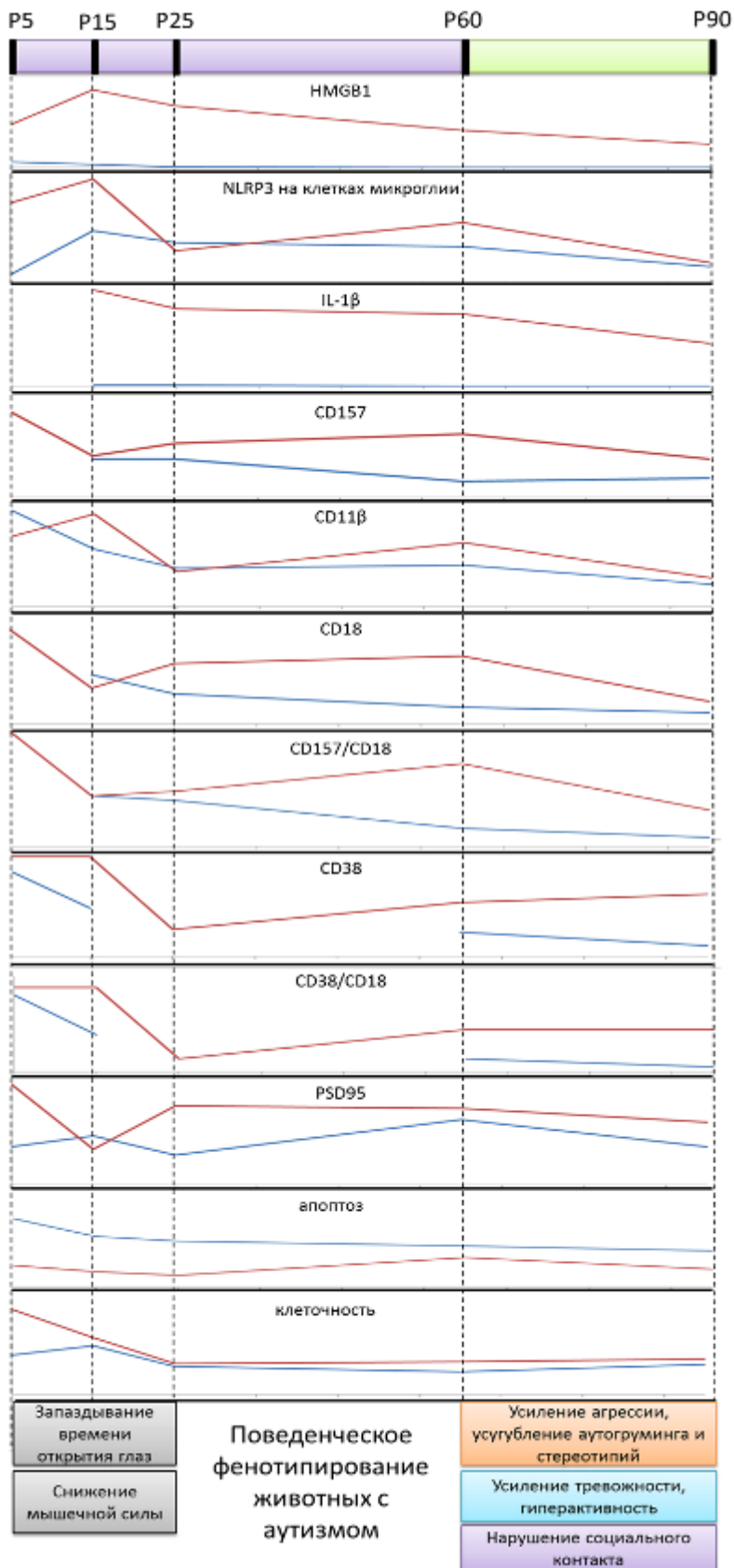


Рисунок 44 – Динамическое изменение уровня экспрессии молекул нейровоспаления/микроглии, апоптоза и клеточности в базолатеральной миндале экспериментальных и контрольных животных в возрасте P5-P90.

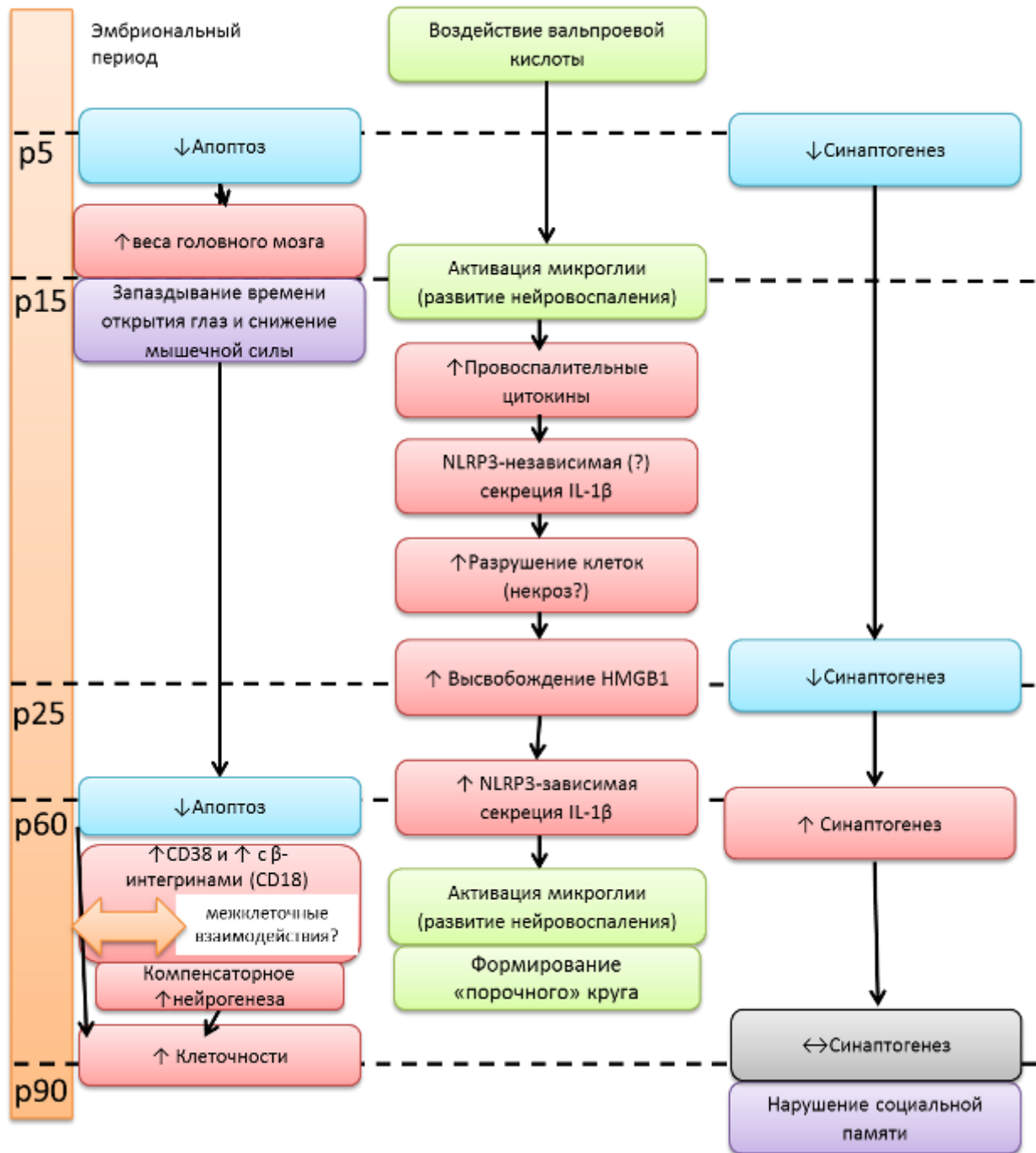


Рисунок 45 – Роль нейровоспаления в развитии повреждения гиппокампа у животных с экспериментальным аутизмом (в сравнении с контролем) в возрасте P5-P90.

Примечания: красный цвет - увеличение уровня; голубой цвет – уменьшение уровня (оба параметра в сравнении с контролем); серый цвет – восстановление до уровня контроля; фиолетовый цвет – особенности неврологической симптоматики; зеленый цвет – основные патогенетические механизмы).

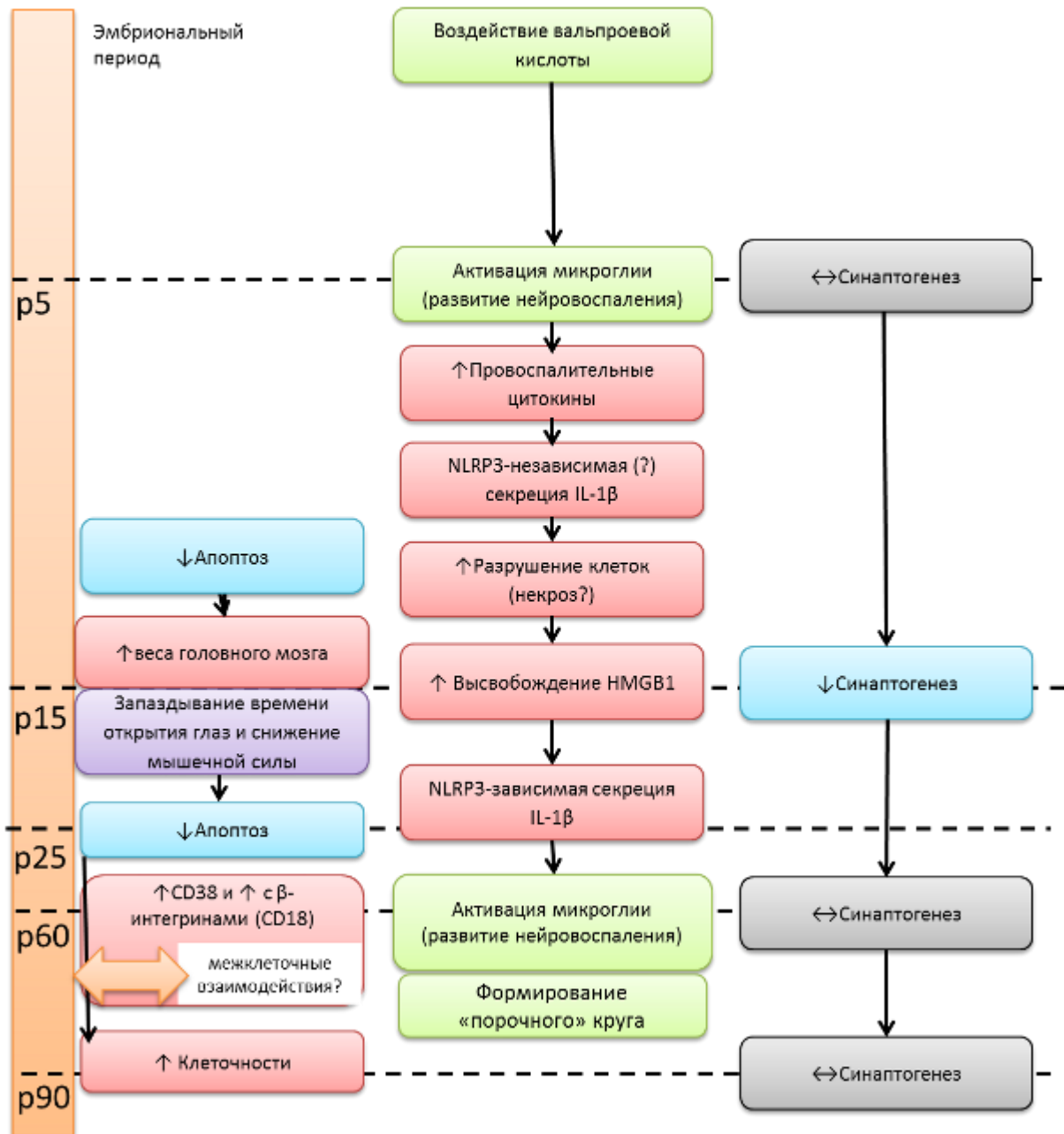


Рисунок 46 – Роль нейровоспаления в развитии повреждения энторинальной коры животных с экспериментальным аутизмом (в сравнении с контролем) в возрасте P5-P90.

Примечания: красный цвет - увеличение уровня; голубой цвет – уменьшение уровня (оба параметра в сравнении с контролем); серый цвет – восстановление до уровня контроля; фиолетовый цвет – особенности неврологической симптоматики; зеленый цвет – основные патогенетические механизмы).

