

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՖԵՐԵՇԵՏՅԱՆ ԿԱՏԱՐԻՆԵ ՍԵՐՈՅԻ

«ՍԱՂՄՆԱՅԻՆ ԵՎ ՎԱՂ ՀԵՏՇՆՆԴՅԱՆ ՇՐՋԱՆՈՒՄ ՆԵՅՐՈԳԵՆԵԶԻ
ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ՝ ՎԱԼՊՐՈՅԱԹՎՈՎ ՄԱԿԱԾՎԱԾ
ԱՈՒՏԻՍՏԻԿ ՍՊԵՎՏՐԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՍՈՂԵԼՈՒՄ»

Գ.00.04 – Կենսաքիմիա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2025

РЕСПУБЛИКА АРМЕНИЯ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ФЕРЕШЕТЯН КАТАРИНЕ СЕРОБОВНА

«ИЗУЧЕНИЕ НАРУШЕНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО
НЕЙРОГЕНЕЗА НА ВАЛЬПРОАТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ РАССТРОЙСТВ
АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА»

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – “Биохимия”

ЕРЕВАН 2025

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանում
Գիտական ղեկավար

Կ.գ.դ., պրոֆ. Կոնստանտին Բորիսի
Ենկոյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.գ.դ., պրոֆ. Աստղիկ Զավենի Փեփոյան
Կ.գ.դ., պրոֆ. Մագրա Միերի Մելքոնյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայթյանի անվան
Կենսաքիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2025թ. դեկտեմբերի 18-ին ժամը 15⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի Կենսաաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում

Սեղմագիրն առաքված է 2025թ նոյեմբերի 18-ին

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական

Քարտուղար, Կ.գ.դ., դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном медицинском университете им. М. Гераци

Научный руководитель:

д.б.н, проф. Константин Борисович Енкоян

Официальные оппоненты:

д.б.н, проф. Астгик Завеновна Пепоян

д.б.н, проф. Магда Мгеровна Мелконян

Ведущая организация:

Институт биохимии им. Г. Бунятыана НАН РА

Защита диссертации состоится 18-ого декабря 2025 года в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 051 КВОН РА по биофизике при Ереванском государственном университете (0025, г. Ереван, ул. Алека Манукиана 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 18-ого ноября 2025г.

Ученый секретарь специализированного совета 051

д.б.н , доцент

М.А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Расстройства аутистического спектра (РАС) — это нарушения нейроразвития с неизвестной этиологией, которые характеризуются двумя основными симптомами: изменениями социальной вербальной и невербальной коммуникации, стереотипным и повторяющимся поведением (APA DSM-5-TR). РАС является крайне гетерогенным заболеванием и в основе его разнообразных проявлений лежит сложная комбинация генетических и эпигенетических факторов (Gilbert & Man, 2017; Lai et al., 2014; Yenkooyan et al., 2017, Litman et al., 2025). Как правило, важным патогенетическим звеном РАС является нарушение синаптогенеза и неправильно сформированная нейрональная сеть в основном в высокопорядковых областях мозга, которые отвечают за социальное поведение и коммуникацию (Belmonte et al., 2004). В постнатальном периоде развития продолжается созревание мозга, в частности, происходит “обрезка” синапсов и формирование нейронных связей, миелинизация аксонов, глиогенез (Johnston, 2004; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). В этом контексте важно обратить внимание на различия в развитии мозга у людей и крыс. Известно, что 1–14 постнатальные дни (ПНД) развития крыс соответствуют 3-му триместру беременности у людей в соответствии с уровнем развития мозга (Clancy et al., 2007). Критическим процессом, происходящим в указанный период, является переключение возбуждающего эффекта гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на ингибирующий (Ben-Ari et al., 2007; Pizzarelli & Cherubini, 2011).

Ряд исследований показали усиленный рост мозга детей-аутиков, связанный с увеличением количества нейронов и общей дезорганизацией цитоархитектуры мозга (Casanova et al., 2006; Courchesne et al., 2011; Kemper & Bauman, 1993). Одной из гипотез, объясняющих причину макроцефалии, является дисбаланс между процессами пролиферации и элиминации нейронов во время нейрогенеза (Pierce & Courchesne, 2001). Синаптическая дисфункция может рассматриваться как еще один патологический паттерн, лежащий в основе РАС. Наконец, нарушение миграции клеток-предшественников является еще одним патологическим механизмом, способствующим развитию РАС. Биохимическими маркерами описанных процессов являются следующие нейроглиальные специфические белки, т.к. глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein, GFAP), нейрональный ядерный белок (neuronal nuclei, NeuN), даблкортин (doublecortin, DCX), синаптофизин (synaptophysin, SYP). Во всех вышеописанных процессах важную регуляторную роль имеют нейротрофины. Ряд клинических исследований указывают на изменения уровня нейротрофинов в крови или спинномозговой жидкости детей-аутиков, что делает участие последних в развитии РАС более очевидным. Исходя из литературных данных, уровень нейротрофического фактора роста мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), как правило, бывает завышенным, а инсулиноподобного фактора роста-1 (insulin growth factor, IGF-1) наоборот, пониженным у детей с РАС относительно здоровых детей. (Galvez-Contreras et al., 2017; K. B. Nelson, 2001; Nickl-Jockschat & Michel, 2011). В отношении нейротрофина-3 (neurotrophin, Nt-3) и глиальный нейротрофический фактор роста (glial-derived neurotrophic factor, GDNF) также предполагается участие этих нейротрофических факторов в процессах нейрональной дифференцировки и поддержания клеточной выживаемости, что делает их потенциально значимыми для понимания общих механизмов формирования нейрональных сетей (Sajdel-Sulkowska, E. M, 2009, Al-Ayadhi, 2019).

Одним из факторов окружающей среды, влияющих на патогенез РАС, является вальпроевая кислота (ВК), используемая в качестве противозлептического препарата (Ranger & Ellenbroek, 2016). Применение вальпроевой кислоты в течение беременности (Greene & Copp, 2014) тесно связано с задержкой развития нервной системы и значительно повышенным риском развития расстройств аутистического спектра у детей (Christensen et

al., 2013; S. J. Moore et al., 2000; Williams et al., 2001). Однако, исследования риска развития РАС в зависимости от триместра воздействия дали довольно противоречивые данные (Bjørk et al., 2022; Christensen et al., 2013; Coste et al., 2020). Таким образом, точный гестационный период для риска развития РАС не установлен и не исключен на протяжении всей беременности. Поэтому изучение время-зависимых вальпроат-индуцированных нарушений развития ЦНС, связанных с РАС, считается высокоприоритетным.

На основании вышеизложенного введение вальпроата беременным крысам на 12-ый день беременности стало одной из проверенных и широко используемых моделей РАС на животных (Bambini-Junior et al., 2011; Mabunga et al., 2015; T. Schneider & Przewłocki, 2005). Одним из известных эффектов ВК является повышение уровня ГАМК и ингибирование гистоновой деацетилазы (Kanai et al., 2004). Повышенный уровень ГАМК может изменять баланс возбуждающей и ингибирующей (В/И) нейротрансмиссии. При этом, дисбаланс В/И является одной из доминирующих теорией развития РАС (S. V. Nelson & Valakh, 2015; Yizhar et al., 2011).

Однако, возвращаясь к вопросу постнатального воздействия вальпроевой кислоты на процесс формирования мозга крыс, многое остается неясным. Исходя из литературных данных, для исследования нарушений развития мозга и проявления симптомов РАС, постнатальное введение вальпроевой кислоты тестировалось в периоде 0-14 дней, что соответствует третьему триместру беременности у людей по уровню развития мозга (Reynolds et al., 2012a; Wagner et al., 2006). Данные исследования в основном были ориентированы на выявление поведенческих нарушений и не имели широкий молекулярно-клеточный спектр исследований. Вопрос воздействия ВК на продукцию нейротрофинов, миграцию и дифференциацию клеток в разные периоды развития, а также продолжительность изменений и возможную их обратимость, в зависимости от периода введения изучен не полностью.

Научная гипотеза исследования. Исходя из клинических данных очевидна актуальность исследования уязвимости ЦНС по отношению к ВК и периоду ее применения. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушений нейроразвития, вызванных ВК, остаются неясными. Принимая во внимание следующие факты: 1) патогенез РАС может затрагивать различные стадии эмбрионального и постнатального нейрогенеза, 2) постнатальный период (ПНД 14) развития соответствует пику синаптогенеза, как ключевое патогенетическое звено РАС, 3) постнатальный период (ПНД 14-21) развития соответствует пику синтеза нейтрофинов, как регуляторов нейрогенеза, 4) соответствие постнатального периода (ПНД 1-14) развития крыс третьему триместру беременности человека, мы выдвинули *гипотезу*, о различных уровнях уязвимости мозга к повреждениям, вызванным вальпроевой кислотой, на протяжении пренатального и раннего постнатального развития нервной системы, а также о тяжести проявлений в соответствии с выраженностью поражений. Поэтому в нашем исследовании мы решили вводить вальпроат как в пренатальный, так и в постнатальный периоды развития, и оценить уровень структурных и функциональных повреждений мозга с помощью поведенческих, биохимических, морфологических и электрофизиологических исследований в различные периоды развития.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является изучение время-зависимого воздействия вальпроевой кислоты на предмет развития аутизм-ассоциированных отклонений у молодых и взрослых крыс и лежащих в их основе нарушений раннего постнатального нейрогенеза. Для достижения выдвинутой цели были поставлены *следующие задачи*:

На *пренатальной* и *постнатальной* вальпроатной моделях расстройств аутистического спектра:

1. провести батарею поведенческих тестов (ультразвуковая вокализация, тест трех камер, социальное взаимодействие, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, Y-образный лабиринт, горячая платформа) на предмет выявления аутизм-ассоциированных отклонений в динамике;
2. выявить изменения в содержании нейротрофических факторов роста (BDNF, NT-3, GDNF, IGF-1) на ПНД 14 и 21 в обонятельной луковице, префронтальной коре, субвентрикулярной зоне и гиппокампе головного мозга;
3. определить наличие и сдвиги в количестве цитозольных (даблкортин, GFAP), везикулярного (синаптофизин) и ядерного (NeuN) нейрогенетических маркеров на ПНД 14 и 21 в обонятельной луковице, префронтальной коре и гиппокампе головного мозга;
4. выявить и количественно оценить сдвиги NeuN и GFAP продуцирующих клеток на ПНД 14 и 21 в префронтальной коре и гиппокампе головного мозга;
5. оценить морфологическую целостность клеточных организаций в различных структурах головного мозга на ПНД 14, P21, 60;
6. провести микроэлектрофизиологические исследования фоновой и вызванной на высокочастотную стимуляцию (ВЧС) гиппокампа, мозжечка и амигдалы спайковой активности единичных нейронов префронтальной коры головного мозга на ПНД 60.

