


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Плотность нейронов в коре головного мозга и гиппокампе мышей линии *Clstn2*-КО – модели расстройств аутистического спектра

И.Н. Рожкова¹, С.В. Окотруб^{1, 2}, Е.Ю. Брусенцев¹, Е.Е. Ульданова¹, Э.А. Чуйко^{1, 2}, Т.В. Липина³, Т.Г. Амстиславская⁴, С.Я. Амстиславский¹ 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Университет Торонто, Торонто, Канада

⁴ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия


 amstis@yandex.ru

Аннотация. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это группа состояний, возникающих в детском возрасте, для которых характерны трудности с социальным взаимодействием и общением, а также нетипичные модели поведения и склонность к стереотипии. Механизмы возникновения этой группы расстройств до сих пор не вполне понятны, и, следовательно, отсутствуют соответствующие методы профилактики. Целью исследования была оценка плотности нейронов в медиальной префронтальной коре и четырех областях гиппокампа, а именно СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилины (DG) у мышей линии *Clstn2*-КО, которая может выступать в качестве генетической модели РАС. Кроме того, охарактеризовали уровень нейрогенеза в области DG гиппокампа. Данная линия получена путем нокаута гена кальсинтенина-2 (*Clstn2*) на основе мышей линии C57BL/6J; последняя была использована в настоящем исследовании в качестве контроля. Для определения плотности нейронов изготавливали серийные срезы соответствующих областей мозга на криотоме с последующим иммуногистохимическим окрашиванием и конфокальной микроскопией, для чего использовали нейрональный маркер (anti-NeuN) в качестве первичного антитела. Наряду с этим в области DG гиппокампа оценивали нейрогенез, для чего проводили иммуногистохимическое окрашивание с применением антитела против даблкортина (anti-DCX). В обоих случаях в качестве вторичного антитела был Goat anti-rabbit IgG. Плотность нейронов в области гиппокампа СА1 была снижена как у самцов, так и самок мышей *Clstn2*-КО по сравнению с контролем; у самцов обеих линий плотность нейронов была ниже в этой области по сравнению с самками. Помимо этого, были обнаружены различия между самцами и самками в двух других областях гиппокампа: в области СА2 – у мышей обеих исследованных линий, а в области СА3 лишь у мышей C57BL/6J плотность нейронов была меньше у самцов по сравнению с самками. Различий между исследованными группами в уровне нейрогенеза, а также в плотности нейронов в префронтальной коре и области DG гиппокампа не обнаружено. Полученные результаты показывают, что нокаут по гену *Clstn2* приводит к избирательному снижению плотности нейронов в СА1-области гиппокампа, что может представлять собой клеточную мишень для ранней профилактики и возможной терапии РАС.

Ключевые слова: мыши; кальсинтенин-2; мозг; плотность нейронов; префронтальная кора; гиппокамп; расстройства аутистического спектра.

Для цитирования: Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Ульданова Е.Е., Чуйко Э.А., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. Плотность нейронов в коре головного мозга и гиппокампе мышей линии *Clstn2*-КО – модели расстройств аутистического спектра. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):365-370. DOI 10.18699/VJGB-22-44

Neuronal density in the brain cortex and hippocampus in *Clstn2*-KO mouse strain modeling autistic spectrum disorder


I.N. Rozhkova¹, S.V. Okotrub^{1, 2}, E.Yu. Brusentsev¹, E.E. Uldanova¹, E.A. Chuyko^{1, 2}, T.V. Lipina³, T.G. Amstislavskaya⁴, S.Ya. Amstislavsky¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ University of Toronto, Toronto, Canada

⁴ Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru

Abstract. Autistic spectrum disorders (ASD) represent conditions starting in childhood, which are characterized by difficulties with social interaction and communication, as well as non-typical and stereotyping models of behavior. The mechanisms and the origin of these disorders are not yet understood and thus far there is a lack of prophylactic measures for these disorders. The current study aims to estimate neuronal density in the prefrontal cortex and four hip-