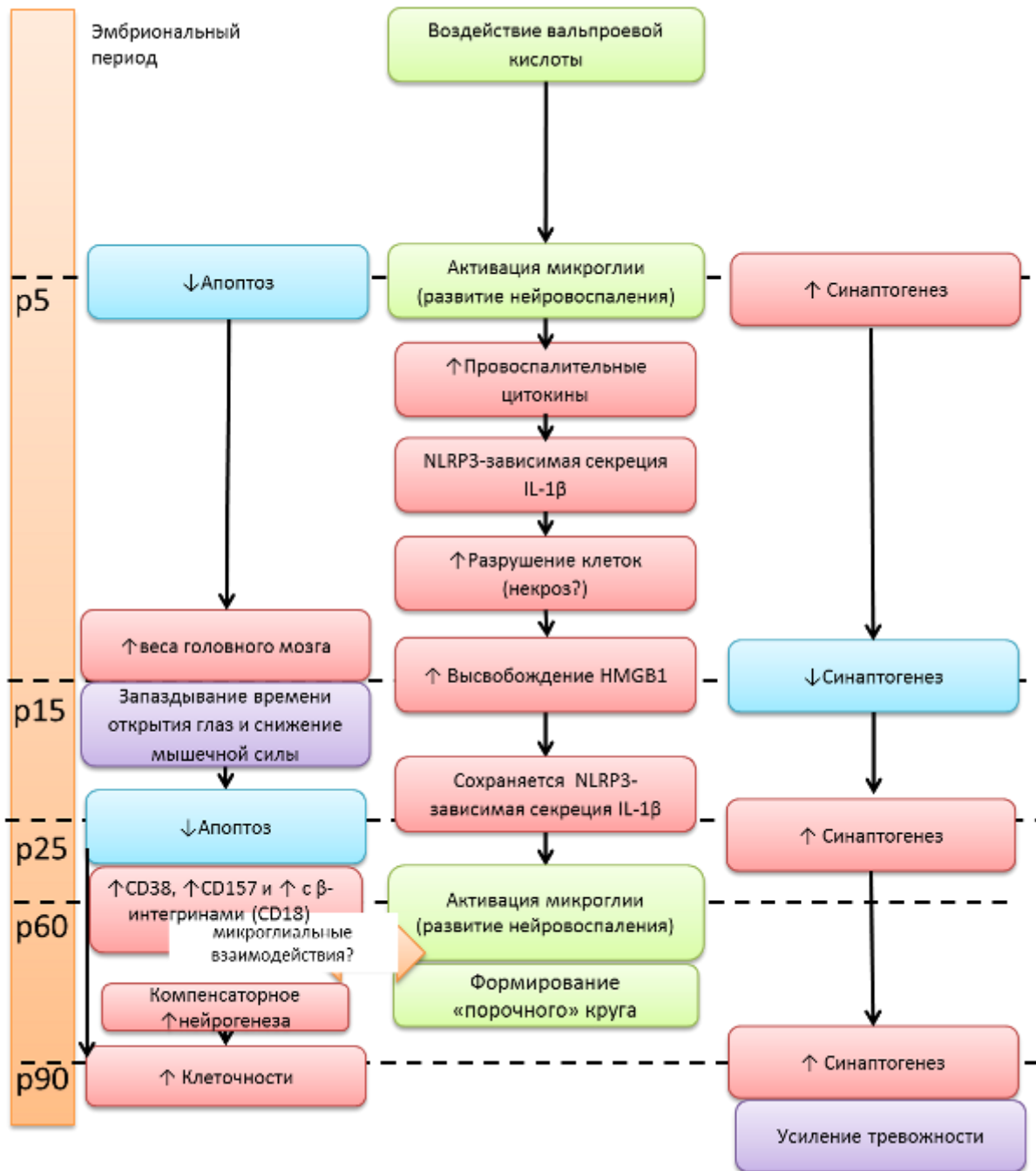


Рисунок 47 – Роль нейровоспаления в развитии повреждения базолатеральной миндалины животных с экспериментальным аутизмом (в сравнении с контролем) в возрасте P5-P90.

Примечания: красный цвет - увеличение уровня; голубой цвет – уменьшение уровня (оба параметра в сравнении с контролем); серый цвет – восстановление до уровня контроля; фиолетовый цвет – особенности неврологической симптоматики; зеленый цвет – основные патогенетические механизмы).

Таким образом, развитие нейровоспаления характерно для животных с экспериментальным аутизмом, индуцированным пренатальным введением вальпроевой кислоты. Выраженность воспаления определяется характером активации клеток микроглии на самых ранних этапах постнатального развития животных, что сопровождается нарушением процессов апоптоза, синаптогенеза и соответствует – в более поздние периоды онтогенеза – нарастанию признаков нарушения социального взаимодействия, доминирования агрессии, тревожности и стереотипий.

Помимо этого, в ходе исследования было обнаружено значимое различие в содержании окситоцина в гомогенатах тканей гипоталамуса и гипофиза на 60 и 90 сутки развития, миндалины головного мозга в возрасте 90 суток между группами контроля и эксперимента в сторону более низких показателей у групп с пренатальным введением вальпроевой кислоты. Учитывая нарушения социального взаимодействия, прогрессирующие с увеличением возраста, усиление таких признаков, как тревожность, полученные данные свидетельствуют о состоятельности экспериментальной модели аутизма в связи со снижением секреции нейропептида окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе, а также с вовлечением миндалины головного мозга в патологический процесс (развитие нейровоспаления).

Выявленные изменения суммированы в схеме патогенеза расстройств аутистического спектра по полученным нами данным (рисунок 48), описывающей как общий механизм секреции интерлейкина- $1\beta$  в ответ на действие HMGB1 и формирование NLRP3 инфламмасом в клетках микроглии, так и регион-специфический характер развития повреждений в коре, гиппокампе и миндалине головного мозга (особенности изменения апоптоза, синаптогенеза, экспрессии микроглиальных маркеров и маркеров межклеточных взаимодействий, уровня HMGB1, экспрессии NLRP3 и секреции интерлейкина).

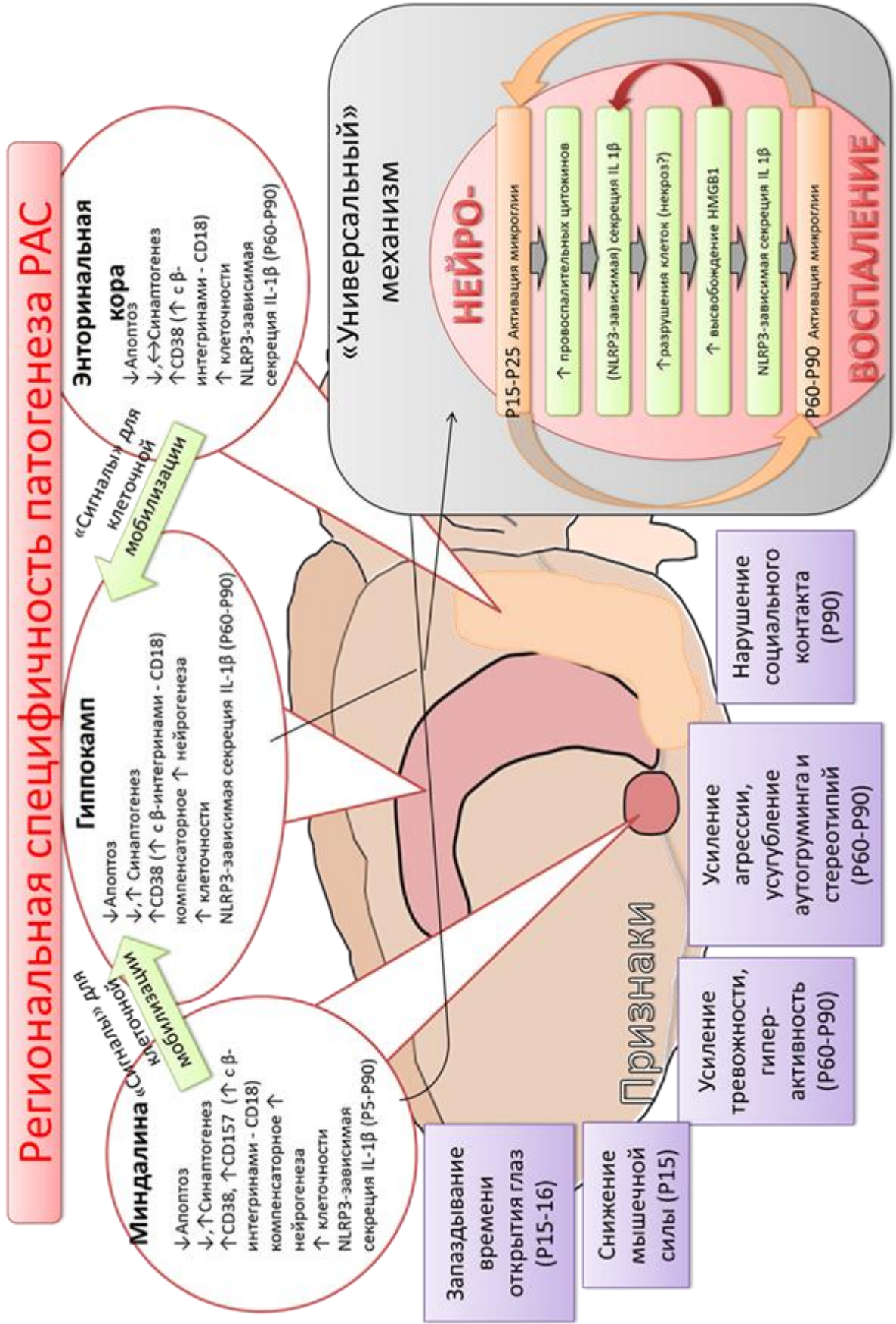


Рисунок 48 – Регион-специфический характер повреждения коры, миндалин и гиппокампа головного мозга в патогенезе экспериментального аутизма.

**ВЫВОДЫ:**

1. При экспериментальном аутизме в сравнении с контролем отмечается задержка соматического развития, появление стереотипного поведения, тревожности, агрессивности к 60 суткам и их усугубление к 90 суткам развития; нарушение социального распознавания с 25 суток прогрессирующее к P90, но когнитивные функции, моторная, сенсорная и координаторная сферы не страдают. При пренатальном введении вальпроевой кислоты значительно снижен уровень окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе: в гипоталамусе в 4 раза ниже, чем в контроле, на 60 и 90 сутки; в гипофизе – в 2,5 раза ниже на 60-е, в 6 раз ниже на 90-е сутки; в миндалинах 3-кратное уменьшение на 90 сутки.

2. Выявлены регион-специфичные и общие особенности экспрессии CD11 $\beta$ , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, интерлейкина-1 $\beta$ , PSD95, уровня апоптоза в аффектированных регионах головного мозга (гиппокамп, кора, миндалина) при экспериментальном аутизме и в контроле на 5, 15, 25, 60 и 90 сутки развития. Для гиппокампа характерен отсроченный характер развития повреждений при пренатальном введении вальпроевой кислоты: пик нейровоспаления с возраста P25 (увеличение экспрессии HMGB1, интерлейкина-1 $\beta$ , CD11 $\beta$ , CD18) с последующей активацией экспрессии NLRP3 на 60-е сутки постнатального периода и NLRP3-зависимой секрецией интерлейкина-1 $\beta$ ; активация экспрессии CD38, CD157 в возрасте P60; подавление синаптогенеза (экспрессия PSD95) на сроках P5-P25 с последующим усилением на 60-е сутки постнатального развития и нормализация до уровня контроля на P90; значимое снижение уровня апоптоза в период P5-P60 и тенденция к его интенсификации на P90, чему также соответствует тенденция к увеличению клеточности на 5-25-е сутки развития и значимое увеличение этого показателя к P60-P90. При экспериментальном аутизме в коре и миндалинах процессы нейровоспаления запускаются ранее, с P15 (увеличение экспрессии HMGB1, интерлейкина 1 $\beta$ , CD11 $\beta$ , CD18), отмечается повышенная экспрессия NLRP3 на 15-е сутки постнатального развития со вторым пиком на P60; у животных с аутизмом в

гиппокампе увеличивается экспрессия CD38 и его коэкспрессия с CD18 в возрасте P15 и P60, в энторинальной коре увеличивается экспрессия CD38, CD157 и их коэкспрессия с CD18 в возрасте P15 и P60, в миндалине увеличивается экспрессия CD18 в возрасте P25-P90, экспрессия CD38 и его коэкспрессия с CD18 P15-P90; процессы синаптогенеза (экспрессия PSD95) в миндалине интенсифицируются в возрасте P5 и в периоде P25-P90, снижаясь на 15-е сутки жизни.