Научная новизна. Научная новизна данной работы заключается в систематизированном и интегративном исследовании воздействия пренатального и постнатального введения вальпроевой кислоты на продолжительность и обратимость нейрогенных нарушений, проявляемых на фенотипическом, биохимическом, структурно-клеточном и функциональном уровнях. Также является важным временно-региональный подход исследования, реализующийся посредством динамических исследований возможных нейрхимических и структурных нарушений в разных областях мозга.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе исследования результаты углубляют представления о молекулярно-клеточных механизмах нарушений нейроразвития, индуцированных воздействием вальпроевой кислоты в перинатальном периоде. Результаты исследования могут быть использованы для оптимизации экспериментальных моделей РАС и разработки новых подходов для их валидации и сравнительного анализа. Выявленные временные и структурные особенности нарушений нейрогенеза позволяют точнее выбирать периоды и мишени для нейропротекторного фармакологического вмешательства. Определение динамики изменений нейротрофинов и клеточных маркеров может служить биохимической основой для поиска потенциальных биомаркеров ранней диагностики РАС. Кроме того, комплексный подход, сочетающий поведенческие, морфологические, молекулярные и электрофизиологические методы, делает возможным использование полученных данных при разработке стратегий превентивной терапии в перинатальном и раннем постнатальном периодах.

Апробация материалов работы. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на международных конференциях: 31-ый ECNP конгресс, (Барселона, 2018), 11-ый FENS Форум Нейронауки (Берлин, 2018), 33-ый ECNP конгресс (Вена, 2020), Neuroscience week (Ереван, 2023), Neuroscience week (Ереван, 2024); на расширенном заседании лаборатории Нейронауки научно-образовательного центра фундаментальных исследований мозга “КОБРЕЙН” ЕГМУ, (Ереван, 2024) и экспертного совета “Теоретическая медицина” ЕГМУ (Ереван, 2025).

Публикации работ. Результаты проведённых исследований представлены в восьми печатных работах: пяти статьях, из которых четыре опубликованы в журналах первого квартала (Q1) по классификации Web of Science, одной статье в национальном издании, а также в трёх международных тезисах.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах компьютерного текста, включая 2 графических изображения, 30 рисунков. Она состоит из следующих глав: введение, обзор литературы (Глава 1), материалы и методы (Глава 2), результаты (Глава 3), обсуждение (Глава 4), заключение, выводы и список литературы, включающий 235 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Животные. Эксперименты проводились на лабораторных половозрелых крысах Sprague-Dawley, полученных из университетского вивария Ереванского государственного медицинского университета имени М. Гераци. Все протоколы эксперимента соответствовали условиям Директивы Совета Европейских сообществ (86/609 / ЕЕС) и были одобрены этическим комитетом Ереванского государственного медицинского университета имени М. Гераци (Протокол N1, 20.09.2018, N8-3/24; N3, 14.11.2024).

Дизайн эксперимента. Эксперимент проводился на двух разных животных моделях РАС, полученных путем внутрибрюшного введения раствора вальпроевой кислоты в периодах пренатального и постнатального развития. Для пренатальной модели на 12-ый день беременности самкам внутрибрюшинно вводился раствор вальпроевой кислоты в дозе 500 мг/кг концентрацией 150 мг/мл. Для постнатальной модели в периоде с 5-ого по 12-ый дни постнатального развития животные получали внутрибрюшные инъекции вальпроевой кислоты в дозе 200 мг/кг концентрацией 150 мг/мл. Животные контрольной группы в те же периоды получали инъекции физиологического раствора.

С целью фенотипической валидации моделей на 30-ый и 60-ый дни постнатального развития у животных проверялись поведенческие реакции, характерные аутистическому спектру расстройств. Биохимические исследования нейрогенетических маркеров и факторов роста в определенных структурах мозга проводились на ранних сроках развития: 14-ый и 21-ый постнатальные дни (ПНД) развития. Параллельно было проведено морфологическое исследование тех же структур мозга в те же временные периоды, а также на ПНД60. На ПНД60 было проведено электрофизиологическое исследование следующих нейрональных путей: гиппокамп - префронтальная кора, зубчатое ядро мозжечка – префронтальная кора, гиппокамп – базолатеральное ядро миндалевидного тела.

Поведенческие тесты. Как уже отмечалось выше, поведенческие исследования проводились с целью фенотипической валидации моделей. Нами были выбраны следующие тесты: ультразвуковая вокализация (Varga et al., 2024), тест трех камер (Hisaoka et al., 2018), тест социального взаимодействия (Schneider & Przewłocki, 2005), тест открытого поля (Mony et al., 2016), тест приподнятого крестообразного лабиринта (Cryan & Holmes, 2005), тест Y-образного лабиринта (Silverman et al., 2011), тест горячей платформы (Silverman et al., 2011). Для анализа видеорегистраций использовалась программа AnyMaze (поведенческая видеотракинга AnyMaze, Stoelting Co).

Биохимические исследования. На 14-ый и 21-ый дни постнатального развития в тканевых лизатах, полученных из префронтальной коры, обонятельных луковиц, гиппокампа и субвентрикулярной зоны мозга, производилось количественное определение цитозольных, везикулярных и ядерных нейрогенетических маркеров, а также факторов роста. Тканевые лизаты были получены путем механической гомогенизации с использованием RIPA буфера. Определение общего белка проводилось общепринятым методом Бредфорда (Kielkopf et al., 2020).

Методом *Вестерн блота* были определены нейрогенетические клеточные белки-маркеры. Белки предварительно разделялись в 10% полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза. Электрофорез и трансфер проводились на системе Bio-Rad. Мембраны инкубировались первичными антителами в течение 12 часов при 4°C (Rb

antiGFAP 1:1000, Dako, Z0334, Ms antiNeuN 1:500, MAB377, Ms antiDCX 1:500, sc-271390, Ms antiSYN 1:500, SAB4200544). Затем мембраны инкубировались вторичными антителами 1.5 часа (antiMs 1:1000, Ab97023, antiRabbit 1:1000, ab6721). В качестве контрольного белка был использован актин (Gt antiActin 1:500, ab8229, antiGoat 1:1000, ab97110) (LeincoTechnologies, 2013). Детекция проводилась на гель документирующей системе (Vilber Fusion Fx).

Методом *иммуноферментного анализа* были определены нейротрофические факторы роста – BDNF, NT-3, IGF-1, GDNF – с помощью коммерческих кит наборов (Rat NT-3 ELISA Kit PicoKine, E0474; Rat BDNF ELISA Kit PicoKine, EK0308; Rat IGF-1 ELISA Kit PicoKine, E0377, Rat GDNF ELISA Kit PicoKine, EK0363). Детекция проводилась на микропланшетном/кюветном спектрофотометре при 450нм (Multiscan GO). Нормализация проводилась по количеству общего белка.

Клеточные исследование. Для подсчета GFAP и NeuN положительных клеток в префронтальной коре и гиппокампе крыс был использован метод *иммунофлуоресцентного окрашивания*. Коронарные срезы толщиной 20 мкм обрабатывались первичными (Abscam 7260, anti-GFAP, 1:200; Boster A11954, anti-NeuN, 1:100) и вторичными (Abscam 175695, анти-кроличьи IgG, AF 568, 1:500) антителами. Визуализация иммунофлуоресцентного окрашивания выполнялась на микроскопе Nikon Eclipse Ni.

Морфологические исследования. Для морфологической оценки нейронов определенных структур мозга было использовано гистохимическое окрашивание Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы по методу Меликсетян И.Б. (Yenkoan et al., 2011). *Исследования проводились совместно с лабораторией гистохимии и морфологии Института физиологии им. Л.А. Орбели под руководством к.б.н. Даниелян Маргариты.*

Электрофизиологические исследования. Электростимуляция проводилась биполярным цилиндрическим электродом по соответствующим стереотаксическим координатам мозга. Стереотаксически ориентированные стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 1-2 μ м, заполненные 2М раствором NaCl, вживляли в соответствующие структуры мозга для экстраклеточной регистрации фоновой и вызванной спайковой активности одиночных нейронов. Высокочастотная стимуляция (ВЧС) (100 Гц в 1 сек) достигалась путем использования прямоугольного заряда 0.05 мс с амплитудой 0,08-0,10 мА. Регистрация и анализ спайковой активности одиночного нейрона производилась с помощью разработанной компьютерной программы (Aghajapov et al., 2014; Yenkoan et al., 2011). *Электрофизиологические эксперименты проводились совместно с лабораторией нейроэндокринных взаимоотношений Института физиологии им. Л.А. Орбели под руководством зав. лаб., д.б.н Чавушян Е. А.*

Статистический анализ данных. Нормальность и однородность дисперсий проверялась тестом Шапиро–Уилка и F-тестом. При нормальном распределении использовали однофакторный ANOVA с пост-хок тест Даннетта; при ненормальном — критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну. Для парных сравнений применяли двусторонний непарный t-тест Стьюдента или U-тест Манна–Уитни. Гетерогенность межспайковых интервалов и частоты спайков до/после стимуляции оценивали t-тестом Стьюдента и U-тестом Манна–Уитни. Различия между контрольной и ВК-группой проверяли χ^2 -критерием и точным тестом Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

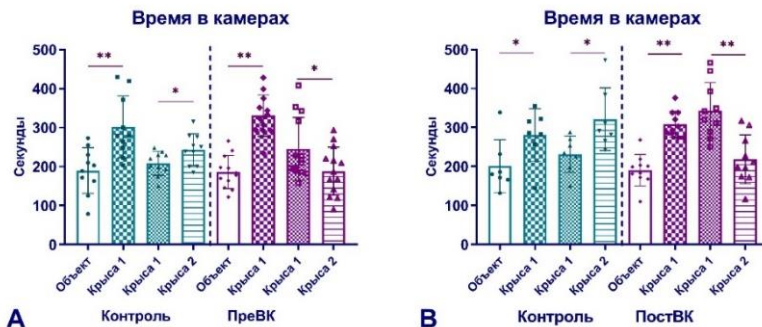
Оценка поведенческих изменений животных на ПНД 14, 30 и 60

С целью фенотипической валидации пренатальной и постнатальной моделей был проведен ряд поведенческих тестов. Тест ультразвуковой вокализации, проведенный на

14-ый день постнатального развития, выявил статистически достоверное уменьшение количества (в 43,2 раз, $p < 0.01$) и продолжительности (в 260 раз, $p < 0.01$) звуковых сигналов, испускаемых детенышами пренатальной вальпроатной группы относительно животных контрольной группы. Похожие отклонения были обнаружены также в постнатальной вальпроатной группе (в 24 раза, $p < 0.01$, в 75 раза, $p < 0.01$, соответственно). Данные изменения свидетельствуют об инертной связи между детенышем и матерью с проявлением слабой реакции в ответ на изоляцию.