pocampal subfields, i.e. CA1, CA2, CA3, and DG in *Clstn2*-KO mice as a genetic model of ASD. In addition, the level of neurogenesis was measured in the DG area of the hippocampus. This mouse strain was obtained by a knockout of the calyntenin-2 gene (*Clstn2*) in C57BL/6J mice; the latter (wild type) was used as controls. To estimate neuronal density, serial sections were prepared on a cryotome for the above-mentioned brain structures with the subsequent immunohistochemical labeling and confocal microscopy; the neuronal marker (anti-NeuN) was used as the primary antibody. In addition, neurogenesis was estimated in the DG region of the hippocampus; for this purpose, a primary antibody against doublecortin (anti-DCX) was used. In all cases Goat anti-rabbit IgG was used as the secondary antibody. The density of neurons in the CA1 region of the hippocampus was lower in *Clstn2*-KO mice of both sexes as compared with controls. Moreover, in males of both strains, neuronal density in this region was lower as compared to females. Besides, the differences between males and females were revealed in two other hippocampal regions. In the CA2 region, a lower density of neurons was observed in males of both strains, and in the CA3 region, a lower density of neurons was also observed in males as compared to females but only in C57BL/6J mice. No difference between the studied groups was revealed in neurogenesis, nor was it in neuronal density in the prefrontal cortex or DG hippocampal region. Our new findings indicate that calyntenin-2 regulates neuronal hippocampal density in subfield-specific manner, suggesting that the CA1 neuronal subpopulation may represent a cellular target for early-life preventive therapy of ASD.

Key words: mice; calyntenin-2; brain; neuronal density; prefrontal cortex; hippocampus; autism spectrum disorder.

For citation: Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Uldanova E.E., Chuyko E.A., Lipina T.V., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Neuronal density in the brain cortex and hippocampus in *Clstn2*-KO mouse strain modeling autistic spectrum disorder. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):365-370. DOI 10.18699/VJGB-22-44

Введение

Диагностика и профилактика расстройств аутистического спектра (РАС) в раннем возрасте очень важны и требуют идентификации конкретной молекулярно-клеточной мишени. Несмотря на некоторый прогресс в этой области, например установление генов *Fragile X*, *SHANK3*, *CASPR2* как факторов риска РАС, до сих пор механизмы возникновения этой группы расстройств не вполне понятны и, следовательно, отсутствуют соответствующие методы профилактики. Основная причина этого заключается в том, что в патогенез аутизма вовлечены как генетические факторы, так и факторы окружающей среды, в том числе, например, эпигенетические модификации генома, ремоделирование хромосом, окислительный стресс и многие другие (Waye, Cheng, 2017).

Области гиппокампа (CA1, CA2, CA3 и зубчатая извилина – dentate gyrus, DG) участвуют, в частности, в процессах, связанных с памятью: CA1 важна для рабочей (Newmark et al., 2013), тогда как CA3, CA4 и DG – для декларативной (Coras et al., 2014), а CA2 – эпизодической (Navratilova, Battaglia, 2015) и социальной (Hitti, Siegelbaum, 2014) памяти.

Структурные аномалии гиппокампа обнаружены при многих сложных психических расстройствах, включая сосудистую деменцию (Kim et al., 2015), болезнь Альцгеймера (Thomson et al., 2004) и РАС (Bauman, Kemper, 2005; Varghese et al., 2017). Есть указания на то, что у людей, страдающих РАС, имеются нарушения и в префронтальной коре, в частности изменено число нейронов в этой области мозга (Courchesne et al., 2011; Varghese et al., 2017). Обсуждается также, что у людей с РАС могут быть нарушения нейрогенеза (Gilbert, Man, 2017).

Некоторые исследования выявили у пациентов с РАС мутации в генах, кодирующих синаптические белки, в том числе участвующие в регуляции клеточной адгезии (Bakkaloglu et al., 2008; Morrow et al., 2008; Bourgeron, 2015). Кальсинтенины (*Clstns*) представляют собой трансмембранные синаптические белки, которые принадлежат к суперсемейству кадгериновых молекул клеточной адгезии. Существует три типа *Clstn* (*Clstn*-1, -2 и -3), которые

экспрессируются постсинаптически (Hintsch et al., 2002) и по-разному вносят вклад в сбалансированную активность возбуждающих и тормозных нейронов, при этом нарушение их соотношения характерно для некоторых пациентов с РАС (Yip et al., 2009).