3. Клеточно-молекулярные признаки нейровоспаления при аутизме сопоставимы по своей выраженности с «классическим» нейровоспалением при экспериментальной болезни Альцгеймера, которое характеризуется увеличением экспрессии NLRP3-инфламмасом, ИЛ-1 и НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов CD38 и CD157 в ткани головного мозга. Процессы запрограммированной клеточной гибели в коре головного мозга значимо подавлены при экспериментальном аутизме в период P5-P25, в миндалине – P5-P90, при этом в коре клеточность значимо выше примерно в те же сроки, а в миндалине – лишь в возрасте P5-P15.

4. Выявлены значимая отрицательная средняя по силе в коре, положительная средняя по силе связь в миндалине при пренатальном введении вальпроевой кислоты в возрасте 25 суток, высокозначимая положительная средняя по силе связь в миндалине при экспериментальном аутизме на 90 сутки постнатального развития при исследовании связей между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина-1 $\beta$ .



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Потенциальными молекулами-маркерами при аутизме могут быть маркеры микроглии, нейровоспаления и метаболизма НАД<sup>+</sup> (CD11 $\beta$ , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, интерлейкин-1 $\beta$ ), синаптогенеза (PSD95).

2. Оценка уровня окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и миндалине головного мозга, в сочетании с тестами для оценки эмоционально-поведенческих и социальных расстройств в возрасте экспериментальных животных P60-P90, рекомендуются к использованию для верификации модели экспериментального аутизма.

3. Регион-специфический характер изменений (различия в миндалине, энторинальной коре головного мозга и гиппокампе) и возраст-зависимый характер изменения нейровоспаления необходимо учитывать при проведении дальнейших исследований на животных с моделями экспериментального аутизма и разработке препаратов с таргетным механизмом действия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АМРА	- $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислота
АДФ	- аденозиндифосфат
БА	– болезнь Альцгеймера;
БАС	- боковой амиотрофический склероз
БП	- болезнь Паркинсона
ГБОУ ВПО	– государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования;
ГЭБ	- гематоэнцефалический барьер
ИЛ	- интерлейкин
мРНК	- матричная/информационная рибонуклеиновая кислота
НАД	– никотинамидадениндинуклеотид
РАС	– расстройства аутистического спектра;
СИОЗС	- селективный ингибитор обратного захвата серотонина
ЦНС	– центральная нервная система;
BDNF	- brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга
BSA	- bovine serum albumin
CBS	- цистатионин бета-синтаза
CD11 $\beta$	интегрин альфа-M, мембранный белок, гликопротеин из надсемейства интегринов
CD18	- $\beta$ 2-интегрин, мембранный белок, гликопротеин
CDK5	- циклин-зависимая киназа 5
FMR1	- fragile X mental retardation 1, синдром хрупкой X-хромосомы
HMGB1	- high mobility group box 1, амфотерин, белок из группы ядерных негистоновых белков

ICAM-1	- Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, молекула межклеточной адгезии 1 типа
IGF-1	- инсулиноподобный фактор роста 1
IL1RAPL1	- X-linked interleukin-1 receptor accessory protein like-1
JNK	-Jun N-терминальные киназы
MAC-1	- Macrophage-1 antigen, мембранный белок, гетеродимерный интегрин подсемейства $\beta$ 2-интегринов, состоящий из альфа цепи $\alpha$ M (CD11 $\beta$ ) и бета цепи $\beta$ 2 (CD18).
MCP	- monocyte chemotactic protein, фактор хемотаксиса моноцитов
MeCP2	- метил-CpG-связывающий белок
MIG-6	- mitogen-inducible gene 6 protein
miRNA	- микроРНК, малые некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты
NF- $\kappa$ B	- nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, транскрипционный ядерный фактор «каппа-би»
NLRP3	- цитозольный белок, Nod-подобный рецептор семейства NALP, основной компонент одноимённого типа инфламмасом
NLRC4	- цитозольный белок, Nod-подобный рецептор из подсемейства NOD, активатор каспазы-1
NMDA	- N-метил-D-аспартат
NSS	- Neurological Severity Score /шкала оценки неврологического дефицита;
PAX6	- paired box protein/белок аниридии II типа/окулоромбин;
PBS	- phosphate buffered saline/фосфатно-солевой буфер
PFA	- параформальдегид
PSD95	- postsynaptic density protein 95, белок постсинаптической плотности
RAGEs	- рецепторы для конечных продуктов гликирования

SHANK3	- SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3,
TdT	- terminal deoxynucleotidyl transferase/терминальная дезоксиуридин-трансфераза;
TGF- $\beta$	- трансформирующий фактор роста $\beta$
TLRs	- Toll-подобные рецепторы
TNF- $\alpha$	- tumor necrosis factor $\alpha$ , фактор некроза опухоли альфа
TUNEL	- TdT-mediated dUPT nick end labeling;

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Амикишиева, А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикишиева // Информац. Вестн. ВОГиС. – 2009. – № 3. – С. 529–542.
2. Ахмадеев, А. В. Нейроэндокринная регуляция функция миндалевидного тела мозга: роль половых стероидов и норадреналина / А. В. Ахмадеев, Л. Б. Калимуллина // Морфология. – 2010. – Т. 138, № 5. – С. 73–77.
3. Безгодова, А. А. Этиопатогенез расстройств аутистического спектра: современные аспекты проблемы / А. А. Безгодова, М. В. Злоказова // Вятский мед. вестн. – 2015. – № 2. – С. 25–28.
4. Горелов, П. И. Оценка прокогнитивного эффекта дилепта и его основного метаболита, ГЗР-125, в тесте распознавания объектов у крыс / П. И. Горелов, Р. У. Островская, Н. М. Сазонова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 7. – С. 3–5.
5. Изменение пролиферации клеток в субвентрикулярной зоне мозга у взрослых крыс при введении  $\beta$ -амилоидного пептида (25-35) / М. Ю. Степаничев, Ю. В. Моисеева, Н. А. Лазарева и др. // Морфология. – 2009. – Т. 135, № 1. – С. 13–16.
6. Климась, Д. Г. Развитие регуляции эмоций у детей 6-10 лет с расстройствами аутистического спектра / Д. Г. Климась, М. К. Бардышевская // Вестн. Моск. ун-та. Серия 14: Психология. – 2007. – № 2. – С. 47–58.
7. Клиническая характеристика детей с заболеваниями аутистического спектра / Ю. А. Пичугина, А. А. Сумароков, А. Б. Салмина и др. // Сиб. мед. обозрение. – 2009. – Т. 60, № 6. – С. 74–78.
8. Коваленко, И. Л. Развитие симптомов аутистического спектра под влиянием хронического социального стресса у тревожных самцов мышей: влияние диазепама / И. Л. Коваленко, Н. Н. Кудрявцева // Психофармакология и биологическая наркология. – 2010. – Т. 10, № 1–2. – С. 2624–2635.

9. Кренева, Е. С. Современный подход к изучению проблемы расстройств аутистического спектра / Е. С. Кренева // Изв. Рос. гос. педагогического ун-та им. А.И. Герцена. – 2007. – Т. 15, № 39. – С. 297–299.
10. Кудряшова, И. В. Каспаза-3 и калпаин: разнонаправленное участие в пресинаптической долговременной пластичности / И. В. Кудряшова, М. В. Онуфриев, Н. В. Гуляева // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 200–2006.
11. Максимова, К. Ю. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении / К. Ю. Максимова, Н. А. Стефанова, С. В. Логвинов // Бюл. сиб. медицины. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–61.
12. Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов, нейротрансмиттеров и трофических факторов в генезе депрессивных расстройств / Г. А. Григорьян, Н. Н. Дыгало, А. Б. Гехт и др. // Успехи физиол. наук. – 2014. – Т. 45, № 2. – С. 3–19.
13. Молекулярные механизмы нарушения развития мозга в пре- и неонатальном периоде / А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. В. Кувачева и др. // Вопр. соврем. педиатрии. – 2012. – Т. 11, № 6. – С. 15–20.
14. Перспективы диагностики расстройств аутистического спектра у детей / О. Г. Новосёлова, Г. А. Каркашадзе, Н. В. Журкова и др. // Вопр. соврем. педиатрии. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 61–68.
15. Подольский, И. Я. Навигационное научение и формирование долговременной пространственной памяти [Электронный ресурс] / И. Я. Подольский, А. А. Лебединский, А. А. Деев // Когнитивная наука: материалы первой Всерос. конф. – Казань, 2004. – Режим доступа: <http://old.kpfu.ru/ss/cogsci04/science/cogsci04/sod.php3> (дата обращения: 12.10.15)
16. Самотруева, М. А. Экспериментальные модели поведения / М. А. Самотруева, Д. Л. Теплый, И. Н. Тюренков // Естественные науки. – 2009. – Т. 27, № 2. – С. 140–152.
17. Селективная чувствительность гиппокампа к интероцептивному стрессу: влияние на интерлейкин-1 $\beta$  и эритропоэтин / А. К. Пискунов, А. А. Яковлев, М. Ю. Степаничев и др. // Нейрохимия. – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 216–

219.

18. Степаничев, М. Ю. Использование бета-амилоидных пептидов для моделирования у животных болезни Альцгеймера и исследование механизмов ее патогенеза / М. Ю. Степаничев, Н. В. Гуляева // Технологии живых систем. – 2011. – Т. 8, № 4. – С. 3–14.

19. Экспериментальная модель аутистического расстройства: индуцированный фетальный вальпроатный синдром / А. В. Малышев, К. Р. Аббасова, О. А. Аверина и др. // Вестн. Моск. гос. ун-та. Серия 16. Биология. – 2015. – № 3. – С. 8–12.

20. Юров, И. Ю. Трансляционные молекулярно-генетические исследования аутизма / И. Ю. Юров, С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров // Психиатрия. – 2013. – Т. 57, № 1. – С. 51–57.

21. Absence of strong strain effects in behavioral analyses of Shank3-deficient mice / E. Drapeau, N. P. Dorr, G. A. Elder et al. // Dis. Model Mech. – 2014. – Vol. 7, № 6. – P. 667–681.

22. Activation of ER stress and autophagy induced by TDP-43 A315T as pathogenic mechanism and the corresponding histological changes in skin as potential biomarker for ALS with the mutation / X. Wang, S. Zhou, X. Ding et al. // Int. J. Biol. Sci. – 2015. – Vol. 11, № 10. – P. 1140–1149.

23. Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P<sub>2</sub>Y receptors / T. Ogata, M. Chuai, T. Morino et al. // Brain Res. – 2003. – Vol. 981, № 1–2. – P. 174–183.

24. ADHD and autism: differential diagnosis or overlapping traits? A selective review / R. Taurines, C. Schwenck, E. Westerwald et al. // Atten. Defic. Hyperact. Disord. – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 115–139.

25. Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint / M. A. Zapala, I. Hovatta, J. A. Ellison et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2005. – Vol. 102, № 29. – P. 10357–10362.

26. Aggressive behavior problems in children with autism spectrum disorders: prevalence and correlates in a large clinical sample / A. P. Hill, K. E. Zuckerman, A. D.

Hagen et al. // *Res. Autism Spectr. Disord.* – 2014. – Vol. 8, № 9. – P. 1121–1133.

27. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism / D. M. Kerr, L. Downey, M. Conboy et al. // *Behav. Brain Res.* – 2013. – Vol. 249. – P. 124–132.

28. Altered expression of Alzheimer's disease-related genes in the cerebellum of autistic patients: a model for disrupted brain connectome and therapy / F. Zeidán-Chuliá, B.-H. N. de Oliveira, A. B. Salmina et al. // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. e1250.

29. Analysis of nuclear high mobility group box 1 (HMGB1)-binding proteins in colon cancer cells: clustering with proteins involved in secretion and extranuclear function / H. Lee, N. Shin, M. Song et al. // *J. Proteome Res.* – 2010. – Vol. 9, № 9. – P. 4661–4670.

30. Andres, C. Molecular genetics and animal models in autistic disorder / C. Andres // *Brain Res. Bull.* – 2002. – Vol. 57, № 1. – P. 109–119.

31. Antibodies against fetal brain in sera of mothers with autistic children / H. S. Singer, C. M. Morris, C. D. Gause et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2008. – Vol. 194, № 1–2. – P. 165–172.

32. Antidepressant exposure in pregnancy and risk of autism spectrum disorders / M. J. Sorensen, T. K. Gronborg, J. Christensen et al. // *Clin. Epidemiol.* – 2013. – Vol. 5. – P. 449–459.

33. Anxiety and sensory over-responsivity in toddlers with autism spectrum disorders: bidirectional effects across time / S. A. Green, A. Ben-Sasson, T. W. Soto et al. // *J. Autism Dev. Disord.* – 2012. – Vol. 42, № 6. – P. 1112–1119.