Результаты теста трех камер показали, что животные контрольных групп провели в камерах с животными в 1,6 раза больше времени нежели в пустых камерах в первой стадии эксперимента ($p < 0.01$). Результаты второй стадии эксперимента показали, что контрольные животные в камере с новым животным проводят в 1,2 раза больше времени чем со знакомым ($p < 0.05$). Животные, получавшие инъекцию вальпроевой кислоты в периоде пренатального развития показали аналогичный контрольным животным результат на первой стадии теста (увеличение в 1,8 раз, $p < 0.001$). На второй стадии эксперимента животные в 1,3 раза больше времени провели в камере с уже знакомой крысой нежели с новопомещенной ($p < 0.05$) (Рис. 1 А, В). Результаты теста социальной взаимосвязи на 30-ый день постнатального развития выявили пассивное игровое поведение, выраженное уменьшением суммарной продолжительности «flipping» и

Тест трех камер



Тест оценки социальной взаимосвязи

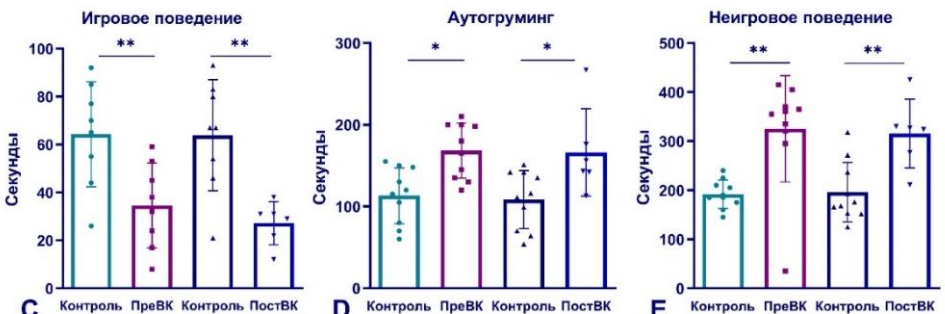


Рисунок 1. Поведенческие изменения у крыс в тесте трех камер (А,В) и социальной взаимосвязи (С,Д,Е) на ПНД 30 после пренатального и постнатального введения вальпроевой кислоты. Данные представлены как среднее значение \pm SD, $n=10$. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

«rouncing», у пренатальной вальпроатной группы относительно контрольной группы в 2,3 ($p<0.01$) и в 3 раза ($p<0.01$) соответственно. Суммарная длительность грумминга (в 1,8 раза, $p<0.01$) и обнюхивания друг друга (в 1,7 раза, $p<0.01$) была увеличена у пренатальной вальпроатной группы относительно контрольной на 30-ый день постнатального введения. Продолжительность аутогрумминга у пренатальной вальпроатной группы была в 1,5 раза дольше относительно контрольной группы на 30-ый день исследования ($p<0.05$).

После постнатального введения вальпроевой кислоты на 30-ый день исследования было выявлено снижение продолжительности игрового поведения в 2,3 раза ($p<0.01$). Аналогично результатам пренатальной группы у постнатальной группы были статистически достоверно повышены параметры неигрового поведения, в частности обнюхивания (в 1,6 раза, $p<0.01$) и грумминга (в 2 раза, $p<0.01$). Продолжительность аутогрумминга была в 1,6 раза повышена у постнатальной вальпроатной группы на 30-ый день исследования ($p<0.05$) (Рис. 1 С, D, E).

Результаты исследования показали, что пренатальное введение вальпроевой кислоты приводит к проявлению менее тревожного поведения на 30-ый день постнатального развития, выраженного увеличением числа входов в открытый рукав в 1,3 раза относительно контрольной группы ($p<0.05$). Аналогичное изменение степени тревожности было обнаружено и в постнатальной группе, выраженное увеличением в 1,4 раза, соответственно ($p<0.05$). Результаты теста открытого поля показали, что у животных пренатальной группы двигательная активность в центральной зоне в 2,8 раза больше чем у контрольной группы ($p<0.05$). В постнатальной группе данная тенденция была также выражена увеличением в 1,9 раза соответственно ($p<0.05$). Результаты теста открытого поля также показали уменьшение времени, проведенного в вертикальной позе, в обеих экспериментальных группах в 1,8 и 2,1 раз соответственно ($p<0.05$, $p<0.01$) (Рис. 2 А, В, Е, F, G). Результаты поведенческих тестов, проведенных на 60-ый день развития, сравнимы с выше описанными данными только в случае пренатальной группы. У животных постнатальной группы была выявлена тенденция восстановления обнаруженных отклонений.

Оценка биохимических и морфологических изменений в разных структурах мозга на ПНД 14 и ПНД 21

Изменения в префронтальной коре мозга под воздействием вальпроевой кислоты

При пренатальном воздействии вальпроевой кислоты в префронтальной коре крыс на 14-ый день постнатального развития было выявлено статистически достоверное повышение уровня GFAP в 2,5 раза относительно контрольной группы ($p<0.01$). Наряду с этим было обнаружено статистически достоверное понижение уровня NeuN в 1,5 раза ($p<0.01$) и SYP в 4,5 раза ($p<0.001$). На 21-ый день постнатального развития тенденция нарушений была сохранена, что выражалась статистически достоверным повышением уровня GFAP в 1,8 раза ($p<0.001$) и понижением уровня NeuN в 3 раза ($p<0.001$), SYP в 2,4 раза ($p<0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 3 А, Е).

При постнатальном воздействии вальпроевой кислоты в префронтальной коре крыс на 14-ый день постнатального развития было выявлено статистически достоверное повышение уровня GFAP в 1,4 раза относительно контрольной группы ($p<0.001$) и понижение уровня SYP в 1,4 раза ($p<0.05$) относительно контрольной группы. На 21-ый день постнатального развития изменения выражались статистически достоверным повышением уровня GFAP в 2 раза ($p<0.05$) и понижением уровня SYP в 2 раза ($p<0.05$) относительно контрольной группы (Рис. 3 С, G).

Крестообразный лабиринт

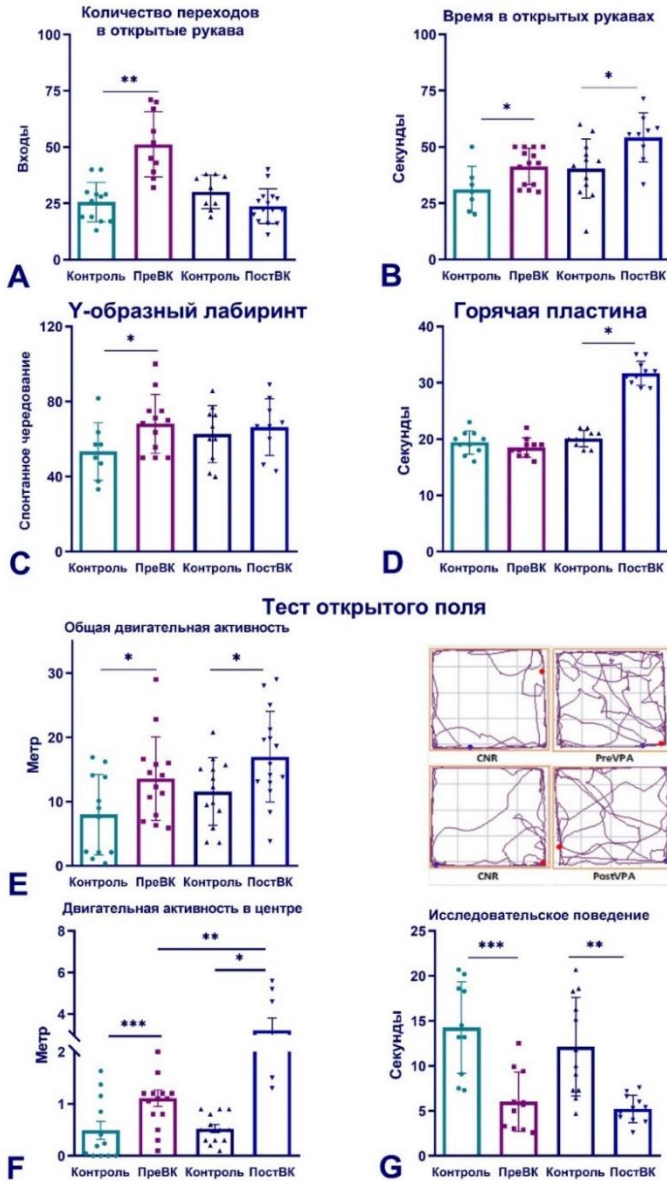


Рисунок 2. Поведенческие изменения у крыс в тестах X-образный (А,В), Y-образный (С) лабиринт, горячая пластина (D), открытое поле (Е,Г,И) на ПНД 30 после пренатального и постнатального введения вальпроевой кислоты. Данные представлены как среднее значение \pm SD, n=10. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Пренатальное введение вальпроевой кислоты вызывало статистически значимые изменения уровней Nt-3 и IGF-1 в префронтальной коре на ПНД 14 и 21. В частности, при пренатальном воздействии вальпроевой кислоты уровень Nt-3 был понижен в 1.2 раза ($p < 0.05$) относительно контрольной группы на ПНД 14. На ПНД 21 было обнаружено резкое повышение уровня Nt-3 в 1,4 раза в экспериментальной группе ($p < 0.05$). При этом достоверное понижение уровня IGF-1 в 1,8 раз было обнаружено в экспериментальной группе на ПНД 21 ($p < 0.001$) (Рис. 3 В, F). При постнатальном воздействии вальпроевой кислоты были выявлены схожие изменения нейротрофинов в префронтальной коре. Статистически достоверное понижение уровня Nt-3 в 1.5 раза ($p < 0.05$) и IGF-1 в 2.9 раза ($p < 0.001$) на Пнд 14 относительно контрольной группы. Отличительным было резкое повышение уровня IGF-1 в 2,2 раза ($p < 0.05$) на 21-ый день постнатального развития относительно как контрольной группы, так и постнатальной группы на ПНД 14.

Статистически достоверных изменений среди остальных факторов роста на ПНД 21 обнаружено не было (Рис. 3 D, H). Однако важно отметить, что обнаруженные изменения на 21-ый день в экспериментальной пренатальной группе были менее выражены сравнительно с изменениями на 14-ый день.

Результаты морфо-гистохимического исследования клеток префронтальной коры крыс на ПНД 14 при пренатальном введении вальпроевой кислоты показали наличие набухших пирамидных клеток с выраженным центральным хроматолизом. Пирамидные клетки как наружного, так и внутреннего слоев префронтальной коры были менее интенсивно окрашены, имели нечеткий контур тела и слабо-выраженные отростки. Процентное соотношение поврежденных клеток относительно всей популяции в поле зрения составляло примерно 48%. Отмеченные структурные изменения клеток были сохранены на ПНД 21, однако встречались намного реже. Морфологическая картина клеток в основном была близка к норме процентное соотношение поврежденных клеток составляло 12%. Сравнительно с выше описанными изменениями при постнатальном введении вальпроевой кислоты морфологических нарушений клеток префронтальной коры обнаружено не было как на ПНД 14, так и на 21.