Отсутствие *Clstn2* специфически снижает плотность тормозных парвалбуминовых интернейронов в некоторых структурах мозга, что проявляется в виде недостаточной функциональности тормозной, но не возбуждающей синаптической передачи в пирамидных нейронах CA1 области гиппокампа (Lipina et al., 2016). Кроме того, обнаружено изменение архитектоники синапсов у мышей *Clstn2*-KO в медиальной префронтальной коре и гиппокампе (Ranneva et al., 2020). Более того, мыши с нокаутом кальсинтенина-2 (*Clstn2*-KO) демонстрируют признаки, характерные для РАС: гиперактивность, стереотипию, недостаточные пространственное обучение и память, измененное социальное поведение с нарушением ультразвуковой вокализации (Lipina et al., 2016; Ranneva et al., 2017; Klenova et al., 2021).

Плотность нейронов в префронтальной коре и гиппокампе, а также уровень нейрогенеза в мозге на такой генетической модели РАС, как мыши линии *Clstn2*-KO, до сих пор не изучали. Таким образом, основная цель настоящего исследования состояла в том, чтобы охарактеризовать плотность нейронов в медиальной префронтальной коре, областях гиппокампа CA1, CA2, CA3 и DG, а также уровень нейрогенеза у мышей *Clstn2*-KO.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В исследовании использовали 12 гомозиготных самцов и 14 самок линии *Clstn2*-KO нокаутов по гену *Clstn2*, а также 15 самцов и 15 самок C57BL/6J (контроль) в возрасте 3 мес. Животные находились в клетках размером 36 × 25 × 14 см (длина × ширина × высота) с древесным подстилом. Самцов и самок содержали индивидуально в конвенциональном виварии НИИ нейронаук и медицины (Новосибирск, Россия), при режиме 12Д:12Н, 20–22 °С, свободном доступе к сухому гранулированному корму для лабораторных

грызунов «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и очищенной воде. Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Интракардиальная перфузия. В возрасте 3 мес. животных перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 10 % раствором параформальдегида, после чего мозг удаляли и фиксировали в фосфатном буфере, содержащем 30 % сахарозы и 5 % формалина при +4 °С. Впоследствии мозг погружали в среду Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, США), замораживали и хранили при температуре –70 °С.

Приготовление срезов мозга. Криосрезы были приготовлены для следующих областей головного мозга: 1) медиальной префронтальной коры (МПК) на расстоянии 2.46–2.22 мм от брегмы; 2) гиппокампа (области CA1, CA2, CA3 и зубчатая извилина DG) на расстоянии –1.46...–1.82 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм были получены на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) при –25 °С и помещены на предметные стекла Superfrost Plus, Menzel-Glaser (Thermo Fisher Scientific).

Иммуногистохимическое окрашивание образцов проводили согласно протоколам производителей наборов с небольшими модификациями. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение 5 мин в PBS. Затем после регидратации в 10 мМ цитратном буфере (рН = 9) при 95 °С на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) выполняли индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы удаляли из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1 % Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). Среда Protein Block ab64226 (Abcam, Великобритания) была добавлена в каждую секцию на 5 мин в соответствии с рекомендациями производителя, избыток жидкости удаляли.

После процедур промывания и выдерживания со средой Protein Block добавляли первичное антитело и оставляли на ночь при +4 °С во влажной темной камере. Используемые концентрации антител составляли 1:750 и 1:750

для сред anti-NeuN ab177487 (Abcam) и anti-DCX ab18723 (Abcam) соответственно. Далее срезы промывали буфером PBS-Tween, избыток жидкости удаляли, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat anti-rabbit IgG H&L AF488 ab150077 (Abcam) в концентрации 1:600 и оставляли во влажной темной камере в течение 2 ч при +4 °С. Затем образцы промывали буфером PBS-Tween, избыток жидкости удаляли и помещали образцы в среду ProLong, Glass AntifadeMountant, Thermo P36982 (Thermo Fisher Scientific).

Анализ плотности нейронов. С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), EC Plan-Neofluar 20×/0.50 (Carl Zeiss) были получены цифровые фотографии, по которым оценивали плотность нейронов, меченных антителами (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo>). Число меченых нейронов подсчитывали с помощью программы ImageJ. Число нейронов определяли как минимум в трех в срезах на животное, затем вычисляли среднее по этим срезам и рассчитывали среднюю плотность в объеме (мм³).