34. Association study between the CD157/BST1 gene and autism spectrum disorders in a Japanese population / S. Yokoyama, N. Al Mahmuda, T. Munesue et al. // *Brain Sci.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 188–200.

35. Autism spectrum disorders / C. Lord, E. H. Cook, B. L. Leventhal et al. // *Neuron.* – 2000. – Vol. 28, № 2. – P. 355–363.

36. Autoantibody repertoires to brain tissue in autism nuclear families / S. C. Silva, C. Correia, C. Fesel et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2004. – Vol. 152, № 1–2. – P.



176–182.

37. Banerjee, S. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models [Electronic resource] / S. Banerjee, M. Riordan, M. A. Bhat // *Front. Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – URL : <http://10.24.53.19:9091/servlet/com.trend.iwss.user.servlet.sendfile?downloadfile=IRES-148615908-DD58BFF8-16482-16451-177> (access date: 15.02.2016).
38. Barker, D. J. The developmental origins of adult disease / D. J. Barker // *Eur. J. Epidemiol.* – 2003. – Vol. 18, № 8. – P. 733–736.
39. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid / F. I. Roullet, L. Wollaston, D. Decatanzaro et al. // *Neuroscience.* – 2010. – Vol. 170, № 2. – P. 514–522.
40. Behavioral Phenotyping Assays for Assessment of Sociability and Social Memory in a Purported Mouse Model of Autism Spectrum Disorders [Electronic resource] / J. E. Valenzuela, P. L. Bader, R. W. Tsien et al. – URL: [http://sbfnl.stanford.edu/Documents/josie\\_poster.pdf](http://sbfnl.stanford.edu/Documents/josie_poster.pdf) (access date: 15.02.2016).
41. Belibasakis, G. N. Aggregatibacter actinomycetemcomitans targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes / G. N. Belibasakis, A. Johansson // *Cytokine.* – 2012. – Vol. 59, № 1. – P. 124–130.
42. Block, M. L. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism / M. L. Block, J. S. Hong // *Prog. Neurobiol.* – 2005. – Vol. 76, № 2. – P. 77–98.
43. Boche, D. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain / D. Boche, V. H. Perry, J. A. Nicoll // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2013. – Vol. 39, № 1. – P. 3–18.
44. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer's disease / W. S. T. Griffin, L. C. Stanley, C. Ling et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, № 19. – P. 7611–7615.
45. Burnstock, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system / G. Burnstock // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7, № 7. – P. 575–590.

46. Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship / K. Bianchi, A. Rimessi, A. Prandini et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1742, № 1–3. – P. 119–131.
47. Casanova, M. F. The neuropathology of autism / M. F. Casanova // *Brain Pathology.* – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 422–433.
48. CD157 is part of a supramolecular complex with CD11b/CD18 on the human neutrophil cell surface / L. Lavagno, E. Ferrero, E. Ortolan et al. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2007. – Vol. 21, № 1–2. – P. 5–11.
49. CD38 gene knockout juvenile mice: a model of oxytocin signal defects in autism / H. Higashida, S. Yokoyama, T. Munesue et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 34, № 9. – P. 1369–1372.
50. Changes of soluble interleukin-2, interleukin-2 receptor, T8 antigen, and interleukin-1 in the serum of autistic children / V. K. Singh, R. P. Warren, J. D. Odell et al. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1991. – Vol. 61, № 3. – P. 448–455.
51. Cheung, Z. H. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2 / Z. H. Cheung, K. Gong, N. Y. Ip // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28, № 19. – P. 4872–4877.
52. Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice / E. F. Naninck, L. Hoeijmakers, N. Kakava-Georgiadou et al. // *Hippocampus.* – 2015. – Vol. 25, № 3. – P. 309–328.
53. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009 / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele et al. // *Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 3–11.
54. Cohort effects explain the increase in autism diagnosis among children born from 1992 to 2003 in California / K. M. Keyes, E. Susser, K. Cheslack-Postava et al. // *Int. J. Epidemiol.* – 2012. – Vol. 41, № 2. – P. 495–503.
55. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders / K. Wang, H. Zhang, D. Ma et al. // *Nature.* – 2009. – Vol. 459, № 7246. – P. 528–533.
56. Comorbid anxiety symptoms in children with pervasive developmental

disorders / P. Muris, P. Steerneman, H. Merckelbach et al. // *J. Anxiety Disord.* – 1998. – Vol. 12, № 4. – P. 387–393.

57. Craft, J. M. Human amyloid beta induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration / J. M. Craft, D. M. Watterson, L. J. Van Eldik // *Glia.* – 2006. – Vol. 53, № 5. – P. 484–490.

58. Currenti, S. A. Understanding and determining the etiology of autism / S. A. Currenti // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 30, № 2. – P. 161–171.

59. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps / K. Amunts, O. Kedo, M. Kindler et al. // *Anat. Embryol. (Berl).* – 2005. – Vol. 210, № 5–6. – P. 343–352.

60. Davis, E. P. The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development / E. P. Davis, C. A. Sandman // *Child Dev.* – 2011. – Vol. 81, № 1. – P. 131–148.

61. de Araujo, E. G. Neuronal cell survival: the role of interleukins / E. G. de Araujo, G. M. da Silva, A. A. dos Santos // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1153. – P. 57–64.

62. de Groat, W. C. Neural control of the lower urinary tract / W. C. de Groat, D. Griffiths, N. Yoshimura // *Compr. Physiol.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 327–396.

63. Deane, R. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates Alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier / R. Deane, Z. Wu, B. V. Zlokovic // *Stroke.* – 2004. – Vol. 35, № 11. – P. 2628–2631.

64. Decreased Bdnf expression and reduced social behavior in periadolescent rats following prenatal stress / A. Berry, P. Panetta, A. Luoni et al. // *Dev. Psychobiol.* – 2015. – Vol. 57, № 3. – P. 365–373.

65. DeRamus, T. P. Anatomical likelihood estimation meta-analysis of grey and white matter anomalies in autism spectrum disorders / T. P. DeRamus, R. K. Kana // *Neuroimage Clin.* – 2014. – Vol. 7. – P. 525–536.

66. Deregulation of EIF4E: a novel mechanism for autism / M. Neves-Pereira, B. Muller, D. Massie et al. // *J. Med. Genet.* – 2009. – Vol. 46, № 11. – P. 759–765.

67. Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of autism / M. G. Codagnone, M. F. Podestá, N. A. Uccelli et al. // *Dev. Neurosci.* – 2015. – Vol. 37, № 3. – P. 215–231.
68. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6 / R. Scardigli, N. Baumer, P. Gruss et al. // *Development.* – 2003. – Vol. 130, № 14. – P. 3269–3281.
69. Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys / M. R. Herbert, D. A. Ziegler, C. K. Deutsch et al. // *Brain.* – 2003. – Vol. 126, Pt. 5. – P. 1182–1192.
70. Donaldson, Z. R. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality / Z. R. Donaldson, L. J. Young // *Science.* – 2008. – Vol. 322, № 5903. – P. 900–904.
71. Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins / R. Donato // *Microsc. Res. Tech.* – 2003. – Vol. 60. – P. 540–551.
72. Dong, H. Mast cells and neuroinflammation / H. Dong, X. Zhang, Y. Qian // *Med. Sci. Monit. Basic Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 200–206.
73. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii* / G. Gorfou, K.M. Cirelli, M. B Melo et al. // *MBio.* – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. e01117–13.
74. Dulle, J. E. Crystallins and neuroinflammation: The glial side of the story / J. E. Dulle, P. E. Fort // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1860, № 1. Pt. B. – P. 278–286.
75. Dysregulated brain immunity and neurotrophin signaling in Rett syndrome and autism spectrum disorders / T. C. Theoharides, M. Athanassiou, S. Panagiotidou et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2015. – Vol. 279. – P. 33–38.
76. Early life programming and neurodevelopmental disorders / T. L. Bale, T. Z. Baram, A. S. Brown et al. // *Biol. Psychiatry.* – 2010. – Vol. 68, № 4. – P. 314–319.
77. Ectoenzymes and innate immunity: the role of human CD157 in leukocyte trafficking / A. Funaro, E. Ortolan, P. Bovino et al. // *Front Biosci. (Landmark Ed).* – 2009. – Vol. 14. – P. 929–943.

78. Endogenous HMGB1 regulates autophagy / D. Tang, R. Kang, K.M. Livesey et al. // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 190, № 5. – P. 881–892.
79. Evidence of cell-nonautonomous changes in dendrite and dendritic spine morphology in the met-signaling-deficient mouse forebrain / M. C. Judson, K. L. Eagleson, L. Wang et al. // *J. Comp. Neurol.* – 2010. – Vol. 518, № 21. – P. 4463–4478.
80. Evidence of neurodegeneration in autism spectrum disorder [Electronic resource] / J. K. Kern, D. A. Geier, L. K. Sykes et al. // *Transl. Neurodegener.* – 2013. – Vol. 2, № 1. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3751488/pdf/2047-9158-2-17.pdf> (access date: 15.02.2016).
81. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines / P. F. Stahel, E. Shohami, F. M. Younis et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2000. – Vol. 20, № 2. – P. 369–380.
82. Exploring mitochondrial system properties of neurodegenerative diseases through interactome mapping / J. Vlasblom, K. Jin, S. Kassir et al. // *J. Proteomics.* – Vol. 100. – P. 8–24.
83. Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism / E. Parker-Athill, D. Luo, A. Bailey et al. // *J. Neuroimmunol.* – 2009. – Vol. 217, № 1–2. – P. 20–27.
84. Fombonne, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders / E. Fombonne // *Pediatr. Res.* – 2009. – Vol. 65, № 6. – P. 591–598.
85. Functional imaging of conditioned aversive emotional responses in antisocial personality disorder / F. Schneider, U. Habel, C. Kessler et al. // *Neuropsychobiology.* – 2000. – Vol. 42, № 4. – P. 192–201.
86. Garcia-Penas, J. J. Abnormalities of synaptogenesis in autism. Pathogenic and therapeutic implications / J. J. Garcia-Penas, J. Dominguez-Carral, E. Pereira-Bezanilla // *Rev. Neurol.* – 2012. – Vol. 54, № 1. – P. S41–S50.
87. Geier, D. A. A prospective cross-sectional cohort assessment of health, physical, and behavioral problems in autism spectrum disorders / D. A. Geier, J. K.

Kern, M. R. Geier // *Maedica (Buchar)*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – P. 193–200.

88. Genes controlling affiliative behavior as candidate genes for autism / C. M. Yrigollen, S. S. Han, A. Kochetkova et al. // *Biol. Psychiatry*. – 2008. – Vol. 63, № 10. – P. 911–916.

89. Geschwind, D. H. Advances in autism / D. H. Geschwind // *Annu. Rev. Med.* – 2009. – Vol. 60, № 1. – P. 367–380.

90. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity / H. Nishiyama, T. Knopfel, S. Endo, S. Itohara // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol. 99, № 6. – P. 4037–4042.

91. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders / M. Elsabbagh, G. Divan, Y. J. Koh et al. // *Autism Res.* – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 160–179.

92. Goyal, D. K. Neuro-immune abnormalities in autism and their relationship with the environment: a variable insult model for autism [Electronic resource] / D. K. Goyal, J. A. Miyan // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. – 2014. – Vol. 5. – URL: <http://10.24.53.19:9091/servlet/com.trend.iwss.user.servlet.sendfile?downloadfile=IRES-142630055-DBA96040-31722-31691-155> (access date: 15.02.2016).

93. Gupta, S. What is schizophrenia: A neurodevelopmental or neurodegenerative disorder or a combination of both? A critical analysis / S. Gupta, P. Kulhara // *Indian J. Psychiatry*. – 2010. – Vol. 52, № 1. – P. 21–27.

94. Hardy, J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal / J. Hardy // *J. Alzheimers Dis.* – 2006. – Vol. 9, № 3. – P. 151–153.

95. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum / K. Abu-Elneel, T. Liu, F. S. Gazzaniga et al. // *Neurogenetics*. – 2008. – Vol. 9, № 3. – P. 153–161.

96. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors / J. S. Park, F. Gamboni-Robertson, Q. He et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 290, № 3. – P. C917–C924.

97. Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine

responses / H. Cohen, Z. Kaplan, N. Kozlovsky et al. // *J. Neuroendocrinol.* – 2010. – Vol. 22, № 8. – P. 889–904.

98. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration / H. M. Gao, H. Zhou, F. Zhang et al. // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 1081–1092.

99. HMGB1 in health and disease / R. Kang, R. Chen, Q. Zhang et al. // *Mol. Aspects Med.* – 2014. – Vol. 40. – P. 1–116.

100. HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase-8 inflammasomes via NF- $\kappa$ B pathway in acute glaucoma [Electronic resource] / W. Chi, H. Chen, F. Li et al. // *J. Neuroinflammation.* – 2015. – Vol. 12, № 137. – URL: <http://10.24.53.19:9091/servlet/com.trend.iwss.user.servlet.sendfile?downloadfile=IRES-2128416654-E40EE4E0-1140-1109-11> (access date: 15.02.2016).

101. HMGB1: endogenous danger signaling / J. R. Klune, R. Dhupar, J. Cardinal et al. // *Mol. Med.* – 2008. – Vol. 14, № 7–8. – P. 476–484.

102. Hutsler, J. J. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders / J. J. Hutsler, H. Zhang // *Brain Res.* – 2010. – Vol. 1309. – P. 83–94.

103. Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism / D. Q. Ma, P. L. Whitehead, M. M. Menold et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 77, № 3. – P. 377–388.

104. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism / M. A. Edalatmanesh, H. Nikfarjam, F. Vafaei et al. // *Brain Res.* – 2013. – Vol. 1526. – P. 15–25.

105. Increased plasma levels of the high mobility group box 1 protein (HMGB1) are associated with a higher score of gastrointestinal dysfunction in individuals with autism / K. Babinská, M. Bucová, V. Ďurmanová et al. // *Physiol. Res.* – 2014. – Vol. 63, № 4. – P. S613–S618.

106. Increased serum levels of high mobility group box 1 protein in patients with autistic disorder / E. Emanuele, M. Boso, N. Brondino et al. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 681–683.

107. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia / M. Lamkanfi, A. Sarkar, L. Vande Walle et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185, № 7. – P. 4385–4392.
108. Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines / M. G. Netea, F. L. van de Veerdonk, J. W. van der Meer // *Annu. Rev. Immunol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 49–77.
109. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice / R. X. Moldrich, G. Leanage, D. She et al. // *Behav. Brain Res.* – 2013. – Vol. 257. – P. 253–264.
110. Ischemic stroke injury is mediated by aberrant Cdk5 / D. A. Meyer, M. I. Torres-Altora, Z. Tan et al. // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34, № 24. – P. 8259–8267.
111. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation / B. Lu, D. J. Antoine, K. Kwan et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – Vol. 111, № 8. – P. 3068–3073.
112. Kalaria, R. N. Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia / R. N. Kalaria // *Nutr. Rev.* – 2010. – Vol. 68, № 2. – P. S74–S87.
113. Kovacsics, C. E. Shock-induced aggression in mice is modified by lithium / C. E. Kovacsics, T. D. Gould // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2010. – Vol. 94, № 3. – P. 380–386.
114. Krey, J. F. Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca<sup>2+</sup> signaling / J. F. Krey, R. E. Dolmetsch // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 112–119.
115. Kurt, T. L. ACMT position statement: the lom report on thimerosal and autism / T. L. Kurt // *Med. Toxicol.* – 2006. – Vol. 2, № 4. – P. 170–171.
116. Landa, R. J. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life / R. J. Landa // *Nat. Clin. Pract. Neurol.* – 2008. – Vol. 4, № 3. – P. 138–147.
117. LeBlanc, A. C. Caspase-6 as a novel early target in the treatment of Alzheimer's disease / A. C. LeBlanc // *Eur. J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 37, № 12. – P. 2005–2018.



118. Lee, B. K. Advancing parental age and autism: multifactorial pathways / B. K. Lee, J. J. McGrath // *Trends Mol. Med.* – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 118–125.
119. Leemans, J. C. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome / J. C. Leemans, S. L. Cassel, F. S. Sutterwala // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 243, № 1. – P. 152–162.
120. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism / P. M. Rodier, J. L. Ingram, B. Tisdale, V. J. Croog // *Reprod. Toxicol.* – 1997. – Vol. 11, № 2–3. – P. 417–422.
121. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits / G. Tang, K. Gudsnek, S. H. Kuo et al. // *Neuron.* – 2014. – Vol. 83, № 5. – P. 1131–1143.
122. Luo, Z. The effects of antiepileptic drug valproic acid on apoptosis of hippocampal neurons in epileptic rats / Z. Luo, Y. Fang, L. Zhang // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 28, № 1. – P. 319–324.
123. Lynch, M. A. Age-related impairment in long-term potentiation in hippocampus: A role for the cytokine, interleukin-1 beta? / M. A. Lynch // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – Vol. 56, № 5. – P. 571–589.
124. Macfabe, D. Autism: metabolism, mitochondria, and the microbiome / D. Macfabe // *Glob. Adv. Health Med.* – 2013. – Vol. 2, № 6. – P. 52–66.
125. Mapping early brain development in autism / E. Courchesne, K. Pierce, C. M. Schumann et al. // *Neuron.* – 2007. – Vol. 56, № 2. – P. 399–413.
126. Margulis, J. Proteostasis in striatal cells and selective neurodegeneration in Huntington's disease [Electronic resource] / J. Margulis, S. Finkbeiner // *Front. Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00218/full> (access date: 15.02.2016).
127. Martin, H. G. Late onset deficits in synaptic plasticity in the valproic acid rat model of autism [Electronic resource] / H. G. Martin, O. J. Manzoni // *Front. Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – URL: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00023/abstract> (access date:

15.02.2016).

128. Martino, G. The therapeutic potential of neural stem cells / G. Martino, S. Pluchino // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006. – Vol. 7, № 5. – P. 395–406.

129. Maternal autoimmune diseases, asthma, and allergies, and childhood autism spectrum disorders / L. A. Croen, J. K. Grether, C. K. Yoshida et al. // *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* – 2005. – Vol. 159, № 2. – P. 151–157.

130. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 / S. E. P. Smith, J. Li, K. Garbett et al. // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27, № 40. – P. 10695–10702.

131. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence / K.M. Linnet, S. Dalsgaard, C. Obel et al. // *Am. J. Psychiatry.* – 2003. – Vol. 160, № 6. – P. 1028–1040.

132. Matute, C. Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders / C. Matute, F. Cavaliere // *Sem. Cell. Devel. Biol.* – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 252–259.

133. Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer Disease [Electronic resource] / R. Mayeux, Y. Stern // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – Vol. 2, № 8. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405821/#!po=0.847458> (access date: 15.02.2016).

134. Mendelsohn, N. J. Genetic evaluation of autism / N. J. Mendelsohn, G. B. Schaefer // *Semin. Pediatr. Neurol.* – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 27–31.

135. Metabolomics of neurodegenerative diseases / A. Botas, H. M. Campbell, X. Han, M. Maletic-Savatic // *Int. Rev. Neurobiol.* – 2015. – Vol. 122. – P. 53–80.

136. MHC class II expression by beta2 integrin (CD18)-positive microglia, macrophages and macrophage-like cells in rabbit retina / W. Huang, C. G. Chamberlain, R. Y. Sarafian et al. // *Neuron Glia Biol.* – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 285–294.

137. Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome / T. M. DeLorey, A. Handforth, S. G. Anagnostaras et al. // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18, №

20. – P. 8505–8514.

138. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism / J. Morgan, G. Chana, C. Pardo et al. // *Biol. Psychiatry*. – 2010. – Vol. 68, № 4. – P. 368–376.

139. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: the importance of microglia phenotype / S. A. Marshall, J. A. McClain, M. L. Kelso et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2013. – Vol. 54. – P. 239–251.

140. Mir, S. Cytokine-induced GAPDH sulfhydration affects PSD95 degradation and memory / S. Mir, T. Sen, N. Sen // *Mol. Cell*. – 2014. – Vol. 56, № 6. – P. 786–795.

141. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease / M. Verri, O. Pastoris, M. Dossena et al. // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 345–353.

142. mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease / Z. Tang, E. Ioja, E. Berezcki et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1853, № 7. – P. 1646–1657.

143. Mullen, R. J. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates / R. J. Mullen, C. R. Buck, A. M. Smith // *Development*. – 1992. – Vol. 116, № 1. – P. 201–211.

144. Murray, C. A. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation / C. A. Murray, M. A. Lynch // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18, № 8. – P. 2974–2981.

145. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress / J. Molet, P. M. Maras, S. Avishai-Eliner et al. // *Dev. Psychobiol.* – 2014. – Vol. 56, № 8. – P. 1675–1688.

146. Nau, H. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms / H. Nau, R. S. Hauck, K. Ehlers // *Pharmacol. Toxicol.* – 1991. – Vol. 69, № 5. – P. 310–321.

147. Navone, F. Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS / F. Navone, P. Genevini, N. Borgese // *Cells*. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 354–386.

148. Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study / O. Zerbo, C. Yoshida, J. K. Grether et al. // *J. Neuroinflammation*. – 2014. – Vol. 11. – P. 113.

149. NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis / C. Boutin, O. Hardt, A. de Chevigny et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107, № 3. – P. 1201–1206.

150. Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life / A. R. Mesquita, J. M. Pego, T. Summavielle et al. // *Neuroscience*. – 2007. – Vol. 147, № 4. – P. 1022–1033.

151. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism / D. Vargas, C. Nascimbene, C. Krishnan et al. // *Ann. Neurol*. – 2005. – Vol. 57, № 1. – P. 67–81.

152. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function / G. Raivich, M. Bohatschek, C. U. Kloss et al. // *Brain Res. Brain Res. Rev.* – 1999. – Vol. 30, № 1. – P. 77–105.

153. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate / P. Malatesta, M. A. Hack, E. Hartfuss et al. // *Neuron*. – 2003. – Vol. 37, № 5. – P. 751–764.

154. Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism / I. A. van Kooten, S. J. Palmen, P. von Cappeln et al. // *Brain*. – 2008. – Vol. 131, № 4. – P. 987–999.

155. Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics / C. A. Trujillo, T. T. Schwindt, A. H. Martins et al. // *Cytometry A*. – 2009. – Vol. 75, № 1. – P. 38–53.

156. Olson, M. L. Hippocampal cortactin levels are reduced following spatial working memory formation, an effect blocked by chronic calpain inhibition / M. L. Olson, A. E. Ingebretson, K. M. Harmelink // *Brain Sci*. – 2015. – Vol. 5, № 2. – P.

241–257.

157. Ono, Y. Calpains: an elaborate proteolytic system / Y. Ono, H. Sorimachi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1824, № 1. – P. 224–236.

158. Ottone, C. Multifaceted control of adult SVZ neurogenesis by the vascular niche / C. Ottone, S. Parrinello // *Cell Cycle.* – 2015. – Vol. 14, № 14. – P. 2222–2225.

159. Oxytocin released from mouse hypothalamus and nerve endings by extracellular application of beta-NAD<sup>+</sup> and cyclic ADP-ribose [Electronic resource] / D. Jin, H.-X. Liu, O. Lopatina et al. // *Protocol Exchange.* – 2007. – URL: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/217> (access date: 15.02.2016).

160. Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice / H. Higashida, O. Lopatina, T. Yoshihara et al. // *J. Neuroendocrinol.* – 2010. – Vol. 22, № 5. – P. 373–379.

161. Parikshak, N. N. Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders / N. N. Parikshak, M. J. Gandal, D. H. Geschwind // *Nat. Rev. Genet.* – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 441–458.

162. Patterson, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 $\beta$ , BDNF and synaptic plasticity / S. L. Patterson // *Neuropharmacology.* – 2015. – Vol. 96 (Pt. A). – P. 11–18.

163. Paxinos, G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* / G. Paxinos, C. Watson. – 4 ed. – San Diego: Academic Press, 1998. – 474 p.

164. Pechtel, P. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature / P. Pechtel, D. A. Pizzagalli // *Psychopharmacology (Berl).* – 2011. – Vol. 214, № 1. – P. 55–70.

165. Pedra, J. H. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome / J. H. Pedra, S. L. Cassel, F. S. Sutterwala // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 10–16.

166. Postnatal proteasome inhibition induces neurodegeneration and cognitive deficiencies in adult mice: a new model of neurodevelopment syndrome / R. Romero-Granados, Á. Fontán-Lozano, F. J. Aguilar-Montilla, Á. M. Carrión // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 12. – e28927.

167. Preeclampsia, placental insufficiency, and autism spectrum disorder or developmental delay / C. K. Walker, P. Krakowiak, A. Baker et al. // *JAMA Pediatr.* – 2015. – Vol. 169, № 2. – P. 154–162.

168. Prenatal antidepressant exposure and behavioral problems in early childhood – a cohort study / L. H. Pedersen, T. B. Henriksen, B. H. Bech et al. // *Acta Psychiatr. Scand.* – 2013. – Vol. 127, № 2. – P. 126–135.

169. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain / A. Urakubo, L. F. Jarskog, J. A. Lieberman et al. // *Schizophr. Res.* – 2001. – Vol. 47, № 1. – P. 27–36.

170. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness / J. B. Watson, S. A. Mednick, M. Huttunen et al. // *Dev. Psychopathol.* – 1999. – Vol. 11, № 3. – P. 457–466.

171. Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008 // *MMWR Surveill. Summ.* – 2012. – Vol. 61, № 3. – P. 1–19.

172. Regulation of synapse composition by protein acetylation: the role of acetylated cortactin / T. Catarino, L. Ribeiro, S. D. Santos et al. // *J. Cell Sci.* – 2013. – Vol. 126 (Pt. 1). – P. 149–162.

173. Repetitive behavior in 12-month-olds later classified with autism spectrum disorder / J. T. Elison, J. J. Wolff, J. S. Reznick et al. // *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* – 2014. – Vol. 53, № 11. – P. 1216–1224.

174. Roebuck, K. A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression / K. A. Roebuck, A. Finnegan // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66, № 6. – P. 876–888.

175. Role of interleukin 6 and soluble IL-6 receptor in region specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression / P. Marz, K. Heese, B. Dimitriadis-Schmutz et al. // *Glia.* – 1999. – Vol. 26, № 3. – P. 191–200.

176. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches [Electronic resource] / A. Fuster-Matanzo, M. Llorens-Martín, F. Hernández et al. // *Mediators Inflamm.* – 2013. – URL:

<http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/260925/> (access date: 15.02.2016).

177. Russo, A. Decreased Mitogen Inducible Gene 6 (MIG-6) Associated with Symptom Severity in Children with Autism / A. Russo // *Biomark. Insights.* – 2014. – Vol. 9. – P. 85–89.

178. Russo, A. J. Decreased epidermal growth factor (EGF) associated with HMGB1 and increased hyperactivity in children with autism / A. J. Russo // *Biomark. Insights.* – 2013. – Vol. 8. – P. 35–41.

179. Rutter, M. Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning / M. Rutter // *Acta Paediatr.* – 2005. – Vol. 94, № 1. – P. 2–15.

180. Scaffidi, P. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation / P. Scaffidi, T. Misteli, M. E. Bianchi // *Nature.* – 2002. – Vol. 418, № 6894. – P. 191–195.

181. Scavenging effect of Naoerkang on amyloid beta-peptide deposition in the hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease / X. Li, H. F. Yuan, Q. K. Quan et al. // *Chin. J. Integr. Med.* – 2011. – Vol. 17, № 11. – P. 847–853.

182. Schmitz, C. The neuropathology of autism: where do we stand? / C. Schmitz, P. Rezaie // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 4–11.

183. Schneider, T. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism / T. Schneider, R. Przewlocki // *Neuropsychopharmacology.* – 2005. – Vol. 30, № 1. – P. 80–89.

184. Schumanon, C. M. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism / C. M. Schumanon, D. G. Amaral // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, № 29. – P. 7674–7679.

185. Sensory processing in children with Autism Spectrum Disorder: Relationship with non-verbal IQ, autism severity and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder symptomatology / P. Sanz-Cervera, G. Pastor-Cerezuela, M. I. Fernandez-Andres et al. // *Res. Dev. Disabil.* – 2015. – Vol. 45–46. – P. 188–201.

186. Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder / P. G. Surtees, N. W. Wainwright, S. A. Willis-Owen et al. // *Biol. Psychiatry.* – 2006. – Vol. 59, № 3. – P. 224–229.

187. STIM1, STIM2, and Orail regulate store-operated calcium entry and purinergic activation of microglia / M. Michaelis, B. Nieswandt, D. Stegner et al. // *Glia*. – 2015. – Vol. 63, № 4. – P. 652–663.
188. Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming / M. G. Frank, M. D. Weber, L. R. Watkins et al. // *Brain Behav. Immun.* – 2015. – Vol. 48. – P. 1–7.
189. Szpir, M. Tracing the origins of autism: a spectrum of new studies / M. Szpir // *Environ. Health Perspect.* – 2006. – Vol. 114, № 7. – P. 412–418.
190. Takano, T. Role of microglia in autism: recent advances / T. Takano // *Dev. Neurosci.* – 2015. – Vol. 37, № 3. – P. 195–202.
191. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell*. – 2010. – Vol. 140, № 6. – P. 805–820.
192. Talebizadeh, Z. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism / Z. Talebizadeh, M. G. Butler, M. F. Theodoro // *Autism Res.* – 2008. – Vol. 1, № 4. – P. 240–250.
193. Tan, S. M. The leucocyte  $\beta 2$  (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties / S. M. Tan // *Biosci. Rep.* – 2012. – Vol. 32, № 3. – P. 241–269.
194. Tang, D. Janus Tale of Two Active HMGB1 Redox States / D. Tang, T. A. Billiar, M. T. Lotze // *Mol. Med.* – 2012. – Vol. 18. – P. 1360–1362.
195. Testosterone and explosive aggression in autism spectrum disorders / A. Pivovarciova, S. Hnilicova, D. Ostatnikova et al. // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2014. – Vol. 35, № 7. – P. 553–559.
196. The biology of autistic syndromes / ed. C. Gillberg, M. Coleman. – 3rd ed. – London : Mac Keith Press, 2000. – 330 p.
197. The epidemiology of autism spectrum disorders / C. J. Newschaffer, L. A. Croen, J. Daniels et al. // *Annu Rev. Public Health.* – 2007. – Vol. 28. – P. 235–258.
198. The mTOR signaling pathway regulates pain-related synaptic plasticity in rat entorhinal-hippocampal pathways [Electronic resource] / D. Lyu, W. Yu, N. Tang et al. // *Mol. Pain.* – 2013. – Vol. 9. – URL:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3892125/> (access date: 15.02.2016).

199. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation...and a lot more / L. P. Zambetti, F. Laudisi, G. Licandro et al. // *Immunol. Res.* – 2012. – Vol. 53, № 1–3. – P. 78–90

200. TNF compromises lysosome acidification and reduces  $\alpha$ -synuclein degradation via autophagy in dopaminergic cells / M. X. Wang, X. Y. Cheng, M. Jin et al. // *Exp. Neurol.* – 2015. – Vol. 271. – P. 112–121.

201. Torres, A. R. Is fever suppression involved in the etiology of autism and neurodevelopmental disorders? [Electronic resource] / A. R. Torres // *BMC Pediatr.* – 2003. – Vol. 3, № 9. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC194752/pdf/1471-2431-3-9.pdf> (access date: 15.02.2016).

202. Tovar-Y-Romo, L. B. Endogenous recovery after brain damage; molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate / L. B. Tovar-Y-Romo, A. Penagos-Puig, J. O. Ramirez-Jarquín // *J. Neurochem.* – 2015. – Vol. 136, № 1. – P. 13–27.

203. Tsai, L. Y. Pervasive Developmental Disorders (FS20). National Dissemination Center for Children with Disabilities (NICHCY) [Electronic resource] / L. Y. Tsai. – URL: <http://ecac-parentcenter.org/userfiles/PTI/Autism%20Spectrum%20Disorder/PDD%20NICHCY.pdf> (access date: 15.02.2016).

204. Tsai, L. Y. Psychopharmacology in autism / L. Y. Tsai // *Psychosom. Med.* – 1999. – Vol. 61, №№ 5. – P. 651–665.

205. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study / E. Courchesne, C. Karns, H. R. Davis et al. // *Neurology.* – 2001. – Vol. 57, № 2. – P. 245–254.

206. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection / D. R. Sutherland, E. Acton, M. Keeney et al. // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2014. – Vol. 86, № 1. – P. 44–55.

207. Use of selective serotonin-reuptake inhibitors in pregnancy and the risk of birth defects / S. Alwan, J. Reefhuis, S. A. Rasmussen et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2007.

– Vol. 356, № 26. – P. 2684–2692.

208. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells / M. Gottlicher, S. Minucci, P. Zhu et al. // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20, № 24. – P. 6969–6978.

209. Valproic acid neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is possibly related to its anti-inflammatory and HDAC inhibitory properties [Electronic resource] / J. C. Ximenes, K. R. Neves, L. K. Leal et al. // *J. Neurodegener. Dis.* – 2015. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437346/> (access date: 15.02.2016).

210. Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons / E. Kumamaru, Y. Egashira, R. Takenaka et al. // *Neurosci. Lett.* – 2014. – Vol. 569. – P. 142–147.

211. van Steensel, F. J. A. Anxiety disorders in children and adolescents with autistic spectrum disorders: a meta-analysis / F. J. A. van Steensel, S. M. Bogels, S. Perrin // *Clin. Child. Family Psychol. Rev.* – 2011. – Vol. 14, № 3. – P. 302–317.

212. Verkhatsky, A. Astroglipathology: a central element of neuropsychiatric diseases? / A. Verkhatsky, J. J. Rodriguez, L. Steardo // *Neuroscientist.* – 2014. – Vol. 20, № 6. – P. 576–588.

213. Wang, T. New perspectives on the biology of fragile X syndrome / T. Wang, S. M. Bray, S. T. Warren // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 256–263.

214. Wei, H. The apoptotic perspective of autism / H. Wei, I. Alberts, X. Li // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2014. – Vol. 36. – P. 13–18.

215. Wing, L. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? / L. Wing, D. Potter // *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 151–161.

216. Wood, J. J. Exploring the nature and function of anxiety in youth with autism spectrum disorder / J. J. Wood, K. D. Gadow // *Clin. Psychol. Sci. Pract.* – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 281–292.

217. Xu, N. Inflammatory Cytokines: Potential Biomarkers of Immunologic

Dysfunction in Autism Spectrum Disorders [Electronic resource] / N. Xu, X. Li, Y. Zhong // *Mediators Inflamm.* – 2015. – URL: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/531518/> (access date: 15.02.2016).

218. Yoshii, A. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation / A. Yoshii, M. Constantine-Paton // *Nat. Neurosci.* – 2007. – Vol. 10, № 6. – P. 702–711.

219. Yu, Y. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology / Y. Yu, D. Tang, R. Kang [Electronic resource] // *Front Physiol.* – 2015. – Vol. 6. – URL: <http://10.24.53.19:9091/servlet/com.trend.iwss.user.servlet.sendfile?downloadfile=IRES-1461198123-DD3A3E58-29888-29857-37> (access date: 15.02.2016).

220. Zadrán, S. Regulation of calpain-2 in neurons: Implications for synaptic plasticity / S. Zadrán, X. Bi, M. Baudry // *Mol. Neurobiol.* – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 143–150.

## Приложение А

### Протокол проведения теста NSS [81]

Протокол оценки (отметить знаком ○ или подчеркнуть баллы справа при тестировании)				Макс. число баллов
Оценка моторной функции Подвешивание крысы за хвост:	0	0	0	3
1 – сгибание передней лапы	1	1	1	
1 – сгибание задней лапы	2	2	2	
1 – отклонение головы более чем на 10 градусов от вертикальной оси в течение 30 сек	3	3	3	
Помещение крысы на пол:	0	0	0	3
0 – нормальное движение по полу	1	1	1	
1 – неспособность сохранять направленное движение	2	2	2	
2 – движение по кругу в сторону паретичных конечностей	3	3	3	
Оценка сенсорной функции:	0	0	0	2
1 – укладывание (зрительный и тактильный тесты)	1	1	1	
1 – проприоцептивный тест (придавливание лапки к краю стола)	2	2	2	
Отсутствие рефлексов или патологическая двигательная активность				4
1 – рефлекс с ушной раковины (при дотрагивании до слухового бугорка – тряска головой)	0 1	0 1	0 1	1
1 – роговичный рефлекс (при дотрагивании до роговицы кусочком ваты – мигание)	0 1	0 1	0 1	1
1 – рефлекс испуга (двигательный ответ на короткий шум при щелкании зажима для бумаги)	0 1	0 1	0 1	1
Оценка равновесия:				6
0 – сохранение равновесия и стабильное положение тела				
1 – захватывание балансира				
2 – крепкое сжатие балансира и отвисание одной паретичной конечности вдоль балансира	0 1	0 1	0 1	
3 – крепкое сжатие балансира и отвисание двух паретичных конечностей вдоль балансира, или кружение на балансире (более 60 сек)	2 3	2 3	2 3	
4 – попытка сохранить равновесие на балансире (более 40 сек), но падение с него	4 5	4 5	4 5	
5 – попытка сохранить равновесие на балансире (менее 40 сек), но падение с него	6	6	6	
6 – падение без попытки балансировать или ухватиться (менее 20 сек)				

1 – судороги, миоклонус, миодистония	0 1	0 1	0 1	1
Итоговое количество баллов				18

Примечание: один балл соответствует невозможности выполнять задание или отсутствие тестируемого рефлекса; 13–18 баллов – выраженное повреждение; 7–12 баллов – повреждение средней степени тяжести; 1–6 баллов – умеренное повреждение.