Для оценки количества GFAP- и NeuN-положительных клеток было проведено иммунофлюоресцентное окрашивание слоев префронтальной коры крыс на ПНД 14 и 21. В префронтальной коре снижение отношения NeuN/DAPI отмечалось в группе крыс, получавших ВК пренатально, на обоих сроках (на ПНД 14 в 1.5 раза, на ПНД 21 в 1.6 раз, $p < 0.001$), тогда как у постнатальной группы достоверных изменений не было выявлено (Рис. 4 В). Увеличение отношения GFAP/DAPI в ПФК крыс обеих экспериментальных групп было зарегистрировано на PND 14 (ПреВК в 1.5 раза, ПостВК в 1.5 раз, $p < 0.05$). На PND 21 статистически достоверное повышение в 1.5 раза ($p < 0.05$) соотношения GFAP/DAPI отмечалось только в постнатальной группе животных (Рис. 4 А)

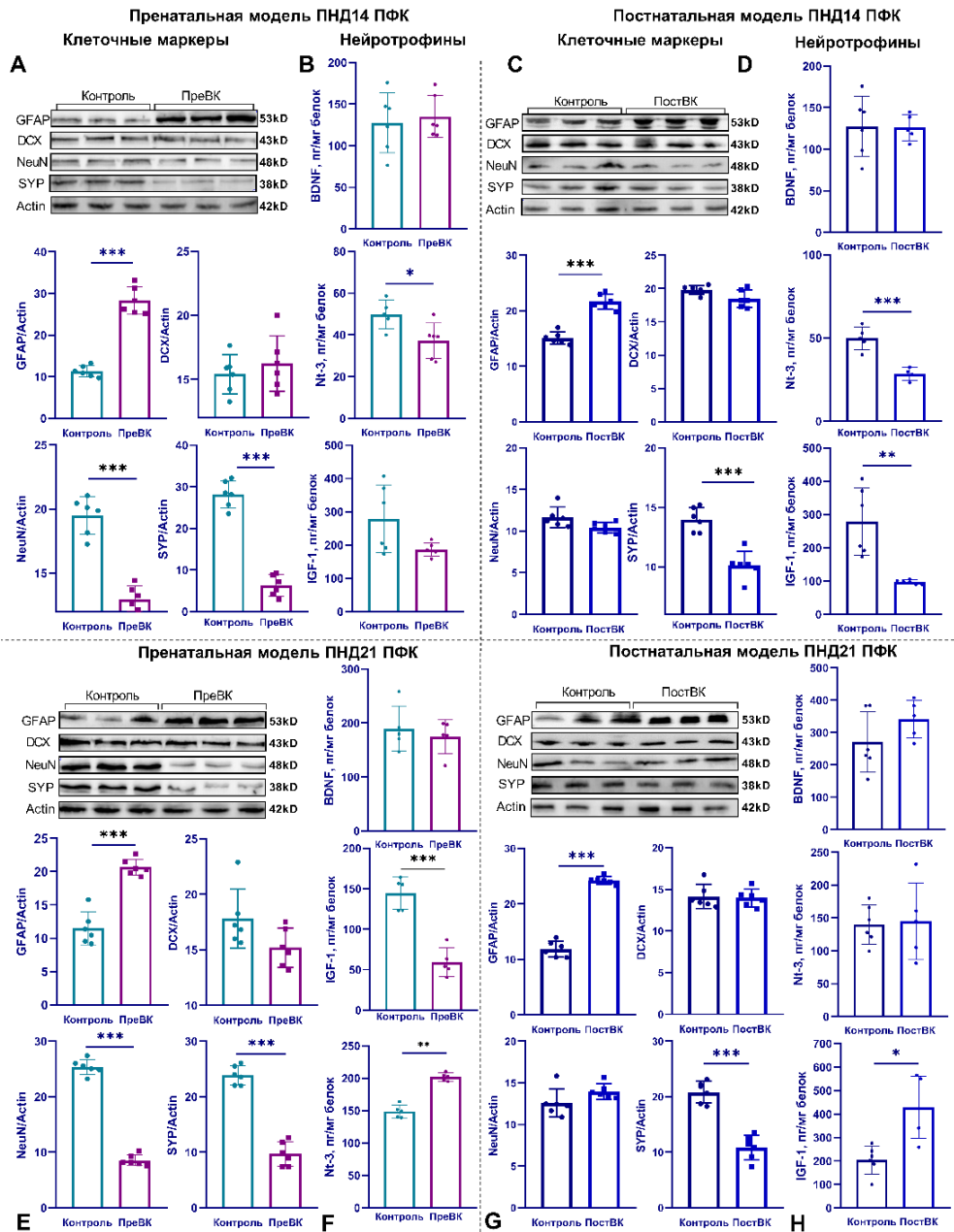


Рисунок 3. Изменения в содержании белков GFAP, DCX, NeuN, SYP (A, C, E, G) и нейротрофинов BDNF, Nt-3, IGF-1 (B, D, F, H), в префронтальной коре крыс на ПНД 14 и ПНД 21 после пренатального и постнатального введения ВК. Данные представлены как среднее значение \pm SD, n=6. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

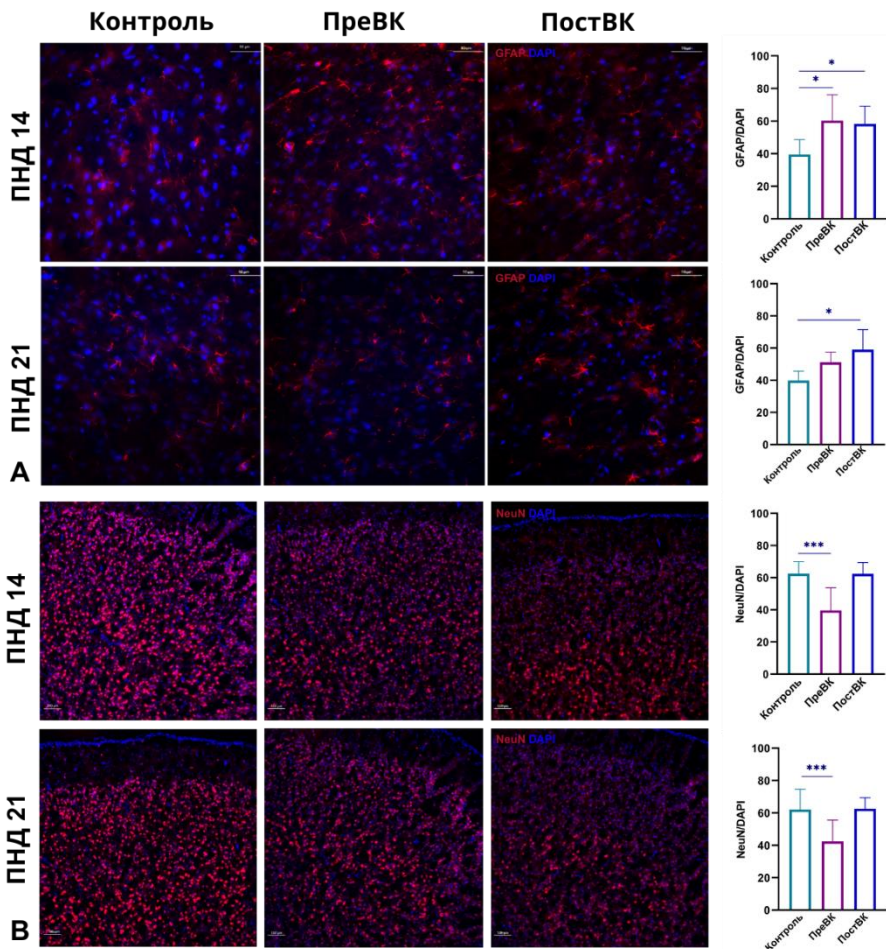


Рисунок 4. Изменения соотношений GFAP/DAPI (А) и NeuN/DAPI (В) в префронтальной коре крыс на ПНД 14 и ПНД21 после пренатального и постнатального введения ВК. Изображения получены при увеличении 400. Масштабная линейка = 50 мкм (А), 100 мкм (В). Данные представлены как среднее значение \pm SD. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Изменения в гиппокампе мозга под воздействием вальпроевой кислоты

При пренатальном введении вальпроевой кислоты в гиппокампе крыс на ПНД 14 не было обнаружено статистически достоверных изменений белковых-маркеров относительно контрольной группы (Рис. 4 А). Однако, на ПНД 21 было выявлено отклонение всех тестируемых белковых маркеров. В частности, полученные данные показали статистически достоверное понижение уровня GFAP в 1.2 раза ($p < 0.01$) и нейронального маркера DCX в 1.3 раза ($p < 0.01$), и наоборот статистически достоверное

повышение уровней NeuN в 1.3 раза ($p<0.05$) и SYP в 2.2 раза ($p<0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 5 Е).

При постнатальном введении вальпроевой кислоты в гиппокампе крыс на ПНД 14 было выявлено достоверное повышение уровней GFAP в 1.2 раза ($p<0.01$) и NeuN в 2 раза ($p<0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 5 С). Значительных количественных отклонений DCX и SYP выявлено не было. На ПНД 21 картина была полностью изменена. В частности, данные показали достоверное понижение уровня GFAP в 1.4 раза ($p<0.001$) и DCX в 1.4 раза ($p<0.001$) (Рис. 4 G). Важно отметить, что это единственное своего рода изменение уровня GFAP на протяжении всего исследования. На ПНД 21 также было выявлено статистически достоверное повышение уровня SYP в 1.6 раза ($p<0.001$) и относительно контрольной группы (Рис. 5 G).

Таким образом, описанные изменения указывают на нарушения нейроглиального соотношения с выраженным смещением в сторону нейронального ряда. Сравнение данных гиппокампа двух экспериментальных групп выявляет общую закономерность изменений, при этом в постнатальной группе они проявляются на более раннем этапе.

Пренатальное введение вальпроевой кислоты вызывало достоверные изменения уровней BDNF, Nt-3 и IGF в гиппокампе крыс на ПНД 14 и 21. В частности, значимое повышение уровня BDNF в 1.5 раза ($p<0.001$) и Nt-3 в 2.2 раза ($p<0.001$), понижение уровня IGF в 2.1 раза ($p<0.001$) относительно контрольной группы на ПНД 14 (Рис. 5 В). На ПНД 21 отмеченные изменения BDNF, IGF были сохранены. Но также было выявлено достоверное понижение уровня Nt-3 в 2 раза ($p<0.01$) и GDNF в 2.7 раза ($p<0.05$) относительно контрольной группы (Рис. 5 F). При постнатальном введении вальпроевой кислоты на ПНД 14 было обнаружено статистически достоверное повышение Nt-3 в 1.9 раза ($p<0.01$) и GDNF в 2 раза ($p<0.001$), понижение IGF в 2.7 раза ($p<0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 5 D). На ПНД 21 картина была полностью изменена в контексте уровней Nt-3 и IGF. В частности, было выявлено понижение уровня Nt-3 в 1.7 раза ($p<0.001$), повышение IGF-1 в 2.7 раза ($p<0.001$) и BDNF в 1.8 раза ($p<0.001$) (Рис. 5 H).

Результаты морфо-гистохимического исследования при пренатальном введении вальпроевой кислоты на ПНД 14 показали наличие поврежденных клеток в зубчатой извилине гиппокампа, что характеризовывалось центральным хроматолизом, потерей отростков. Процентное соотношение поврежденных клеток относительно всей популяции в поле зрения составляло примерно 49%. На ПНД 21 морфологическая картина клеток гиппокампа была близка к норме. Данные морфологического исследования клеток гиппокампа после постнатального введения вальпроевой кислоты не указывают на наличие деформированных клеток как на ПНД 14, так и на 21.

В гиппокампе крыс, получавших ВК в постнатальном периоде, отмечалось увеличение отношения NeuN/DAPI в 1.5 ($p<0.001$) раза в илиусе зубчатой извилины на ПНД 14 (Рис. 6 А), на ПНД 21 в 1.2 раза ($p<0.05$). Напротив, у животных, получавших ВК пренатально, достоверное повышение отношения NeuN/DAPI выявлено только на ПНД 21, преимущественно в области СА3 в 1.3 раза и илиусе в 1.3 раза ($p<0.01$) (Рис. 6 В). Повышение отношения GFAP/DAPI наблюдалось в гиппокампе крыс постнатальной группы во всех окрашенных зонах на ПНД 14 (СА3 в 1.4 раза, p CA1 в 1.2 раза, $p<0.01$; DG в 1.3 раза $p<0.05$), тогда как у животных, получавших ВК пренатально, значимых изменений не было выявлено.