Статистический анализ. Анализ полученных результатов проводили с использованием программного пакета Statistica v. 10.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью *W*-критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M ± SEM) и проанализированы посредством двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим множественным сравнением по Фишеру. Различия при *p* < 0.05 считали статистически значимыми.

Результаты

Данные по плотности нейронов в МПК и гиппокампе (областях CA1, CA2, CA3 и DG) представлены в таблице. Выявлено статистически значимое влияние на плотность нейронов в области CA1 гиппокампа фактора «пол» ($F_{1,35} = 29.53, p < 0.001$) и фактора «группа» ($F_{2,35} = 16.68, p < 0.001$), в то же время взаимодействия этих факторов ($F_{1,35} < 1$) не обнаружено. Сравнение post-hoc показало, что как у самцов ($p < 0.001$), так и у самок ($p < 0.05$) мышей линии C1stn2-KO меньше пирамидных нейронов

Плотность нейронов в гиппокампе и префронтальной коре, нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа у мышей C57BL/6J и C1stn2-KO

Области мозга	Самцы		Самки		
	C57BL/6J ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C1stn2-KO ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C57BL/6J ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C1stn2-KO ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	
МПК	150.84 ± 3.09 (5)	154.23 ± 5.21 (4)	143.41 ± 8.82 (4)	151.90 ± 9.47 (5)	
Гиппокамп	CA1	109.54 ± 3.93 (5)	85.94 ± 4.84 (5)***	133.71 ± 4.71 (5)+++	116.31 ± 4.41 (5)**,+
	CA2	102.89 ± 17.22 (5)	111.68 ± 9.68 (4)	162.61 ± 9.13 (3) ⁺	147.85 ± 7.09 (5) ⁺
	CA3	138.11 ± 20.67 (5)	192.65 ± 28.39 (4)	217.95 ± 41.63 (3) ⁺	173.76 ± 9.72 (5)
	DG	400.72 ± 121.08 (5)	383.32 ± 87.66 (4)	504.41 ± 75.18 (3)	502.15 ± 30.73 (5)
Нейрогенез	19.96 ± 1.32 (6)	22.93 ± 1.98 (6)	20.29 ± 3.08 (5)	20.16 ± 2.83 (5)	

Примечание. N^* – число нейронов в интересующей области; SEM – стандартная ошибка среднего; *n* – число животных; ** $p < 0.05$ по сравнению с C57BL/6J того же пола; *** $p < 0.001$ по сравнению с C57BL/6J того же пола; ⁺ $p < 0.05$ по сравнению с самцами той же линии; +++ $p < 0.001$ по сравнению с самцами той же линии.

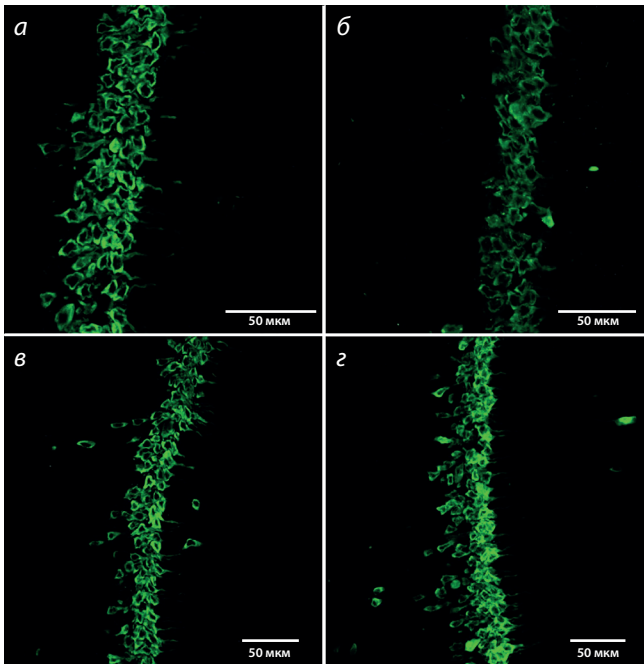


Рис. 1. Микрофотографии области CA1 гиппокампа, нейроны мечены антителами против NeuN.