## Приложение Б

### Тесты для оценки неврологического и физического развития животных

Дни постнатального развития крыс																
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17
Размер помета, число живых и мертвых в помете				появление первичного волосяного покрова (в норме в среднем – 5 день)		прорезывание резцов (в среднем – 8 день)								Оценка опоры на задние конечности, подъемы всего тела		
	отливание ушной раковины (в среднем – 2 день)		отрицательный геотаксис (оценивается с P5, в среднем – 7 день)					поиск гнезда (P9-P11), отдельно оценивали ольфакторную дискриминацию (обонятельная реакция, в среднем – 10-11 день)						открытие глаз (в среднем – 14 день)		
	переворачивание на плоскости (с P2, в среднем – 8 день)															
						оценка веса	подъем головы и передних лап (P8-P9)							оценка веса		
						число живых и мертвых крысят								число живых и мертвых крысят		мышечная сила

## Приложение В

### Протокол определения содержания окситоцина в гомогенатах головного мозга

Определение концентрации окситоцина при помощи фермент-связывающих иммуносорбентных наборов ELISA (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Внутренний и внешний коэффициенты вариации - 10.7% и 12.2%, чувствительность - 11.7 пг/мл.

#### Процедура анализа

Все реагенты доставались и находились при комнатной температуре в течение не менее 30 минут до открытия.

Все стандарты и образцы запускались в двух экземплярах.

1. Определение количества лунок планшета, необходимое для исследования. Остальные лунки хранить запечатанными при 4 С.
2. Внести 100 мкл стандартного разбавителя (Assay Buffer или Tissue Culture Media) в лунки с NSB и Бо (стандарт 0 пг / мл).
3. Далее пипеткой внести 100 мкл стандарта # 1 до # 7 в соответствующие лунки.
4. Внести по 100 мкл образцов в соответствующие лунки
5. Внести 50 мкл буфера для анализа в лунки NSB.
6. Внести 50 мкл голубого конъюгата в каждую лунку, за исключением лунок на общую активность и пустых лунок.
7. Внести 50 мкл желтых антител в каждую лунку, за исключением пустых лунок, общей активностью и NSB.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Каждая лунка должна быть зеленого цвета, за исключением лунок с NSB, которые должны оставаться синими.

Пустые и лунки на общую активность в этой точке не имеют цвета.

8. Содержимое пластинок аккуратно перемешать. Пластины прижать и инкубировать при температуре 4 ° С в течение 18-24 часов.

9. Лунки опустошить и промыть, добавив 400 мкл промывочного раствора в каждую лунку.

Повторить промывку еще 2 раза (всего получится 3 промывки).

10. После последней промывки, пустые или опорожненные лунки, осушить бумажным полотенцем, чтобы удалить оставшиеся промывочного буфера.

11. Добавить 5 мкл синего конъюгата в лунки для определения общей активности.

12. Добавить 200 мкл раствора субстрата PNPP в каждую лунку. Выдержать при комнатной температуре в течение 1 часа без встряхивания.

13. Добавить 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку. Это останавливает реакцию и планшет следует считать немедленно.

14. Пластину ридера расположить против контрольных лунок, считать оптическую плотность при 405 нм, предпочтительно с коррекцией между 570 и 590 нм. Если пластина ридера не может быть пустой против контрольных лунок, вручную вычесть среднюю оптическую плотность контрольных лунок из всех показаний.



## Приложение Г

### Протокол проведения иммуногистоцитохимии для парафиновых срезов

1. Депарафинизация среза:
  - 1.1. 4 смены ксилола по 5 минут;
  - 1.2. 2 смены абсолютного этанола по 5 минут;
  - 1.3. 1 смена 95% этанола и 1 смена 79% этанола по 5 минуты;
  - 1.4. 2 смены PBS по 5 минут.
2. Предобработка среза:
  - 2.1. Нанесение 15 мкл раствора *протеиназы К* (разведение в 250 раз: 2 мкл stock solution + 498 мкл PBS);
  - 2.2. инкубация среза в течение 15 минут при комнатной температуре во влажной камере;
  - 2.3. 2 смены PBS по 2 минуты.
3. Пермеабелизация
  - 3.1. Нанесение 15 мкл 0,1% Тритона X-100, инкубация 5 минут при комнатной температуре в влажной камере.
  - 3.2. 2 смены PBS по 5 минут.
4. Блокирование сывороткой:
  - 4.1. нанесение 15 мкл 10% раствора BSA (bovine serum albumin) в PBS;
  - 4.2. инкубация среза 20-30 минут в термостате при +37°C во влажной камере;
  - 4.3. удаление раствора со среза.
5. Добавление первичных антител:
  - 5.1. Нанесение 15 мкл первичных антител в рабочем разведении в PBS с 1% BSA;
  - 5.2. инкубация среза в холодильнике в течение 18 часов во влажной камере;
  - 5.3. 2 смены PBS по 2 минуты.

6. Добавление вторичных антител (в темноте):

6.1. нанесение 15 мкл вторичных антител в рабочем разведении в PBS с 1% BSA;

6.2. инкубация в термостате при +37°C в течение 30 минут во влажной камере в темноте;

6.3. 2 смены PBS по 2 минуты.

7. Микроскопия:

7.1. нанесение на срез монтирующей жидкости (15 мкл 70% глицерина в PBS+DAPI);

7.2. защита среза покровным стеклом;

7.3. флуоресцентная или конфокальная микроскопия.

Примечание: в случае использования первичных меченых антител (в данном случае антитела к CD157) шестой этап пропускается, пятый этап проводится в темноте.

## Приложение Д

### Протокол проведения иммуногистоцитохимии для свободно-плавающих срезов

Окраска проводилась в 12-луночных планшетах, все этапы окраски и промывки проводились с использованием шейкера, для инкубации с антителами использовалось по 100 мкл Washing solution, для остальных этапов - по 200 мкл растворов.

1. 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
2. Блокирование неспецифического связывания Blocking solution (1 час при комнатной температуре).
3. 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
4. Инкубация с первичными антителами в рабочем разведении от 1:500 до 1:10000 в АВ-solution при 4°C на ночь.
5. Продолжение инкубации с первичными антителами 2 часа при комнатной температуре.
6. 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
7. Инкубация с вторичными антителами 2 часа при комнатной температуре.
8. 3-кратная промывка срезов по 5 минут в Washing solution.
9. Перенос среза на предметное стекло.
10. Нанесение на срез монтирующей жидкости (30-50 мкл глицерина в PBS 1:1+DAPI).
11. Защита среза покровным стеклом.
12. Микроскопия.

Используемые растворы:

Washing solution: 0,2% Triton X-100 в PBS

Blocking solution: 1% Triton X-100 + 3% BSA в PBS

AB-solution: 0,2% Triton X-100 + 3% BSA в PBS

## Приложение Е

### Протокол детекции апоптоза методом TUNEL (“In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Abcam Plc, United Kingdom)”)

1. Депарафинизация среза:

1.1. 4 смены ксилола по 5 минут;

1.2. 2 смены абсолютного этанола по 5 минут;

1.3. 1 смена 95% этанола и 1 смена 79% этанола по 5 минуты;

1.4. 2 смены PBS по 5 минут.

2. Пост-фиксация срезов

2.1. Нанесение 15 мкл раствора протеиназы К (разведение 250 раз: 2 мкл stock solution + 498 мкл PBS);

2.2. инкубация среза в течение 15 минут при комнатной температуре во влажной камере;

2.3. 2 смены PBS по 2 минуты;

2.4. нанести 15 мкл Wash buffer, инкубировать не менее 10 секунд.

3. Нанести на срез 15 мкл предварительно приготовленного раствора для окраски (10 мкл TdT-buffer; 0,75 мкл фермента TdT; 8 мкл FITC-Dutp; 32,25 мкл очищенной воды, этого объема достаточно для 3 срезов) и инкубировать 1 час во влажной камере при 37°C в темноте.

4. Осторожно удалить остатки раствора TdT со среза.

5. Промывка срезов 2 сменами Rinse buffer по 5 минут.

6. Нанесение 15 мкл пропидия йодида с РНКазой, инкубация в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте во влажной камере.

7. Промывка срезов 1 сменой PBS в течение 2 минут.

8. Нанесение на срез монтирующей жидкости (15 мкл 70% глицерина в PBS);

9. Защита среза покровным стеклом;

10. Микроскопия.

## Приложение Ж

Количественные показатели концентрации окситоцина при экспериментальном аутизме и в контроле,

пг/мл

Регион головного мозга	Группы				Уровни значимости
	Контроль		Аутизм		
	КР60 (n=7)	КР90 (n=9)	ЭР60 (n=9)	ЭР90 (n=12)	
Гипоталамус	29,28 (24,45...31,6)	17,06 (12,99...20,8)	6,94 (5,34...9,29)	5,28 (4,66...10,77)	$p_{x-y60}=0,004$ $p_{x-y90}=0,005$
Гипофиз	131,75 (116,14...208,86)	133,91 (97,84...157,3)	52,18 (8,32...89,65)	19,6 (3,46...27,22)	$p_{x-y60}=0,035$ $p_{x-y90}=0,012$
Миндалина	0,33 (0,13...0,42)	0,72 (0,33...2,14)	0,49 (0,41...0,68)	0,22 (0,14...0,35)	$p_{x-y60}=0,125$ ; $p_{x-y90}=0,016$

### Приложение 3

#### Экспрессия и коэкспрессия CD157, CD18 в гиппокампе, коре и базолатеральной миндалине в контрольной и экспериментальной группах

##### Гиппокамп

Группа	CD157-FITC	CD18-TRITC	CD157+CD18
Контроль P5	29,5 (27...31)	41 (36...45,5)	28 (24,75...30)
Аутизм P5	10 (8,5...22,25)	16 (12...26,5)	9 (6,5...15,75)
Уровень значимости	p=0,003	p=0,004	p=0,001
Контроль P15	19 (17...22)	28 (23...31)	16 (15...18)
Аутизм P15	10 (7,25...16,5)	17,5 (11,5...24,25)	6,5 (6...12,5)
Уровень значимости	p=0,05	p=0,03	p=0,018
Контроль P25	16 (15...17)	21 (19,25...21,75)	15,5 (14...16,75)
Аутизм P25	13 (9,75...14,5)	21 (13,5...26)	10 (7,5...12,75)
Уровень значимости	p=0,064	p=0,94	p=0,016
Контроль P60	7 (4,75...12)	10,5 (8,25...13,5)	6,5 (4,75...10,5)
Аутизм P60	11,5 (8,5...19)	21 (16,25...30)	10,5 (6,25...16,5)
Уровень значимости	p=0,12	p=0,015	p=0,198
Контроль P90	10,5 (3,75...14)	13,5 (6,75...18,25)	10 (3,5...14)
Аутизм P90	17,5 (12,75...22,25)	24,5 (18,75...29,5)	15 (11,25...19,25)
Уровень значимости	p=0,028	p=0,016	p=0,082

## Кора

Группа	CD157-FITC	CD18-TRITC	CD157+CD18
Контроль P5	41 (33,5...42,75)	49,5 (45,25...56,5)	37 (29,5...38)
Аутизм P5	34,5 (30...37,75)	51,5 (40...57,25)	28 (25...30)
Уровень значимости	p=0,29	p=1	p=0,1041
Контроль P15	6 (5,25...7,75)	14 (12,25...14,75)	5 (4...6,75)
Аутизм P15	14,5 (9,25...17,75)	24 (17,5...28)	9,5 (7,5...11,75)
Уровень значимости	p=0,005	p=0,005	p=0,003
Контроль P25	4,5 (3,25...5,75)	7 (5,25...8,75)	3,5 (2,25...5,75)
Аутизм P25	5,5 (4,25...7,5)	9 (7...14)	5 (4...5,75)
Уровень значимости	p=0,273	p=0,174	p=0,345
Контроль P60	7 (5,25...7)	11 (9,25...11)	6 (5,25...7)
Аутизм P60	5 (4,25...6)	8 (5,5...8,75)	3,5 (3...4,75)
Уровень значимости	p=0,199	p=0,023	p=0,014
Контроль P90	5,5 (5...6,75)	8,5 (7,25...11,5)	5 (5...6)
Аутизм P90	6,5 (4,25...7,75)	10,5 (6,75...12)	5,5 (4,25...6)
Уровень значимости	p=0,678	p=0,45	p=0,821

## Миндалина

Группа	CD157-FITC	CD18-TRITC	CD157+CD18
Контроль P5	-	-	-
Аутизм P5	13,5 (12,25...14,75)	25 (24...26)	12,5 (11,75...13,25)
Контроль P15	6 (5,25...7,5)	13 (12...14)	5,5 (4,25...6)
Аутизм P15	6,5 (4,25...8,75)	9,5 (8,25...13)	5,5 (4...7,75)

Уровень значимости	p=0,957	p=0,159	p=0,786
Контроль Р25	6 (2...6)	8 (4...9)	5 (2...5)
Аутизм Р25	8,5 (7...9,75)	16 (14,75...18,5)	6 (5,75...8,25)
Уровень значимости	p=0,079	p=0,019	p=0,143
Контроль Р60	2,5 (2,25...2,75)	4,5 (4,25...4,75)	2 (1,5...2,5)
Аутизм Р60	10 (6,5...13,5)	18 (11...21)	9 (5,5...12)
Уровень значимости	p=0,038	p=0,037	p=0,038
Контроль Р90	3 (3...4,5)	3 (3...5)	1 (1...3)
Аутизм Р90	6 (2,5...7,5)	6 (2,5...7,5)	4 (2...6)
Уровень значимости	p=0,732	p=0,171	p=0,21



## Приложение И

### Экспрессия CD38, CD18 и коэкспрессия CD38/CD18 в исследуемых регионах головного мозга в норме и при экспериментальном аутизме

#### Гиппокамп

Группа	CD38-FITC	CD18-TRITC	CD38+CD18
Контроль P5	36,5 (33,75...39,75)	49,5 (45,5...65,75)	35 (30...38,75)
Аутизм P5	15,5 (13,25...19)	21 (17,75...23,5)	14,5 (11,75...17,25)
Уровень значимости	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Контроль P15	4 (3...5)	4,5 (2,5...5,75)	2,5 (1...4,5)
Аутизм P15	14 (12...15,5)	16,5 (13,75...17,5)	12 (10,75...12,25)
Уровень значимости	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Контроль P25	7 (6...10)	8 (7...11)	6 (5...6)
Аутизм P25	5 (4...6)	4 (2...5)	2 (0...3)
Уровень значимости	p=0,064	p=0,002	p=0,015
Контроль P60	7,5 (6,75...10,75)	10 (8,75...12)	6 (5...7)
Аутизм P60	17,5 (14,25...20)	19,5 (16...22,25)	15 (12,75...18)
Уровень значимости	p=0,002	p=0,007	p<0,001
Контроль P90	4 (2...4,25)	3 (0,75...3,25)	1 (0,75...2)
Аутизм P90	3 (2...4)	4 (1...4)	1 (1...2)
Уровень значимости	p=0,441	p=0,413	p=0,81

## Кора

Группа	CD38-FITC	CD18-TRITC	CD38+CD18
Контроль P5	24 (21,25...29,25)	36,5 (32...46,25)	21 (17...26,5)
Аутизм P5	22,5 (17,25...26,5)	28,5 (27...29,75)	19 (17,25...21,75)
Уровень значимости	p=0,308	p=0,013	p=0,427
Контроль P15	13,5 (11,5...15,75)	16,5 (13,25...19,75)	12,5 (9,5...14)
Аутизм P15	23 (19,5...27,25)	29 (24,75...32,75)	21,5 (17,25...24,75)
Уровень значимости	p<0,001	p=0,013	p<0,001
Контроль P25	8 (7...9)	8 (6...8)	6 (5...6)
Аутизм P25	5,5 (5...7)	10,5 (8,5...11,75)	4,5 (4...5)
Уровень значимости	p=0,031	p=0,028	p=0,165
Контроль P60	4,5 (3,75...5,5)	4 (3...6,5)	2,5 (1,75...4,25)
Аутизм P60	11 (10...12)	9,5 (8...10,75)	7,5 (...8)
Уровень значимости	p<0,001	p=0,003	p<0,001
Контроль P90	2 (2...3)	2,5 (2...3)	1 (0,25...1)
Аутизм P90	4 (2,25...8,75)	4,5 (1,25...6,5)	2,5 (0,25...5,25)
Уровень значимости	p=0,059	p=0,427	p=0,186

## Миндалина

Группа	CD38-FITC	CD18-TRITC	CD38+CD18
Контроль P5	16 (14...20,75)	27,5 (23,75...29,75)	14,5 (12,25...18,75)
Аутизм P5	18,5 (14...24,75)	26,5 (20,75...29,75)	16 (11,25...22,25)

Уровень значимости	p=0,545	p=0,821	p=0,821
Контроль P15	9 (7,75...10,75)	16,5 (15,75...17,25)	7 (6...8,75)
Аутизм P15	18,5 (16...20)	22,5 (20,25...24)	16 (14,25...18)
Уровень значимости	p=0,006	p=0,024	p=0,005
Контроль P25	-	-	-
Аутизм P25	5 (3,5...5)	7,5 (4...8)	2,5 (2...3,75)
Контроль P60	4,5 (4...5,25)	4 (4...4)	2,5 (2...3)
Аутизм P60	10 (8,25...11)	10,5 (8,5...16,75)	8 (7...9,5)
Уровень значимости	p=0,005	p=0,005	p=0,005
Контроль P90	2 (1...3)	3 (2...3)	1 (0...1)
Аутизм P90	11,5 (10...12,75)	9 (7,25...10)	8 (6...8,75)
Уровень значимости	p=0,002	p=0,003	p=0,002

## Приложение К

### Экспрессия NLRP3, CD11 $\beta$ и коэкспрессия NLRP3/CD11 $\beta$ в исследуемых регионах головного мозга в норме и при пренатальном введении вальпроевой кислоты

#### Гиппокамп

	NLRP3	CD11b	NLRP3+CD11b
Контроль P5	24 (16...30)	17 (14...26)	17 (13...22)
Аутизм P5	36 (32...45)	34 (19...39)	31 (18...36)
Уровень значимости	p=0,013	p=0,013	p=0,027
Контроль P15	4 (2,25...4,75)	4 (3...4,75)	2,5 (2...3)
Аутизм P15	11,5 (5,25...16,75)	10,5 (6,25...15,75)	7,5 (4,25...14)
Уровень значимости	p=0,007	p<0,001	p<0,001
Контроль P25	2 (1,25...2)	3 (2...5)	1,5 (1...2)
Аутизм P25	5,5 (4,25...7,75)	4 (4...6,5)	3 (3...4)
Уровень значимости	p<0,001	p=0,199	p=0,004
Контроль P60	5 (4...5,5)	5 (4,5...5,5)	3 (3...3)
Аутизм P60	21 (17,25...25)	18 (15,5...19,75)	15,5 (13,25...17)
Уровень значимости	p=0,011	p=0,011	p=0,011
Контроль P90	5,5 (1,25...10,5)	6 (2,25...12,25)	4,5 (0,25...8,75)
Аутизм P90	11 (2,5...17)	11 (3,25...16)	9 (2,25...14,75)
Уровень значимости	p=0,121	p=0,131	p=0,082

## Кора

	NLRP3	CD11b	NLRP3+CD11b
Контроль P5	20 (16,75...24)	18 (17...19,5)	15,5 (13,25...17)
Аутизм P5	42 (32,5...55)	35,5 (27,25...51)	33 (21,5...48)
Уровень значимости	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Контроль P15	10 (9,25...12,75)	10,5 (8,5...14)	8,5 (8...10,5)
Аутизм P15	12,5 (8,25...20,75)	12,5 (10,25...18,25)	8,5 (7...16,5)
Уровень значимости	p=0,623	p=0,241	p=0,706
Контроль P25	5,5 (4,25...6,75)	5,5 (4...6)	3 (3...4)
Аутизм P25	4 (4...7)	4 (3...7)	2,5 (1,25...5,5)
Уровень значимости	p=0,623	p=0,734	p=0,762
Контроль P60	5,5 (2,75...7,25)	4,5 (3,75...5)	2,5 (0,75...4)
Аутизм P60	11,5 (10...13)	10 (8,25...11)	9 (8,25...9,75)
Уровень значимости	p=0,003	p<0,001	p=0,002
Контроль P90	6,5 (1,25...8)	5,5 (4...7)	4 (0,5...5)
Аутизм P90	7,5 (7...8,75)	7 (6,25...8,75)	6 (5,25...7)
Уровень значимости	p=0,199	p=0,054	p=0,014

## Миндалина

	NLRP3	CD11b	NLRP3+CD11b
Контроль P5	17,5 (14,5...21,75)	15 (14,25...18,25)	14 (13...17,25)
Аутизм P5	13 (10,5...15)	11 (9...12)	10 (7,5...11)
Уровень значимости	p=0,289	p=0,077	p=0,112

Контроль P15	9 (7,25...10)	9 (7,25...10)	6,5 (6...7,75)
Аутизм P15	16,5 (13,25...18)	14,5 (13...18,25)	13 (11...14,75)
Уровень значимости	p=0,001	p<0,001	p<0,001
Контроль P25	7 (5,5...8,25)	6 (5,75...7,25)	5 (4...6)
Аутизм P25	6 (5...7)	5,5 (5...7)	4 (3,25...4,75)
Уровень значимости	p=0,399	p=0,399	p=0,155
Контроль P60	7,5 (7...8)	6,5 (6...7,75)	4,5 (3,25...5,75)
Аутизм P60	10 (8...11)	10 (8,75...11,5)	7,5 (6...8)
Уровень значимости	p=0,053	p=0,008	p=0,017
Контроль P90	3 (3...3,75)	3,5 (3...6,5)	2 (1...2)
Аутизм P90	4 (4...5,5)	4,5 (3...6,25)	2,5 (2...3,75)
Уровень значимости	p=0,0506	p=0,424	p=0,076

## Приложение Л

### Корреляционный анализ в модели хронической нейродегенерации детского возраста

Наименование корреляционной связи	Коэффициент Спирмена (R)	Уровень значимости, p
Между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина-1 $\beta$ гиппокампа:		
Аутизм, возраст P5	-0,26	0,305
Контроль, возраст P5	-0,31	0,544
Аутизм, возраст P15	0,06	0,734
Контроль, возраст P15	0,54	0,266
Аутизм, возраст P25	0,25	0,295
Контроль, возраст P25	0	1
Аутизм, возраст P60	-0,11	0,593
Контроль, возраст P60	-	-
Аутизм, возраст P90	0,13	0,508
Контроль, возраст P90	-	-
Между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина-1 $\beta$ коры		
Аутизм, возраст P5	0,32	0,123
Контроль, возраст P5	-0,25	0,43
Аутизм, возраст P15	0,02	0,917

Контроль, возраст P15	-0,2	0,704
Аутизм, возраст P25	-0,39	0,05
Контроль, возраст P25	0,87	0,333
Аутизм, возраст P60	0,17	0,423
Контроль, возраст P60	-	-
Аутизм, возраст P90	0,03	0,864
Контроль, возраст P90	-	-
Между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина-1 $\beta$ миндалины		
Аутизм, возраст P15	-0,21	0,395
Контроль, возраст P15	-	-
Аутизм, возраст P25	0,64	0,035
Контроль, возраст P25	-	-
Аутизм, возраст P60	0,49	0,106
Контроль, возраст P60	-	-
Аутизм, возраст P90	0,59	0,01
Контроль, возраст P90	-	-
Между относительной площадью интерлейкина-1 $\beta$ и абсолютным количеством NLRP3-позитивных клеток гиппокампа		
Аутизм, возраст P5	0,25	0,517
Контроль, возраст P5	-0,5	0,667
Аутизм, возраст P15	-0,12	0,751



Контроль, возраст P15	-	-
Аутизм, возраст P25	0,82	0,089
Контроль, возраст P25	-0,41	0,414
Аутизм, возраст P60	0,5	0,391
Контроль, возраст P60	-	-
Аутизм, возраст P90	-0,04	0,92
Контроль, возраст P90	-	-
Между относительной площадью интерлейкина-1 $\beta$ и абсолютным количеством NLRP3-позитивных клеток коры		
Аутизм, возраст P5	0,4	0,243
Контроль, возраст P5	-0,41	0,425
Аутизм, возраст P15	0,05	0,88
Контроль, возраст P15	0,13	0,802
Аутизм, возраст P25	0,58	0,308
Контроль, возраст P25	-0,12	0,827
Аутизм, возраст P60	-0,036	0,553
Контроль, возраст P60	-	-
Аутизм, возраст P90	0,52	0,125
Контроль, возраст P90	-	-
Между относительной площадью интерлейкина-1 $\beta$ и абсолютным количеством NLRP3-позитивных клеток миндалины		
Аутизм, возраст P15	-0,09	0,848

Контроль, возраст P15	-	-
Аутизм, возраст P25	-0,87	0,333
Контроль, возраст P25	-	-
Аутизм, возраст P90	0,67	0,219
Контроль, возраст P90	-	-