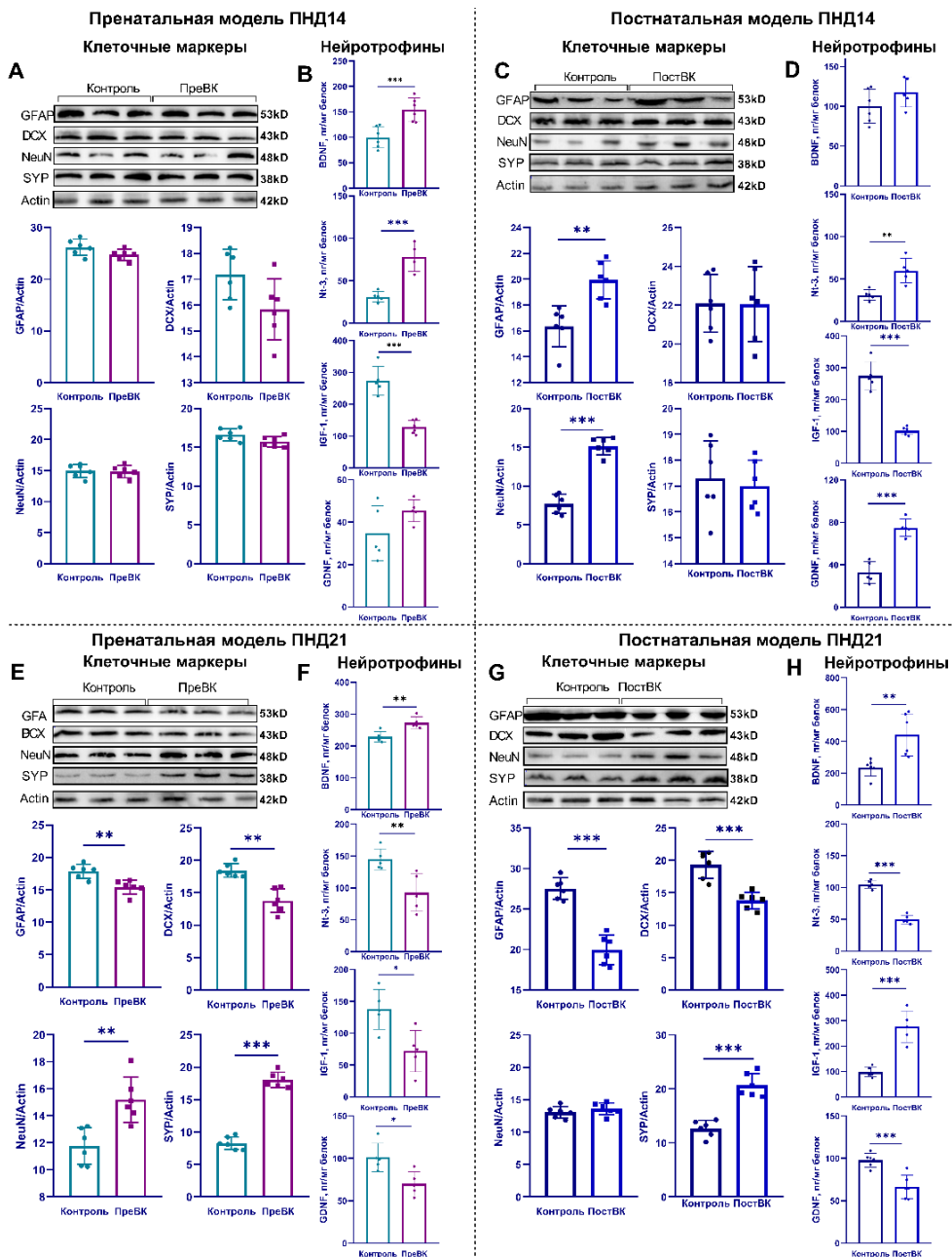


Рисунок 5. Изменения в содержании белков GFAP, DCX, NeuN, SYP (A, C, E, G) и нейротрофинов BDNF, Nt-3, IGF-1, GDNF (B, D, F, H), в гиппокампе крыс на ПНД 14 и ПНД 21 после пренатального и постнатального введения ВК. Данные представлены как среднее значение \pm SD, $n=6$. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

В то же время на ПНД 21 было зафиксировано снижение отношения GFAP/DAPI в обеих экспериментальных группах крыс, особенно в областях CA1 (ПреВК в 1.4 раза, ПостВК в 1.5 раз) и CA3 (ПреВК в 1.3 раза, ПостВК в 1.3 раз) по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

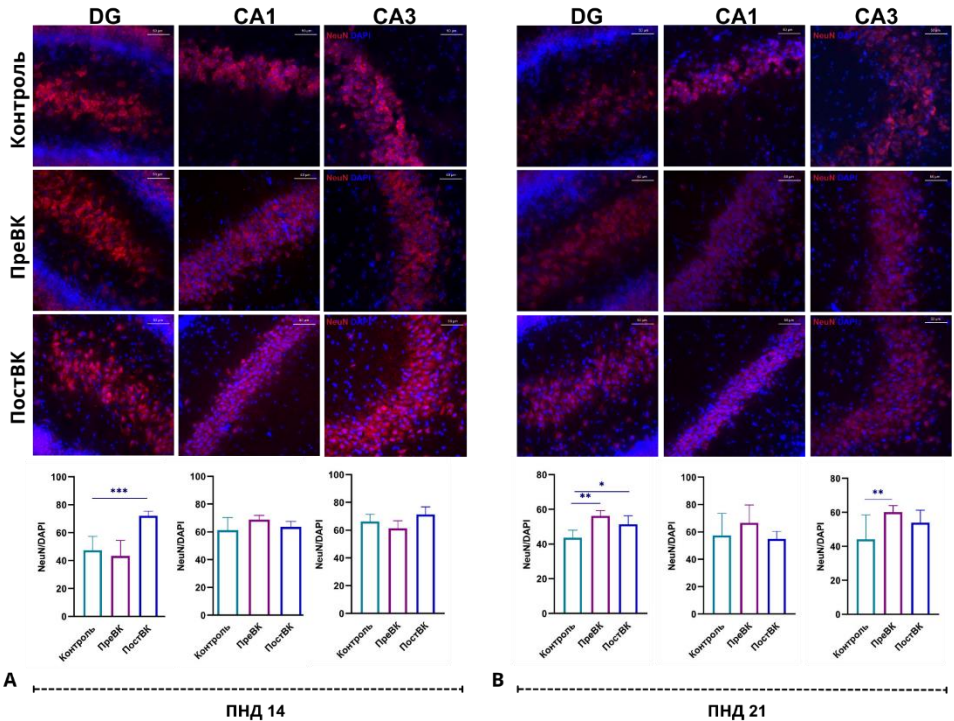


Рисунок 6. Изменения соотношений NeuN/DAPI в гиппокампе крыс на ПНД 14 (А) и ПНД 21 (В) после пренатального и постнатального введения вальпроевой кислоты.

Изображения получены при увеличении 400. Масштабная линейка = 50 мкм. Данные представлены как среднее значение \pm SD. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Изменения в обонятельной луковице мозга под воздействием вальпроевой кислоты

При пренатальном введении вальпроевой кислоты в обонятельной луковице крыс на 14-ый день постнатального развития было обнаружено статистически достоверное повышение уровня GFAP в 2.6 раз ($p < 0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 5 А). Других достоверных отклонений найдено не было. На 21-ый день постнатального развития было выявлено статистически достоверное понижение уровня DCX в 1.3 раз ($p < 0.001$) (Рис. 7 Е). Других достоверных изменений нейрональных маркеров обнаружено не было.

При постнатальном введении вальпроевой кислоты в обонятельной луковице крыс на 14-ый день постнатального развития было выявлено достоверное повышение уровня GFAP в 2.1 раз ($p < 0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 7 С). Значительных количественных отклонений DCX и NeuN выявлено не было. На 21-ый день постнатального развития данные показали достоверное повышение GFAP в 2.2 раза ($p < 0.001$) и понижение DCX ($p < 0.01$) (Рис. 7 G).

Количественная оценка факторов роста, оцененных в обонятельной луковице крыс на ПНД 14 и 21 после пренатального введения вальпроевой кислоты, показала статистически достоверное изменение уровней BDNF, Nt-3, IGF и GDNF. В частности повышение уровня BDNF в 1.4 раза ($p < 0.001$) на ПНД 14 относительно контрольной группы (Рис. 7 B). На ПНД 21 повышенный уровень BDNF (в 1.3 раза, $p < 0.01$) продолжал сохраняться, но наряду с этим было обнаружено понижение уровней Nt-3 в 1.9 раза ($p < 0.01$) и GDNF в 2.7 раза ($p < 0.01$) относительно контрольной группы (Рис. 7 F).

При постнатальном введении вальпроевой кислоты на ПНД 14 было обнаружено статистически достоверное повышение BDNF в 1.3 раза ($p < 0.001$), и понижение IGF в 2 раза ($p < 0.01$) относительно контрольной группы. Статистически достоверный изменений уровней Nt-3 и GDNF обнаружено не было (Рис. 5 D). На ПНД 21 уровень BDNF продолжал расти и был достоверно выше сравнительно с контрольной группой в 1.6 раз ($p < 0.05$). Противоположно, изменениям 14-ого дня развития на ПНД 21 было выявлено достоверное повышение IGF в 2.1 раза ($p < 0.01$) (Рис. 7 H).

Результаты морфо-гистохимического исследования при пренатальном введении вальпроевой кислоты на 14-ый день постнатального развития показали наличие поврежденных клеток в обонятельной луковице мозга крыс. Повреждение клеток характеризовывалось центральным хроматолизом, изменением формы и размеров клеток, потерей отростков, процентное соотношение поврежденных клеток составляло примерно 27%.

На ПНД 21 морфологические изменения клеток сохранились, хотя наблюдалось улучшение относительно результатов 14-ого дня развития и процентное соотношение поврежденных клеток составляло примерно 20%. Данные морфологического исследования клеток обонятельной луковицы после постнатального введения вальпроевой кислоты не указывали на наличие деформированных клеток как на ПНД 14, так и на 21.

Изменения в субвентрикулярной зоне мозга под воздействием вальпроевой кислоты

Результаты иммуноферментного анализа показали понижение уровня BDNF в 1.4 раза ($p < 0.01$) и IGF-1 в 2,6 раз ($p < 0.01$) на 14-ый день постнатального развития после пренатального введения вальпроевой кислоты относительно контрольной группы (Рис. 8 A). Количество GDNF не удалось обнаружить из-за пределов чувствительности используемого теста, что свидетельствует о концентрации нейротрофина меньше 31 пг/мл. На 21-ый день постнатального развития данные показали статистически достоверное повышение уровня BDNF в 1.2 раза ($p < 0.05$) и понижение уровня IGF-1 в 2 раза ($p < 0.001$) относительно контрольной группы (Рис. 8 С). При постнатальном введении вальпроевой кислоты уровень нейротрофинов в субвентрикулярной зоне мозга был изменен аналогично пренатальной группе на 14-ый день постнатального развития.