а, б – самки; в, з – самцы линий C57BL/6J (а, в) и *Clstn2*-KO (б, з).

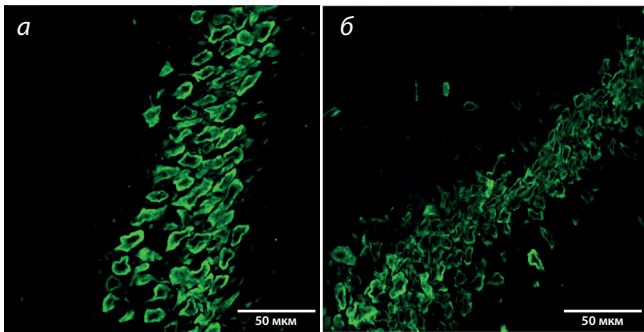


Рис. 2. Микрофотографии области CA2 гиппокампа.

Нейроны мечены антителами против NeuN у самок (а) и самцов (б) линии C57BL/6J.

в области CA1 гиппокампа по сравнению с контролем C57BL/6J (рис. 1). Более того, имелись межполовые различия: у самок обеих линий было больше пирамидных нейронов ($p < 0.001$) в области гиппокампа CA1 по сравнению с самцами (см. рис. 1).

Обнаружено влияние фактора «пол» на плотность нейронов в области CA2 гиппокампа ($F_{1,31} = 12.03$, $p < 0.05$). В то же время не было влияния фактора «группа» ($F_{1,31} < 1$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,31} < 1$). Сравнение post-hoc продемонстрировало, что самки обеих линий имели больше пирамидных нейронов ($p < 0.05$) в области CA2 гиппокампа по сравнению с самцами (рис. 2). Однако межлинейных различий плотности нейронов в этом отделе не было.

Не выявлено влияния факторов «пол» ($F_{1,35} = 1.66$, $p > 0.05$) и «группа» ($F_{1,35} < 1$) на плотность нейронов в области CA3 гиппокампа, но обнаружено взаимодействие

этих факторов ($F_{1,35} = 4.36$, $p < 0.05$). Сравнение post-hoc показало, что самки линии C57BL/6J имели больше пирамидных нейронов, чем самцы этой линии ($p < 0.05$).

Чтобы исключить возможность снижения нейрогенеза как одной из причин уменьшения плотности нейронов в области CA1 у мышей *Clstn2*-KO, была проведена его оценка в регионе DG гиппокампа. На этот показатель не выявлено влияния факторов «пол» ($F_{1,35} = 1.27$, $p > 0.05$), «группа» ($F_{1,35} < 1$), а также взаимодействия этих факторов ($F_{1,35} < 1$). При сравнении post-hoc установлено, что межлинейные и половые различия по уровню нейрогенеза в области DG отсутствуют (см. таблицу).

Обсуждение

В настоящем исследовании не было обнаружено изменений плотности нейронов в префронтальной коре ни у самцов, ни у самок мышей линии *Clstn2*-KO, несмотря на то, что у людей с РАС в этой области мозга имеются отличия по этому параметру (Courchesne et al., 2011). Однако к этим данным, полученным путем изучения биоптатов мозга, взятых *post mortem*, следует относиться с осторожностью, поскольку число изученных образцов мозга невелико. На мышах линии VTBR – модели идиопатического аутизма – не было найдено существенных отличий по числу нейронов в префронтальной коре (Stephenson et al., 2011), что согласуется с результатами наших исследований на мышах *Clstn2*-KO. Однако в других работах у мышей этой линии показан более низкий уровень внеклеточного ацетилхолина и больше кинуреновой кислоты, но не серотонина в этой области головного мозга (McTighe et al., 2013; Guo, Commons, 2017). Можно предположить, что развитие РАС связано с нарушением баланса нейромедиаторных систем в префронтальной коре, а плотность нейронов в этой структуре не является универсальным маркером этих расстройств.

В нашем исследовании обнаружено, что как у самцов, так и у самок мышей линии *Clstn2*-KO снижена плотность нейронов в области CA1 гиппокампа. В более ранней работе (Lipina et al., 2016) показан дефицит тормозных ГАМКергических нейронов в областях CA1 и CA3 гиппокампа у мышей данной линии. Можно предположить, что установленное нами снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа у мышей *Clstn2*-KO связано в том числе и с этим снижением ГАМКергических нейронов.

Структурные исследования с помощью МРТ выявили уменьшение относительного объема гиппокампа у пациентов с РАС в возрасте от 4 до 18 лет (Sussman et al., 2015). Более того, изменение размеров гиппокампа обнаружено также у взрослых пациентов с РАС (Braden et al., 2017). По результатам биопсии и последующего анализа плотности нейронов в отдельных областях гиппокампа, у людей с симптомами РАС выявлено изменение плотности нейронов в отдельных областях гиппокампа, наиболее выраженные изменения наблюдали в области CA1 (Lawrence et al., 2010; Greco et al., 2011).

Исследования на различных лабораторных моделях также свидетельствуют, что нарушения в области CA1 гиппокампа ассоциированы с развитием РАС. В частности, гетерозиготные мыши, имеющие недостаточность фактора транскрипции *Tcf4* и проявляющие некоторые признаки

аутизма, показали усиление синаптической передачи в области CA1 гиппокампа (Kennedy et al., 2016). Мыши BTBR T+tf/J демонстрируют поведение, характерное для РАС, сопровождающееся потерей нейронов в области CA1 гиппокампа (Zhang et al., 2019). Гетерозиготные мыши SHANK-3, которые считаются известной моделью РАС, имели больше перфорированных синапсов в радиальном слое области CA1 гиппокампа (Urral et al., 2015), что подтверждает нарушенную синаптическую пластичность в этом регионе мозга (Moessner et al., 2007). При синдроме ломкой X-хромосомы, одной из форм РАС, связанной с нарушением гена *Fmr1*, также обнаружены специфические изменения в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа (Sawicka et al., 2019). Таким образом, как наши результаты, так и данные приведенных выше работ на других моделях, созданных на мышах, свидетельствуют о том, что нарушения в области CA1 гиппокампа могут рассматриваться как своего рода универсальный маркер РАС.

В данном исследовании плотность нейронов у самок мышей Clstn2-KO в областях CA1 и CA2 гиппокампа была больше, чем у самцов. Более того, у самок мышей контрольной линии C57BL/6J число нейронов в данных областях и в зоне CA3 гиппокампа также было больше, чем у самцов, что может быть физиологической особенностью и свидетельствовать об отсутствии взаимосвязи с РАС, несмотря на то что у людей РАС проявляется у мальчиков чаще, чем у девочек, в соотношении 4.3:1 (Fombonne, 2003).

Нарушение процесса образования новых нейронов во взрослом возрасте играет значительную роль при возникновении психических расстройств (Schoenfeld, Cameron, 2015). Более того, показано, что у мышей линии BTBR обнаружено существенное снижение нейрогенеза у взрослых животных (Stephenson et al., 2011). Однако, по нашим данным, нейрогенез у взрослых мышей Clstn2-KO не нарушен. Возможно, снижение плотности нейронов в области CA1, установленное у мышей Clstn2-KO, обусловлено усилением нейродегенеративных процессов, что может, в частности, приводить к нарушению баланса тормозных и возбуждающих нейронов.

Заключение

Выявлено снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа как у самцов, так и у самок мышей линии Clstn2-KO по сравнению с контрольными мышами C57BL/6J. Между тем у мышей Clstn2-KO не обнаружено отличий плотности нейронов в других областях гиппокампа, в префронтальной коре, а также уровня нейрогенеза. Снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа у мышей Clstn2-KO можно рассматривать как специфическую характеристику этой линии, моделирующей расстройства аутистического спектра.

Список литературы / References

Bakkaloglu B., O'Roak B.J., Louvi A., Gupta A.R., Abelson J.F., Morgan T.M., Chawarska K., Klin A., Ercan-Sencicek A.G., Stillman A.A., Tanriver G., Abrahams B.S., Duvall J.A., Robbins E.M., Geschwind D.H., Biederer T., Gunel M., Lifton R.P., State M.W. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82:165-173. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.017.