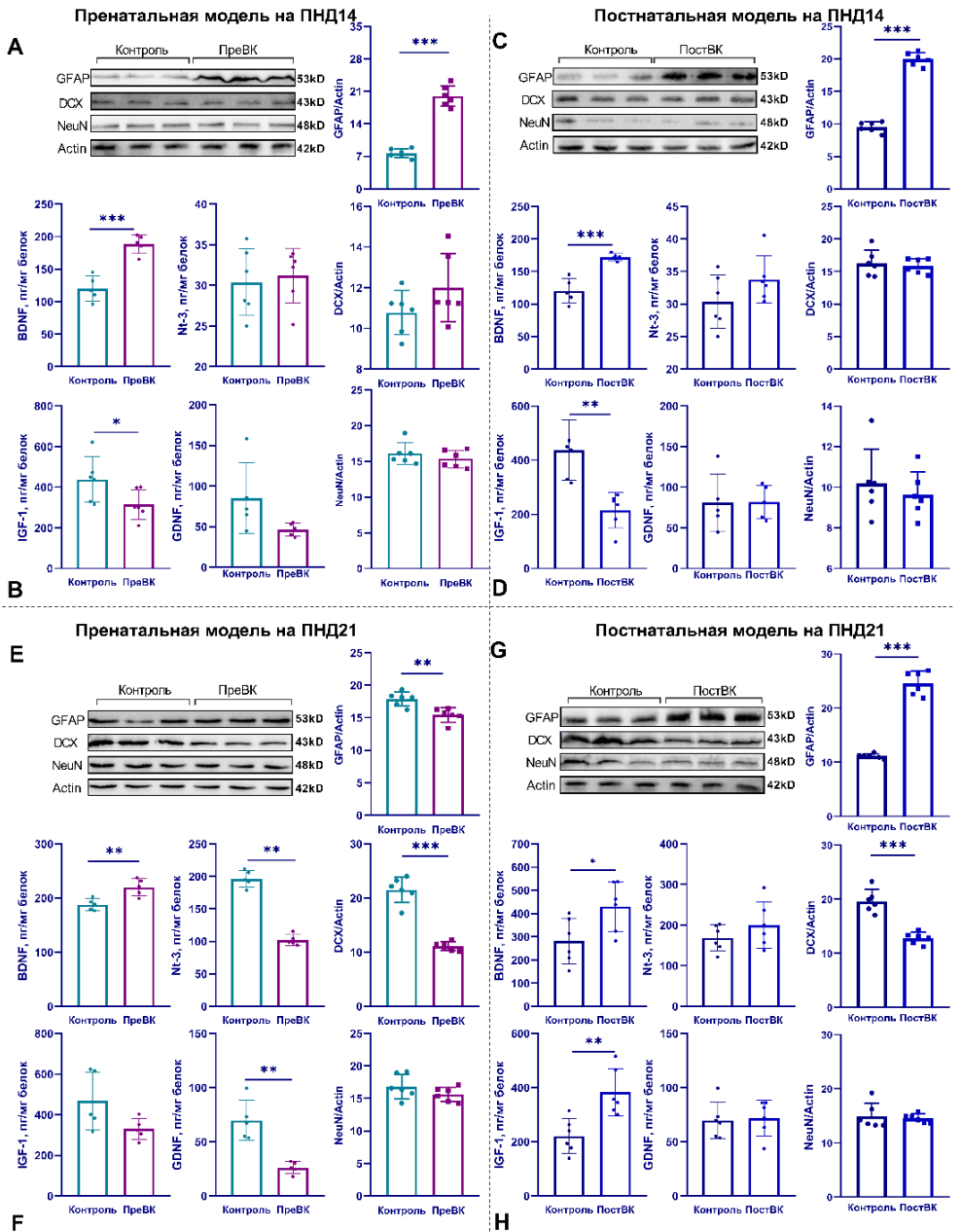


Рисунок 7. Изменения в содержании белков GFAP, DCX, NeuN (А, С, Е, Г) и нейротрофинов BDNF, Nt-3, IGF-1, GDNF (Б, Д, Ж, И) в обонятельной луковице крыс на ПНД 14 и ПНД 21 после пренатального и постнатального введения ВК. Данные представлены как среднее значение \pm SD, n=6. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

В частности уровень всех тестируемых нейротрофинов был значительно понижен относительно контрольной группы (BDNF в 1.4 раз, $p < 0.01$; Nt-3 в 2.2 раза, $p < 0.01$; IGF-1 в 2.9 раз, $p < 0.001$) (Рис. 8 В). На 21-ый день постнатального развития описанные изменения были восстановлены и приближены к норме за исключением уровня IGF-1. В постнатальной группе уровень IGF был повышен в 2.2 раза ($p < 0.01$) относительно контрольной группы (Рис. 8 D).

Результаты морфо-гистохимического исследования субвентрикулярной зоны мозга после пренатального введения вальпроевой кислоты выявили утолщение боковой стенки желудочка на 14-ый и 21-ый дни постнатального развития. Также выделялось изменение формы эпендимоцитов в виде круглых шаров, выпирающих в просвет 3-его желудочка, с выявляемыми участками десквамации. У интактных животных стенки 3-его желудочка мозга выстигались слоями клеток более плотно расположенными друг к другу, цилиндрической формы с круглыми ядрами у основания клеток.

При постнатальном введении вальпроевой кислоты на 14-ый день развития в субвентрикулярной зоне мозга также было выявлено утолщение стенки желудочка с локальными участками десквамации. Однако сравнительно с пренатальной группой межклеточный контакт был более плотный. На 21-ый день постнатального развития морфологическая картина стенки 3-его желудочка имела тенденцию к нормализации.

Результаты морфо-гистохимического исследования на ПНД 60

В гиппокампе крыс пренатальной вальпроатной группы наблюдались интенсивно окрашенные пирамидные нейроны. В полях CA2 и CA1 гиппокампа крыс пренатальной вальпроатной группы встречались дегенерированные пирамидные клетки без отростков, с центральным хроматолизом. В разных отделах гиппокампа крыс постнатальной вальпроатной группы морфологическая картина клеточных структур была близка к норме (Рис. 9).

На 60-ый день постнатального развития в префронтальной коре крыс пренатальной вальпроатной группы наблюдались интенсивно окрашенные пирамидные нейроны. В наружном и внутреннем слоях коры местами встречались пирамидные нейроны, пораженные центральным и сегментарным хроматолизом. В постнатальной группе подобные морфологические изменения практически не наблюдались.

В амигдале (миндалевидном теле) мозга крыс пренатальной вальпроатной группы было обнаружено значительное количество пораженных клеток, тогда как у крыс постнатальной вальпроатной группы морфологическая картина оставалась близкой к норме.

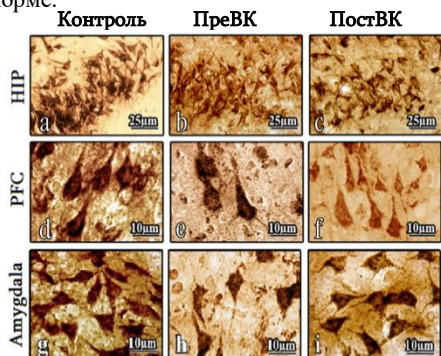
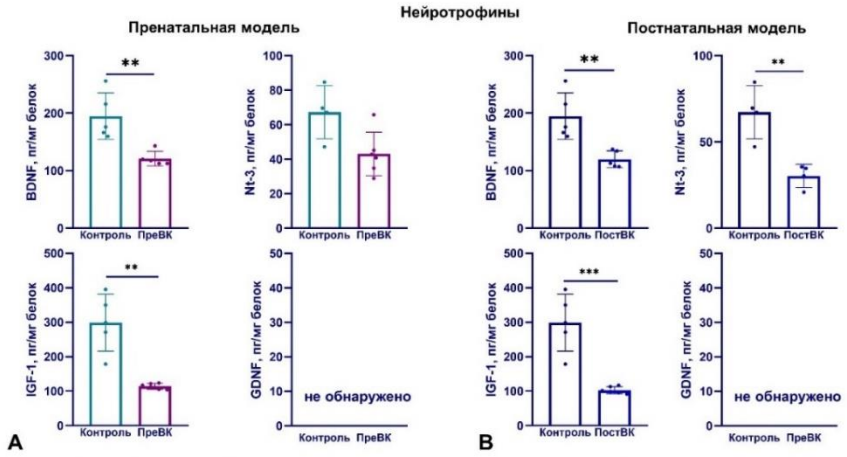


Рисунок 9. Оценка морфологических изменений в гиппокампе, префронтальной коре, амигдале крыс на ПНД 60 после введения вальпроевой кислоты. Увеличение $\times 400$ (a, b, c), $\times 1000$ (d-i).

Изменения в субвентрикулярной зоне мозга на ПНД 14



Изменения в субвентрикулярной зоне мозга на ПНД 21

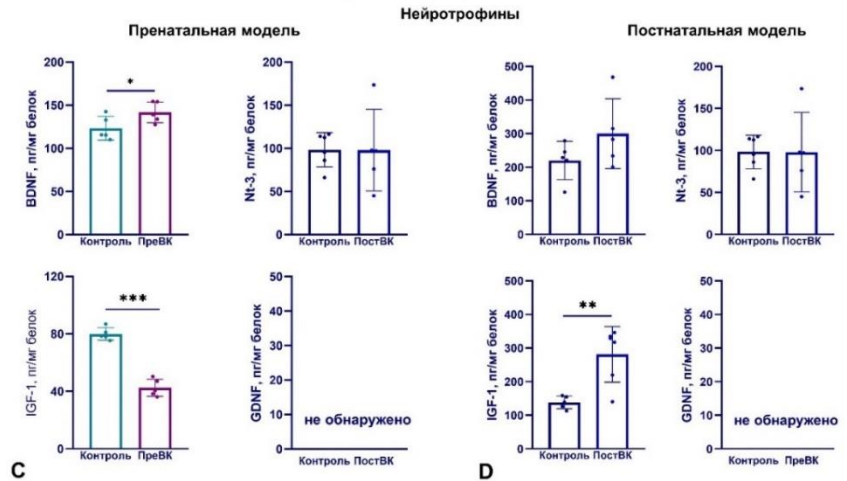


Рисунок 8. Изменения в содержании нейротрофинов BDNF, Nt-3, IGF-1 в субвентрикулярной зоне крыс на ПНД 14 (А, В) и ПНД 21 (С, D) после пренатального и постнатального введения вальпроевой кислоты. Данные представлены как среднее значение \pm SD, n=6. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Результаты электрофизиологического исследования на ПНД 60

В префронтальной коре мозга при высокочастотной стимуляции (ВЧС) гиппокампа в контрольной и пренатальной вальпроатной группах было зарегистрировано 98 и 94 одиночных нейрона соответственно. В ПФК крыс контрольной группы 38 нейронов из 98

(38,8%) показали ответы TD-PTD при ВЧС гиппокампа. Доля таких ответов в пренатальной вальпроатной группе снизилась незначительно и составила 21,3% (20 нейронов из 94). В популяции нейронов с TD-PTD типом ответа частота потока перистимульной спайковой активности выше в пренатальной вальпроатной группе по сравнению с контрольной группой, как до стимуляции ($Mbs=16,39\pm 2,9$ против $Mbs=2,5\pm 0,3$ спайк/сек), во время стимула ($Mhfs=5,39\pm 0,3$ против $Mhfs=0,99\pm 0,03$ спайк/сек) так и после стимула ($Mps=11,86\pm 2,1$ против $Mps=2,24\pm 0,3$ спайк/сек). В обеих группах ответы TD были статистически достоверны ($p<0,001$, t-Стьюдент). В ПФК крыс контрольной группы 26 нейронов из 98 (26,5%) показали ответы TP-PTP типа во время ВЧС гиппокампа. Доля таких ответов в пренатальной вальпроатной группе увеличилась незначительно и составила 38,3% (36 нейронов из 94) (Рис. 10 В). В популяции нейронах с TP-PTD типом ответа частота пре- и постстимульного потока спайков выше в вальпроатной группе по сравнению с контрольной группой ($6,28\pm 0,4$ и $11,1\pm 1,3$ против $3,29\pm 0,3$ и $4,87\pm 0,7$ спайк/сек). При этом в обеих группах TP и PTP были статистически значимы ($p<0,05$, t-тест Стьюдента). В вальпроатной группе по сравнению с контрольной группой изменения в процентном соотношении ответов TP и TD статистически значимы ($p<0,05$, t-тест Стьюдента).

В контрольной и постнатальной вальпроатной группах было зарегистрировано 79 и 76 отдельных нейронов в префронтальной коре во время ВЧС гиппокампа соответственно. Изменения в процентах для определенных типов ответов в вальпроатной группе по сравнению с контрольной имели ту же тенденцию, что и в серии пренатального введения ВК. Следует отметить единственное значимое различие обнаруженное среди данных двух экспериментальных групп: сниженная частота перистимульных спайков (Mbs , $Mhfs$, Mps) во всех зарегистрированных нейронах в постнатальной вальпроатной группе по сравнению с контролем, в отличие от противоположной тенденции в серии с пренатальной вальпроатной группой. Значимые изменения были обнаружены только в серии пренатальной вальпроатной группы для популяций нейронов префронтальной коры, демонстрирующих ответы TP-PTP и TP-PTD после ВЧС гиппокампа.

В ПФК крыс контрольной группы 50 нейронов из 93 (53,8%) показали ответы TD-PTD при ВЧС ядра зубчатого мозжечка. Доля таких ответов в пренатальной вальпроатной группе снизилась до 48,4% недостоверно (46 нейронов из 95) ($P>0,05$ Фишера). В пренатальной вальпроатной группе были зарегистрированы 5 нейронов (7% от общего числа) с только TD ответом. Как в контрольной группе, так и в вальпроатной снижение средней частоты во время ВЧС (TD), а также увеличение средней частоты во время ВЧС (TP) является значимым по сравнению с фоновой частотой ($p<0,05$, t-критерий Стьюдента), тогда как постстимульное увеличение спайкового потока (PTP) является значимым только в пренатальной вальпроатной группе. В ПФК мозга во время ВЧС ядра зубчатого мозжечка изменения процентных долей для ответов TD-PTD, TD-PTP, TP-PTP в постнатальной вальпроатной группе по сравнению с контрольной группой имели ту же тенденцию, что и в серии пренатальной модели, за исключением TP-PTD (7,7%, $p<0,01$ Фишер), которые были зарегистрированы только в контрольной группе. В целом, в контрольной группе наблюдалось значительное снижение частоты спайков только во время TD ($0,67\pm 0,08$ против $4,8\pm 0,5$ и $1,6\pm 0,2$ против $5,4\pm 1$ спайк/сек, $p<0,001$, t-критерий Стьюдента) и PTD ($3,05\pm 0,4$ против $4,8\pm 0,5$ спайк/сек, $p<0,01$, t-критерий Стьюдента). В постнатальной вальпроатной группе наблюдалось значительное увеличение частоты во время TP ($4,4\pm 1,2$ против $1,4\pm 0,4$ спайк/сек, $p<0,05$ t-критерий Стьюдента) и PTP ($4,56\pm 0,7$

против $2,8 \pm 0,5$ спайк/сек, $p < 0,01$ t-критерий Стьюдента). Сравнение процентных изменений средней частоты с ее базовой частотой в пренатальной вальпроатной и контрольной группах выявило значительные изменения в TD ($-85 \pm 4\%$ против $-63 \pm 2\%$, $p < 0,001$ t-критерий Стьюдента) и PTD ($-53 \pm 8\%$ против $-23 \pm 4\%$, $p < 0,001$ t-критерий Стьюдента), TP ($302 \pm 14\%$ против $252 \pm 8\%$, $p < 0,05$ t-критерий Стьюдента) и RTP ($85 \pm 15\%$ против $28 \pm 15\%$, $p < 0,05$ t-критерий Стьюдента).

98 отдельных нейронов были зарегистрированы в миндалевидном теле во время ВЧС гиппокампа в контрольной группе и 102 нейрона в пренатальной вальпроатной группе, из которых 7 (6,8%) были неактивными (ареактивными). В контрольной группе 26 нейронов из 98 (26,5%) проявили ответы TD-PTD во время ВЧС гиппокампа. Доля таких ответов в пренатальной вальпроатной группе снизилась незначительно до 19,6% (20 нейронов из 102) ($P > 0,05$ по Фишеру). В пренатальной вальпроатной и контрольной группах ответы TD и TP достоверны во всех популяциях. В постнатальной вальпроатной группе были зарегистрированы неактивные нейроны, показывающие только TD (8 нейронов из 99). Снижение соотношения долей ответов TP-PTD являлось значительным (8% против 23% конроля, $p < 0,01$, Fisher). Сравнение процентных изменений средней частоты с ее базовой частотой в пренатальной вальпроатной и контрольной группах выявило значительное снижение TP ($62 \pm 5\%$ против $108 \pm 12\%$, $p < 0,0001$, t-критерий Стьюдента) в популяции нейронов TP-RTP, и значительное увеличение TP ($112 \pm 16\%$ против $51 \pm 8\%$, $p = 0,0007$ t-критерий Стьюдента) в популяции нейронов, показывающих TP-PTD. В постнатальной вальпроатной и контрольной группах те же показатели достоверно снизились только по отношению к TP ($54 \pm 17\%$ против $125 \pm 7\%$, $p < 0,0001$ t-критерий Стьюдента) в нейронах, показывающих TP-PTD. В пренатальной вальпроатной группе процентная доля возбуждающего типа ответов увеличилась, а посттетанический PTD и RTP были значимыми, TP увеличилась и значительно уменьшилась.

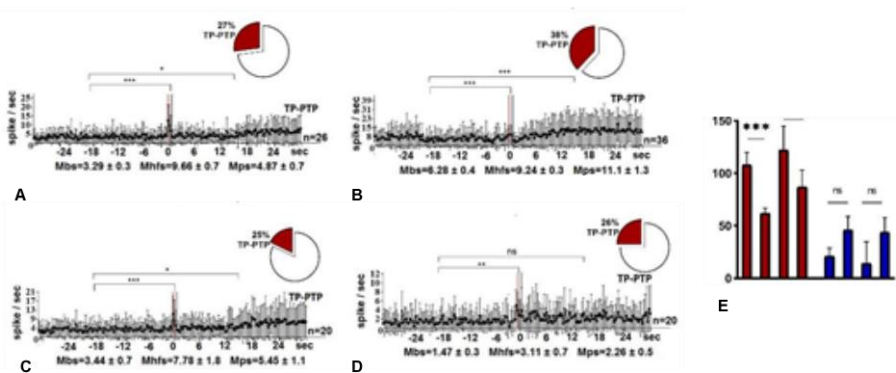


Рисунок 10. Электрофизиологические изменения в виде временных гистограмм средней частоты спайков перистимула в нейронах префронтальной коры при высокочастотной стимуляции гиппокампа после пренатального (B) и постнатального введения ВК (D) относительно контрольных групп (A, C). Данные представлены как среднее значение \pm SD, n=количество нейронов, тип ответа TP-RTP. Статистическая значимость подсчитана относительно контрольной группы и указана в виде * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$. Столбчатые диаграммы (E) показывают средний % изменения относительно исходного уровня (Mbs, нулевой уровень) в ответах времени тетанизации (красный) и времени посттетанизации (синий).**

ВЫВОДЫ

1. Пренатальное введение вальпроевой кислоты приводит к появлению аутизмоподобных поведенческих отклонений у крыс как на ранних, так и более поздних этапах развития, тогда как постнатальное введение формирует преимущественно адаптивные отклонения с тенденцией к восстановлению уровня социализации, игрового поведения и тревожности на более поздних этапах развития.
2. Пренатальное и постнатальное введение вальпроевой кислоты приводит к замедлению миграции клеток-предшественников нейронального ряда через ростральный миграционный поток из субвентрикулярной зоны в обонятельную луковицу в период с 14-го по 21-й день развития, что сопровождается снижением уровня цитозольного белка даблкортина в обонятельной луковице на 21-й день и уменьшением концентраций нейротрофинов BDNF, NT-3 и IGF-1 в субвентрикулярной зоне на 14-й день развития.
3. Пренатальное и постнатальное введение вальпроевой кислоты приводит к нарушению нейроглиального соотношения в префронтальной коре крыс на 14-й и 21-й дни развития, что проявляется повышением уровня цитозольного белка GFAP, снижением уровней ядерного белка NeuN и/или везикулярного белка синаптофизина, а также низкой концентрацией нейротрофинов NT-3 и/или IGF-1 на 14-й день развития.
4. Пренатальное и постнатальное введение вальпроевой кислоты нарушает нейроглиальное соотношение в гиппокампе крыс на 21-й день развития, что проявляется снижением уровня цитозольного белка GFAP, повышением уровней ядерного белка NeuN и/или везикулярного белка синаптофизина, а также высокой концентрацией нейротрофина BDNF и низкой концентрацией GDNF.
5. Пренатальное введение вальпроевой кислоты нарушает морфологическую организацию клеток префронтальной коры, обонятельной луковицы и гиппокампа на ранних этапах развития, а также клеток миндалевидного тела на поздних этапах. Эти изменения сопровождаются электрофизиологическими нарушениями, проявляющимися локальной гиперактивностью нейронов префронтальной коры и ослаблением межрегиональной связи в триаде «префронтальная кора – гиппокамп – миндалевидное тело», тогда как постнатальное введение характеризуется противоположным эффектом, приводя к уменьшенной частоте перистимульных спайков и менее выраженными структурными изменениями нейронов.
6. Пренатальное и постнатальное введение вальпроевой кислоты нарушает нейрогенез, изменяя уровни нейротрофинов, замедляя миграцию нейробластов и вызывая дисбаланс нейроглии. Пренатальное воздействие оказывает более выраженный и необратимый эффект, сопровождаясь стабильным PAC-ассоциированным поведенческим фенотипом и ослабленной межструктурной коммуникацией мозга, тогда как постнатальное – более слабое и частично обратимое.
7. Результаты подчеркивают стадийную уязвимость развивающегося мозга к воздействию вальпроевой кислоты и различие механизмов её нейроповреждающего действия, что указывает на необходимость минимизации риска экспозиции в поздние сроки гестации и ранний постнатальный период для нормального нейроразвития и, соответственно, профилактики PAC.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. K. Fereshetyan, M. Danielyan, K. Yenkyan. Stage-Dependent Disruptions in Neurogenesis and Neurotrophins' Production Following Prenatal and Postnatal Valproic Acid Exposure: Implications for Autism Spectrum Disorders. Cellular and Molecular Neurobiology. 2025;2025, 45:95. doi.org/10.1007/s10571-025-01623-4 (IF 4.8, WoS Q1).
2. G. Bjørklund, M. Mkhitarian, E. Sahakyan, K. Fereshetyan, N. Meguid, M. Hemimi, N. Hassan Nashaat, K. Yenkyan. Linking Environmental Chemicals to Neuroinflammation and Autism Spectrum Disorder: Mechanisms and Implications for Prevention. Mol Neurobiol 2024 Sep;61(9):6328-6340. doi: 10.1007/s12035-024-03941-y. (IF 4.3, WoS Q1).
3. К. Ферешетян. Вальпроат-индуцированная модель расстройств аутистического спектра. Мед. Наука Армении, LXIV № 2 2024, doi:10.54503/0514-7484-2024-64.2-56
4. K. Fereshetyan, V. Chavushyan, M. Danielyan, K. Yenkyan. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. Sci Rep. 2021; 11: 23471, doi: 10.1038/s41598-021-02994-6 (IF 3.9, WoS Q1).
5. K. Yenkyan, A. Grigoryan, K. Fereshetyan, D. Yepremyan. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. Behav. Brain Res. 2017, 331, 92-101. doi:10.1016/j.bbr.2017.04.038 (IF 2.3 WoS Q2)