- Bauman M.L., Kemper T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2005; 23:183-187. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006.
- Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16:551-563. DOI 10.1038/nrn3992.
- Braden B.B., Smith C.J., Thompson A., Glaspy T.K., Wood E., Vatsa D., Abbott A.E., McGee S.C., Baxter L.C. Executive function and functional and structural brain differences in middle-age adults with autism spectrum disorder. *Autism Res.* 2017;10:1945-1959. DOI 10.1002/aur.1842.
- Coras R., Pauli E., Li J., Schwarz M., Rossler K., Buchfelder M., Hamer H., Stefan H., Blumcke I. Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2014;137:1945-1957. DOI 10.1093/brain/awu100.
- Courchesne E., Mouton P.R., Calhoun M.E., Semendeferi K., Ahrens-Barbeau C., Hallet M.J., Barnes C.C., Pierce K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011; 306(18):2001-2010. DOI 10.1001/jama.2011.1638.
- Fombonne E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.* 2003; 33(4):365-382. DOI 10.1023/a:1025054610557.
- Gilbert J., Man H.-Y. Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 2017;11:359. DOI 10.3389/fncel.2017.00359.
- Greco C.M., Navarro C.S., Hunsaker M.R., Maezawa I., Shuler J.F., Tassone F., Delany M., Au J.W., Berman R.F., Jin L.W., Schumann C., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Neuropathologic features in the hippocampus and cerebellum of three older men with fragile X syndrome. *Mol. Autism.* 2011;2(1):2. DOI 10.1186/2040-2392-2-2.
- Guo Y.P., Commons K.G. Serotonin neuron abnormalities in the BTBR mouse model of autism. *Autism Res.* 2017;10(1):66-77. DOI 10.1002/aur.1665.
- Hintsch G., Zurlinden A., Meskenaite V., Steuble M., Fink-Widmer K., Kinter J., Sonderegger P. The calysntenins – a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002;21:393-409. DOI 10.1006/mcne.2002.1181.
- Hitti F.L., Siegelbaum S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature.* 2014;508:88-92. DOI 10.1038/nature13028.
- Kennedy A.J., Rahn E.J., Paulukaitis B.S., Savell K.S., Kordasiewicz H.B., Wang J., Lewis J.W., Posey J., Strange S.K., Guzman-Karlsson M.C., Phillips S.E., Decker K., Motley S.T., Swayze E.E., Ecker D.J., Michael T.P., Day J.J., Sweatt J.D. Tcf4 regulates synaptic plasticity, DNA methylation, and memory function. *Cell Rep.* 2016;16:2666-2685. DOI 10.1016/j.celrep.2016.08.004.
- Kim G.H., Lee J.H., Seo S.W., Kim J.H., Seong J.K., Ye B.S., Cho H., Noh Y., Kim H.J., Yoon C.W., Oh S.J., Kim J.S., Choe Y.S., Lee K.H., Kim S.T., Hwang J.W., Jeong J.H., Na D.L. Hippocampal volume and shape in pure subcortical vascular dementia. *Neurobiol. Aging.* 2015;36:485-491. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.009.
- Klenova A.V., Volodin I.A., Volodina E.V., Ranneva S.V., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Vocal and physical phenotypes of calysntenin2 knockout mouse pups model early-life symptoms of the autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* 2021;412:113430. DOI 10.1016/j.bbr.2021.113430.
- Lawrence Y.A., Kemper T.L., Bauman M.L., Blatt G.J. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol. Scand.* 2010;121(2):99-108. DOI 10.1111/j.1600-0404.2009.01234.x.
- Lipina T.V., Prasad T., Yokomaku D., Luo L., Connor S.A., Kawabe H., Wang Y.T., Brose N., Roder J.C., Craig A.M. Cognitive deficits in calysntenin-2-deficient mice associated with reduced GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41:802-810. DOI 10.1038/npp.2015.206.

- McTighe S.M., Neal S.J., Lin Q., Hughes Z.A., Smith D.G. The BTBR mouse model of autism spectrum disorders has learning and attentional impairments and alterations in acetylcholine and kynurenic acid in prefrontal cortex. *PLoS One*. 2013;8(4):e62189. DOI 10.1371/journal.pone.0062189.
- Moessner R., Marshall C.R., Sutcliffe J.S., Skaug J., Pinto D., Vincent J., Zwaigenbaum L., Fernandez B., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:1289-1297. DOI 10.1086/522590.
- Morrow E.M., Yoo S.Y., Flavell S.W., Kim T.K., Lin Y., Hill R.S., Mukaddes N.M., Balkhy S., Gascon G., Hashmi A., Al-Saad S., Ware J., Joseph R.M., Greenblatt R., Gleason D., Ertelt J.A., Apse K.A., Bodell A., Partlow J.N., Barry B., Yao H., Markianos K., Ferland R.J., Greenberg M.E., Walsh C.A. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008;321:218-223. DOI 10.1126/science.1157657.
- Navratilova Z., Battaglia F.P. CA2: it's about time – and episodes. *Neuron*. 2015;85:8-10. DOI 10.1016/j.neuron.2014.12.044.
- Newmark R.E., Schon K., Ross R.S., Stern C.E. Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus*. 2013;23:467-475. DOI 10.1002/hipo.22106.
- Ranneva S.V., Maksimov V.F., Korostyshevskaja I.M., Lipina T.V. Lack of synaptic protein, calyntenin-2, impairs morphology of synaptic complexes in mice. *Synapse*. 2020;74:e22132. DOI 10.1002/syn.22132.
- Ranneva S.V., Pavlov K.S., Gromova A.V., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Features of emotional and social behavioral phenotypes of calyntenin2 knockout mice. *Behav. Brain Res.* 2017;332:343-354. DOI 10.1016/j.bbr.2017.06.029.
- Sawicka K., Hale C.R., Park C.Y., Fak J.J., Gresack J.E. FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. *Elife*. 2019;8:e46919. DOI 10.7554/eLife.46919.
- Schoenfeld T.J., Cameron H.A. Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:113-128. DOI 10.1038/npp.2014.230.
- Stephenson D.T., O'Neill S.M., Narayan S., Tiwari A., Arnold E., Samaroo H.D., Du F., Ring R.H., Campbell B., Pletcher M., Vaidya V.A., Morton D. Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Autism*. 2011;2(1):7. DOI 10.1186/2040-2392-2-7.
- Sussman D., Leung R.C., Vogan V.M., Lee W., Trelle S., Lin S., Casse D.B., Chakravarty M.M., Lerch J.P., Anagnostou E., Taylor M.J. The autism puzzle: Diffuse but not pervasive neuroanatomical abnormalities in children with ASD. *Neuroimage Clin.* 2015;8:170-179. DOI 10.1016/j.nicl.2015.04.008.
- Thompson P.M., Hayashi K.M., De Zubicaray G.I., Janke A.L., Rose S.E., Semple J., Hong M.S., Herman D.H., Gravano D., Doddrell D.M., Toga A.W. Mapping hippocampal and ventricular change in Alzheimer disease. *Neuroimage*. 2004;22(4):1754-1766. DOI 10.1016/j.neuroimage.2004.03.040.
- Uppal N., Puri R., Yuk F., Janssen W.G.M., Bozdagi-Gunal O., Harony-Nicolas H., Dickstein D.L., Buxbaum J.D., Hof P.R. Ultrastructural analyses in the hippocampus CA1 field in Shank3-deficient mice. *Mol. Autism*. 2015;6:41. DOI 10.1186/s13229-015-0036-x.
- Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D.L., Harony-Nicolas H., De Rubeis S., Drapeau E., Buxbaum J.D., Hof P.R. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):537-566. DOI 10.1007/s00401-017-1736-4.
- Waye M.M.Y., Cheng H.Y. Genetics and epigenetics of autism: a review. *Psych. Clin. Neurosci.* 2017;72:228-244. DOI 10.1111/pcn.12606.
- Yip J., Soghomonian J.J., Blatt G.J. Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: an *in situ* hybridization study. *Autism Res.* 2009;2:50-59. DOI 10.1002/aur.62.
- Zhang Q., Wu H., Zou M., Li L., Li Q., Sun C., Xia W., Cao Y., Wu L. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *J. Nutr. Biochem.* 2019;71:98-109. DOI 10.1016/j.jnutbio.2019.05.002.

Благодарности. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00162) и бюджетным проектом № FWNR-2022-0023 Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Микроскопический анализ биологических объектов» ФИЦ ИЦИГ СО РАН, а также ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦИГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.11.2021. После доработки 11.01.2022. Принята к публикации 01.03.2022.