Тезисы

1. K. Fereshetyan, M. Danielyan, K. Yenkyan. Comparative study of pre- and postnatal valproic acid models of autism spectrum disorder: identifying brain vulnerability to VPA-evoked deficits across the timeline. Neuroscience week 2024, Abstract book, p. 24.
2. K. Fereshetyan, A. Harutyunyan, M. Mirumyan, S. Matinyan, A. Khamperyan, H. Harutyunyan, K. Yenkyan. Valproic acid administration during early postnatal life alters pups' development and neurotrophins level in neurogenic niches. European Neuropsychopharmacology. 2020, doi:10.1016/j.euroneuro.2020.09.487
3. K. Fereshetyan, K. Yenkyan. Autism-like behaviour of young rats prenatally exposed to valproic acid. European Neuropsychopharmacology 29, Supplement 1: p. S441. doi:10.1016/j.euroneuro.2018.11.664.

KATARINE S. FERESHETYAN

STUDY OF EMBRYONIC AND EARLY POSTNATAL NEUROGENESIS IMPAIRMENTS IN THE VALPROATE-INDUCED MODEL OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS.

Keywords: autism spectrum disorders, valproic acid, pre- and postnatal models, neurogenesis, behavioral alterations

Abstract

Autism spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental conditions characterized by impairments in social interaction and communication, as well as restricted, repetitive, and stereotyped patterns of behavior. The etiopathogenesis of ASD are multifactorial and involve interactions between genetic predisposition and environmental influences. Among the latter, prenatal exposure to valproic acid (VPA) — an anticonvulsant with well-documented teratogenic and neurotoxic properties — has been recognized as one of the most reliable pharmacological models of ASD in experimental research. The timing of VPA exposure appears to play a crucial role, as different stages of embryonic and early postnatal brain development determine distinct susceptibilities to its deleterious effects.

It has been hypothesized that valproate induced damage and functional alterations of autism target structures may occur and evolve late pregnancy and/or during early postnatal life. Here,

we used prenatal and postnatal administrations of VPA to investigate the main behavioral ASD-like patterns in juvenile and adult rats, as well as molecular and morphological changes in neurogenic brain regions.

Our results demonstrated that prenatal and early postnatal administration of valproate led to behavioral alterations in juvenile rats resembling core ASD phenotypes, such as increased repetitive behaviors and impaired social exploration. Interestingly, the postnatally treated group exhibited a partial tendency toward behavioral normalization in adulthood, suggesting the possible involvement of compensatory neuroplastic mechanisms. Histological and immunohistochemical analyses revealed pronounced structural abnormalities in the brain regions of prenatally VPA-treated animals, while postnatally treated rats displayed milder and more reversible alterations. These observations support the notion that VPA exerts stage-dependent neurotoxic effects, with the prenatal period representing the most critical window of vulnerability.

At the molecular level, both prenatal and postnatal VPA exposure resulted in significantly reduced levels of neurotrophins within the SVZ, accompanied by a disrupted organization of the ventricular wall and decreased expression of doublecortin in the olfactory bulb. These findings indicate impaired proliferation and migration of neuronal progenitor cells through the rostral migratory pathway. In contrast, postnatal exposure produced transient neurotrophin alterations, including delayed IGF-1 production and an abnormal rise in BDNF levels, reflecting an attempted compensatory response of the developing brain. Furthermore, elevated glial fibrillary acidic protein expression and reduced synaptophysin in the prefrontal cortex, alongside increased neuronal markers in the hippocampus, suggest region-specific neuroglial imbalances that may underlie cognitive and behavioral dysfunctions. Electrophysiological assessments revealed more pronounced disturbances in the balance of neuronal response types and weakened interregional network connectivity in the prenatally VPA-treated group, indicating that disrupted local network hyperactivity is accompanied by reduced global integration across brain structures. Such alterations may correspond to the excitation/inhibition imbalance frequently reported in ASD pathology.

Collectively, these results demonstrate a clear time-dependent effect of valproate on brain development. Prenatal exposure causes more severe and enduring neurodevelopmental impairments associated with altered neurogenesis, synaptic plasticity, and network connectivity, whereas postnatal exposure primarily induces transient and partially reversible functional disturbances. The findings emphasize that both the late gestational and early postnatal periods represent critical windows of vulnerability to VPA-induced neurotoxicity. Importantly, they also highlight the potential role of adaptive neuroplastic and glial mechanisms that may mitigate or compensate for postnatal neurodevelopmental damage.

ՖԵՐԵՆԵՏՅԱՆ ԿԱՏԱՐԻՆԵ ՍԵՐՈՒԹԻ

ՍԱԳՄՆԱՅԻՆ ԵՎ ՎԱԳ ՀԵՏԾՆՆԳՅԱՆ ՇՐՋԱՆՈՒՄ ՆԵՅՐՈԳԵՆԵԶԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ՝ ՎԱԼՊՐՈՅԱԹՎՈՎ ՄԱԿԱԾՎԱԾ ԱՌԻՏԻՍՏԻԿ ՍՊԵԿՏՐԻ ԽԱՆԳԱՐՈՒՄՆԵՐԻ ՄՈՂԵԼՈՒՄ

Բանալի բառեր՝ աուտիզմի սպեկտրի խանգարումներ, վալպրոաթթու, պրե- և պոստնատալ մոդելներ, նեյրոգենեզ, վաքային շեղումներ

Ամփոփագիր

Աուտիստիկ սպեկտրի խանգարումները (ԱՄԽ) նեյրոգարգացման խանգարումներ են, որոնք բնորոշվում են սոցիալական հաղորդակցության խնդիրներով, կրկնվող և ստերեոտիպային վարքագծով: ԱՄԽ-ի էթիոպաթոգենեզը պայմանավորված են գենետիկ նախատրամադրվածության և շրջակա միջավայրի գործոնների բարդ

փոխազդեցությամբ, որոնց թվում է նաև նատրիումի վալպրոատը՝ հակաէպիլեպտիկ դեղամիջոց, որը հայտնի է իր տերատոգեն ազդեցությամբ: Հաշվի առնելով կենտրոնական նյարդային համակարգի զարգացման տարբեր փուլերում նեյրոտոքսիկ ազդեցությունների նկատմամբ գլխուղեղի տարբեր աստիճանի խոցելիությունը՝ ենթադրվում է, որ վալպրոատի հարուցած վնասը և աուտիզմի թիրախ հանդիսացող ուղեղային կառույցների փոփոխությունները կարող են առաջանալ հղիության վերջին եռամսյակում և վաղ հետծննդյան շրջանում:

Տվյալ հետազոտության նպատակն էր գնահատել վալպրոատի սաղմնային և վաղ հետծննդյան ներարկումների ազդեցությունը նեյրոգենեզի ընթացքի վրա՝ բացահայտելով ԱՄԽ-ին բնորոշ վարքային դրսևորումները դեռահաս և հասուն առնետների մոտ, ինչպես նաև բնութագրել ուղեղի նեյրոգեն շրջաններում առաջացող կենսաքիմիական, մորֆոլոգիական և ֆունկցիոնալ փոփոխությունները:

Մեր արդյունքները ցույց տվեցին, որ վալպրոատի և՛ սաղմնային, և՛ վաղ հետծննդյան շրջանների ներարկումները հանգեցրել են ԱՄԽ-ին բնորոշ վարքային փոփոխությունների՝ զարգացման վաղ շրջանում: Սակայն, վալպրոատի կիրառելիությունը հետծննդյան շրջանում ցուցաբերել է կարճաժամկետ ազդեցություն, որը դրսևորվել է հասուն տարիքում վարքային փոփոխությունների վերականգմամբ: Սաղմնային շրջանում վալպրոատ ստացած խմբերի մոտ հայտնաբերվել են գլխուղեղի թիրախային կառույցների արտահայտված փոփոխություններ, մինչդեռ հետծննդյան շրջանում վալպրոատ ստացած խմբերի մոտ նման շեղումներ չեն արձանագրվել, ինչը վկայում է ուղեղի զարգացման տարբեր փուլերում վալպրոատի ազդեցության ծանրության տարբեր աստիճանի մասին: Փորձարարական երկու խմբերում էլ արձանագրվել է նեյրոտրոֆիկ գործոնների մակարդակի զգալի նվազում ենթափորոքային շրջանում և դարբկորտիկ մակարդակի նվազում հոտառական կոճղեզում, ինչը վկայում է նեյրոնային պրոգենիտոր բջիջների միգրացիայի խանգարման մասին: Հետծննդյան շրջանում ներարկման ազդեցությունը հանգեցրել է նեյրոտրոֆինների փոփոխությունների՝ ներառյալ ինսուլինանման աճի գործոնի արտադրության ուշացում և BDNF-ի մակարդակի կտրուկ բարձրացում: Գլխալ ֆիբրիլյար թթվային սպիտակուցի բարձր մակարդակը և սինապտոֆիզիկի նվազումը ճակատային կեղևում, ինչպես նաև հիպոկամպում նեյրոնալ մարկերների աճը, վկայում են տվյալ շրջանին հատուկ նեյրոգլիալ անհավասարակշռության մասին: Նախածննդյան վալպրոատային խմբում էլեկտրաֆիզիոլոգիական հետազոտությունների արդյունքերը բացահայտեցին բջջային պատասխանի տիպերի հավասարակշռության ավելի արտահայտված խախտում, ինչպես նաև գլխուղեղի տարբեր կառույցների միջև նյարդային հաղորդակցման թուլացում:

Ընդհանուր առմամբ, արդյունքները ցույց են տալիս վալպրոատի ժամանակ-կախյալ ազդեցությունը ուղեղի զարգացման վրա. նախածննդյան ազդեցությունն առաջացնում է ավելի ծանր և տևական նյարդազարգացման խանգարումներ, մինչդեռ հետծննդյան ազդեցությունը դրսևորում է մասամբ դարձելի ֆունկցիոնալ շեղումներ: Ստացված տվյալներն ընդգծում են, որ հղիության և վաղ հետծննդյան շրջաններում նյարդազարգացումը խոցելի է վալպրոատի ազդեցության նկատմամբ, սակայն հնարավոր է կոմպենսատոր մեխանիզմների առկայությամբ պայմանավորված հետծննդյան նեյրոտոքսիկ ազդեցության թուլացում: